



**PEDECIBA**



Área Biología  
Subárea Biología Celular y Molecular

*Análisis del efecto traduccional de  
PDCD4 en células neuronales  
mediante secuenciación masiva de  
huellas polisomales*

Tesis de Maestría  
Lic. Guillermo Eastman

Junio 2016  
Montevideo – Uruguay

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
Área Biología  
Subárea Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

*"Análisis del efecto traduccional de PDCD4 en células neuronales  
mediante secuenciación masiva de huellas polisomales"*

**Lic. Guillermo Eastman**

Departamento de Genómica  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientador: Dr. David Munroe

Co-Orientador: Dr. José Sotelo-Silveira

**Tribunal**

Dr. Rodney Colina	(PRESIDENTE)
Dr. Omar Borsani	(VOCAL)
Dr. Federico Dajas-Bailador	(VOCAL)
Dr. Pedro Aguilera	(VOCAL)

## *Agradecimientos...*

A mis tutores por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo académico y su aliento.

A los miembros del tribunal por su tiempo y aportes constructivos.

A todos los compañeros del Departamento de Genómica y del Departamento de Proteínas y Ácidos Nucléicos con quienes compartimos el placer de hacer ciencia.

A la ANII, CSIC, CAP y PEDECIBA que aportaron de manera económica para el desarrollo de esta tesis.

A mi familia, novia y amigos por su apoyo incondicional a lo largo de toda esta etapa, las que pasaron, y las que vendrán.

# ÍNDICE

<b>I</b>	<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>Introducción</b>	<b>8</b>
II. 1	Aspectos generales de la regulación traduccional	9
II. 2	La importancia de los mecanismos de regulación traduccional en neuronas	14
II. 3	PDCD4 y la regulación traduccional	15
II. 4	<i>Ribosome Profiling</i> , una estrategia para el estudio de la traducción	19
II. 5	Antecedentes y resultados preliminares	25
<b>III</b>	<b>Hipótesis de trabajo y Objetivos</b>	<b>27</b>
III. 1	Hipótesis de trabajo	27
III. 2	Objetivos Generales y Específicos	27
<b>IV</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>28</b>
IV. 1	Estrategia experimental	28
IV. 2	Cultivos celulares de PC12	29
IV. 3	Transfección con vectores lentivirales	29
IV. 4	Inmuno-fluorescencia, Microscopía Confocal y cuantificación de imágenes	32
IV. 5	PCR cuantitativa en tiempo real	33
IV. 6	<i>Ribosome Profiling</i>	34
IV. 7	Electroforesis capilar de ácidos nucleicos	36
IV. 8	Secuenciación Masiva	37
IV. 9	Análisis de datos	37
<b>V</b>	<b>Resultados</b>	<b>41</b>
V. 1	Silenciamiento de PDCD4 en células PC12	41
V. 1.1	Establecimiento de cultivos celulares de PC12	41
V. 1.1.a	Optimización de las condiciones de cultivo	41
V. 1.1.b	Seguimiento de la expresión de PDCD4 a lo largo de la diferenciación	42
V. 1.2	Generación de un modelo <i>in vitro</i> capaz de silenciarla expresión de PDCD4 de manera inducible	43

V.1.2.a Optimización de las condiciones de transfección	43
V.1.2.b Evaluación del silenciamiento de PDCD4 a nivel de transcrito y proteico	46
V.1.3 Efectos del silenciamiento de PDCD4 en el largo de las neuritas de PC12 diferenciadas	51
<b>V. 2</b> <i>Ribosome Profiling</i> en presencia y ausencia de PDCD4	<b>54</b>
V.2.1 Puesta a punto de la metodología de <i>Ribosome Profiling</i> en el modelo celular generado	54
V.2.2 Experimento de <i>Ribosome Profiling</i> en células PC12 tras inducción del silenciamiento de PDCD4	61
V.2.3 Secuenciación masiva y análisis de datos	62
V.2.3.a Evaluación de la calidad de las bibliotecas, alineamientos y análisis primarios	62
V.2.3.b Normalización y búsqueda de genes expresados diferencialmente: DESeq y DESeq2	68
V.2.3.c Estudio de la regulación traduccional y cálculo de eficiencias traduccionales	71
V.2.3.d Búsqueda de blancos traduccionales de PDCD4 y estudios de ontología	73
<b>VI</b> <b>Discusión</b>	<b>83</b>
VI. 1 <i>Ribosome Profiling</i> en células PC12	83
VI. 2 Normalización	85
VI. 3 Regulación traduccional vs regulación transcripcional	86
VI. 4 Procesos biológicos regulados traduccionalmente por PDCD4	89
VI. 5 Fenotipo asociado al silenciamiento de PDCD4 en células PC12	91
<b>VII</b> <b>Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>94</b>
<b>VIII</b> <b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>97</b>
<b>IX</b> <b>Material Suplementario</b>	<b>105</b>
<b>X</b> <b>Anexo</b>	<b>127</b>

# I RESUMEN

La regulación de la síntesis proteica es un mecanismo clave en el control de la expresión génica. En particular, en células neuronales, la regulación traduccional adquiere una dimensión adicional dada la intrincada morfología que éstas pueden alcanzar. En este sentido, nos resulta interesante que pocos reguladores traduccionales proteicos nuevos han sido descritos para neuronas. Nuestro grupo ha caracterizado que *Programmed Cell Death 4* (PDCD4), un regulador del inicio de la traducción muy estudiado en modelos tumorales, se expresa en altos niveles en neuronas del SNC y SNP. En la presente tesis, nos propusimos estudiar el papel de PDCD4 como regulador traduccional en modelos celulares neuronales. En particular nos interesó conocer la influencia de PDCD4 en la traducibilidad de ARNm a escala ómica. Para esto, generamos un modelo celular en el cual somos capaces de silenciar la expresión proteica de PDCD4, utilizando shARN en vectores lentivirales en células PC12 en combinación con la metodología de *Ribosome Profiling*. En este contexto, identificamos al menos 480 ARNm cuya eficiencia traduccional aumenta al disminuir la expresión de PDCD4.

Los blancos putativos encontrados fueron estudiados mediante análisis de ontología, para conocer las principales funciones celulares reguladas por dicho factor. La funcionalidad de estos candidatos se relaciona principalmente con la mitocondria (fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones y producción de energía), así como procesos asociados a la sinapsis, al ribosoma y la síntesis proteica, y procesos metabólicos de amino azúcares.

El análisis individual de la ontología de ciertos genes no contenidos en las categorías mencionadas, nos indicó que potencialmente PDCD4 podría estar influenciando el crecimiento neurítico. Al evaluar esta propiedad en células PC12 diferenciadas en ausencia

de PDCD4, se observó un aumento promedial de 1,6 veces en su longitud. Estos resultados, tomados en conjunto, nos permite plantear una influencia negativa de PDCD4 sobre la neuritogénesis. Esta influencia podría estar mediado por tres aspectos: i) por la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B sobre la transcripción de genes neuritogénicos; ii) por la inhibición en la traducción de proteínas del citoesqueleto y otras proteínas que participan en el crecimiento neurítico y iii) por la regulación negativa ejercida sobre la mitocondria y los procesos necesarios para la producción de energía requerida en la neuritogénesis.

Integrando los resultados de la presente tesis y el trabajo realizado por nuestro grupo, pensamos que PDCD4 podría cumplir funciones tanto en el soma neuronal, como en las prolongaciones neuronales, asociados a diversos contextos fisiológicos definidos ampliamente como plásticos. En cada uno de ellos el repertorio de ARNm regulados por PDCD4 dependerá del conjunto de genes disponibles en dicho contexto. Este es un terreno a explorar en el futuro, incluyendo la determinación de las señales secundarias o terciarias que median la interacción de PDCD4 con sus blancos.

## **II    INTRODUCCIÓN**

La regulación a nivel traduccional es un aspecto importante en el control de la expresión génica (ejemplos en [1,2]). En particular, este tipo de regulación adquiere aún más relevancia en modelos neuronales, donde se debe considerar las dimensiones de las neuronas y el alto nivel de polarización celular que éstas adquieren. Estos dos factores agregan un nivel extra de complejidad en la regulación de la expresión génica, donde la regulación traduccional local es relevante [3-9]. Estudiar en detalle los mecanismos de regulación generales y locales es un objetivo clave para comprender una gran variedad de procesos que ocurren en el intrincado panorama tridimensional de las células neuronales.

En este sentido, pocos reguladores traduccionales nuevos se han descrito en la literatura para modelos neuronales. *Programmed Cell Death 4* (PDCD4), surge como un regulador traduccional clave en modelos tumorales [10-12], aunque sus funciones en modelos neuronales recién comienzan a ser exploradas [13,14]. Nuestro grupo ha detectado un alto nivel de expresión proteica de PDCD4 en dominios neuronales, desde el soma a axones y dendritas. También hemos observado cambios en los niveles de expresión frente a lesiones en nervios del sistema nervioso periférico, sugiriendo un posible rol de esta proteína en neuronas (tesis de Maestría de A. Di Paolo - en preparación).

En este contexto, la presente tesis intenta responder cuál es el papel que ejerce PDCD4 en modelos neuronales como regulador traduccional, aplicando tecnologías que interrogan el compartimento traduccional de manera global u ómica.

A modo de introducción, en esta sección se presentarán aspectos globales y generales de regulación traduccional, para luego introducir su relevancia en modelos neuronales.

Posteriormente se describe a PDCD4, desde su estructura, funciones y posibles mecanismos de regulación traduccional. Seguido a esto se introduce la metodología a utilizar, *Ribosome Profiling*, para evaluar la influencia de PDCD4 en la traducción, así como el modelo celular *in vitro* en el cual será aplicada. Al cierre de la sección se plantean los antecedentes del grupo de trabajo en el área de estudio, juntos con otros resultados preliminares, que motivan los objetivos evaluados en la presente tesis.

## II. 1 Aspectos generales de la regulación traduccional

El control sobre la expresión génica puede ser ejercido en varios puntos, dada la gran cantidad de procesos implicados desde la transcripción de un gen hasta la estabilización funcional final del producto génico: una proteína activa. Dentro de dichos procesos, la regulación de la traducción es un punto importante a considerar, dado que la expresión de un ARN mensajero (ARNm) es un estimador de poca precisión de los niveles de traducción y abundancia final de la proteína que codifica [15-17].

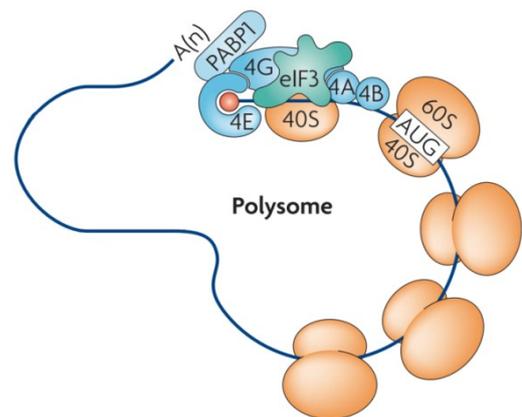
En un proceso multifactorial como la síntesis de proteínas, donde la regulación puede ser ejercida en varios puntos, se resaltan tres principales etapas: iniciación, elongación y terminación; y una cuarta etapa considerada recientemente: el reciclado ribosomal [18,19]. También se destacan los mecanismos de regulación ejercidos por ARNs no codificantes como ARNs no codificantes largos y micro ARNs. De todas maneras, los principales mecanismos de control de la traducción operan sobre la etapa de iniciación (generalmente es la fase limitante), aunque se han caracterizados casos donde la regulación ocurre en pasos posteriores, especialmente a nivel de la elongación [20]. De todas formas, la pregunta acerca de cuál es la fase limitante debe ser realizada de forma específica para cada ARNm en particular, más que a la población total de los mismos.

La literatura respecto al control de la regulación traduccional es sumamente extensa (ejemplos de revisiones en [1,21-23]), y no pretendo aquí repasar lo que se conoce respecto a esta área, sino que me centraré en los elementos regulatorios que son necesarios mencionar para comprender el rol de PDCD4 en la regulación traduccional.

Globalmente, los blancos más comunes sobre los cuales opera el control traduccional son: el ARNm y los factores de iniciación, elongación y el ribosoma. El primero, permite regular la traducción de forma específica, mientras que los otros permiten ejercer regulación a nivel global.

La regulación traduccional ejercida a través del ARNm ocurre a varios niveles pero involucra tanto motivos nucleotídicos, como estructuras secundarias y estructuras proteicas ensambladas sobre el mismo ARNm. Algunos de los elementos sobre los cuales existen mecanismos de regulación traduccional se describen en los siguientes párrafos.

La estructura de caperuza adicionada al extremo 5' del ARNm y la cola poly(A) son elementos claves que deben estar presentes en la estructura de cualquier ARNm eucariota maduro. Particularmente, el sinergismo que ocurre entre ambas estructuras, mediado por factores proteicos como el complejo eIF4F y la proteína de unión a la cola poly(A) (PABP), determina una conformación circular del ARNm (ver Figura 1) y le confiere al mismo un grado mayor de estabilidad [24]. Esta conformación circular no solo permite el reciclado de la maquinaria traduccional, sino que también



**Figura 1. Esquema de la conformación circular de un polisoma.**  
La figura muestra la conformación circular que puede adoptar un ARNm para facilitar el reciclado de la maquinaria de síntesis proteica.  
Figura adaptada de Anderson & Kedersha, *Nature* (2009) [25]

aproxima los elementos regulatorios presentes en el 3'-UTR (muy abundantes), con el complejo de pre-iniciación 43S, para así regular el inicio de la traducción.

La presencia de estructuras secundarias en el 5'-UTR representan elementos regulatorios importantes, generalmente inhibidores de la traducción. Como regla general, la estabilidad térmica (bajo  $\Delta G$ ) de las estructuras tipo horquilla en el 5'-UTR inhiben la traducción del ARNm [26-28]. En particular, como se menciona más adelante, la actividad helicasa del factor eIF4A del complejo de pre-iniciación 43S es justamente la que se ve inhibida por la interacción con PDCD4. De esta manera, PDCD4 es capaz de inhibir la traducción al bloquear el avance del complejo de pre-iniciación 43S a lo largo del 5'-UTR [11].

Otros elementos presentes en el 5'-UTR pueden tener un rol importante en la regulación traduccional, como es el caso de los uORFs (por su sigla en inglés: *upstream Open Reading Frame*). Estos pequeños marcos de lectura abiertos codifican para cadenas peptídicas que tienden a inhibir la traducción del ORF principal [29]. También interfieren con el correcto reconocimiento del codón de iniciación (AUG), proceso que en células eucariotas, ocurre mediante mecanismos de *scanning* por parte del complejo de pre-iniciación 43S, el cual busca de 5' a 3' el codón de iniciación a lo largo de todo el 5'-UTR. Un ejemplo clásico de regulación mediada por uORFs es el del factor de transcripción GCN4, que regula la respuesta a la falta de nutrientes en levaduras [30].

De todas maneras la traducción no siempre ocurre de manera cap-dependiente, existen otros mecanismos de inicio de la traducción que involucran sitios IRES (por su sigla en inglés: *Internal Ribosome Entry Sites*) [31-33]. Estos IRES son secuencias largas, de unos cientos de nucleótidos, que adquieren estructuras secundarias específicas que le permiten unir, todos o

solo un subset, de los factores de iniciación (que en algunos casos son los mismos que los utilizados en la traducción cap-dependiente).

Por último, la estabilidad del ARNm es otro factor clave a la hora de regular sus niveles de traducción. Tanto las enzimas que actúan extendiendo o degradando la cola poly(A), así como la gran cantidad de elementos regulatorios en *cis*, presentes en el 3'-UTR, contribuyen al balance entre estabilización y degradación del mensajero. Entre estos últimos, se destaca la influencia regulatoria de los micro ARN sobre la traducción [34,35].

Respecto a la regulación traduccional que se ejerce a través de los factores traduccionales, uno de los ejemplos clásicos que ilustran este tipo de regulación es la inhibición que ejercen las *4E Binding Proteins* (4E-BPs). En mamíferos existen tres 4E-BPs, cada una de las cuales contiene la secuencia de unión a eIF4E, análoga a la que se encuentra en el factor eIF4G [36]. De esta manera en su estado hipofosforilado, las 4E-BPs compiten con eIF4G por la unión a eIF4E y por lo tanto representan un inhibidor competitivo en la formación del complejo eIF4F [36,37]. Este complejo es clave en la unión al 5'-cap del ARNm, su circularización y en el desensamblaje de las estructuras secundarias presentes en el 5'-UTR [38]. Cuando mTOR (*mammalian target of rapamycin*) está activo, ejecuta la fosforilación reversible de 4 sustratos aminoacídicos de las 4E-BPs rompiendo así la interacción con eIF4E, liberándolo para que pueda formar el complejo eIF4F, anulando el efecto inhibitorio que se ejercía sobre la traducción [37].

En cuanto a los factores de elongación, se sabe que la tasa de elongación es modulada por la fosforilación de dichos factores, particularmente a través de la regulación de la actividad del factor de elongación traduccional eEF2 [39]. Este factor, junto con otros,

además de estar regulados por fosforilación, están sujetos a muchas otras modificaciones post-traduccionales que regulan su actividad [39].

Un punto de regulación traduccional global adicional es el que se ejecuta a través del ribosoma. Dicho complejo es un sitio de regulación importante donde se encuentran proteínas ribosomales (RP) que son blancos de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo fosforilaciones, metilación y ubiquitinación [40]. Se piensa que todas estas modificaciones especializan de cierto modo al ribosoma, para activar la traducción de clases específicas de mensajeros [40]. Al respecto existen algunas evidencias donde se vinculan alteraciones fenotípicas con cambios en la maquinaria ribosomal [41,42].

Cabe mencionar también que parte de la regulación traduccional ejercida por el ribosoma, puede ser ejecutada simplemente controlando la cantidad total de ribosomas disponibles en la célula.

Todos estos mecanismos hasta aquí descritos, capaces de regular la traducción, son críticos para la regulación de la expresión génica en diversos escenarios, como la privación de nutrientes y condiciones de estrés, desarrollo y diferenciación, funcionalidad del sistema nervioso, envejecimiento y enfermedades, entre otros. En particular, muchos estudios se centran en el control del inicio de la traducción, como principal mecanismo ejecutor de la regulación traduccional. Sin embargo, pocas proteínas reguladoras nuevas se han descrito involucradas en estos procesos. Un ejemplo que nos resulta de interés es el de PDCD4 [11], dado que representa el caso de un regulador traduccional recientemente documentado en la literatura y que recién empieza a ser estudiado en modelos neuronales [13,14].

## II. 2 La importancia de los mecanismos de regulación traduccional en neuronas

Los mecanismos de control traduccional descritos hasta el momento son operativos en diversos modelos eucariotas. De todas maneras, estos mecanismos adquieren una importancia particular en células neuronales, donde el alto grado de polarización celular que la neurona adquiere, junto con su morfología particular, añaden un grado de complejidad mayor. Por ejemplo, los mecanismos de regulación traduccional pueden ser ejercidos de manera central, afectando los niveles traduccionales en el soma neuronal, o de una manera completamente distinta afectando niveles traduccionales locales, regulando la síntesis proteica en los dominios neuronales: axón, dendritas, terminal pre sináptica y post sináptica.

Respecto a la síntesis proteica local, nuestro grupo [3,43-48] junto con otros [4-9], han realizado significativos aportes al área, aunque todavía resta por conocer en detalle cómo se regulan estos procesos en detalle.

A modo de ejemplo, algunos de los procesos neuronales donde el control traduccional es de particular importancia son: los procesos de generación de memoria y consolidación por LTP o LDP [49-54], desórdenes genéticos hereditarios que determinan retardo mental como el síndrome de X frágil [55-58], neuropatologías y desórdenes neurodegenerativos como los de Alzheimer (ejemplo en [59]) y Parkinson (ejemplo en [60]).

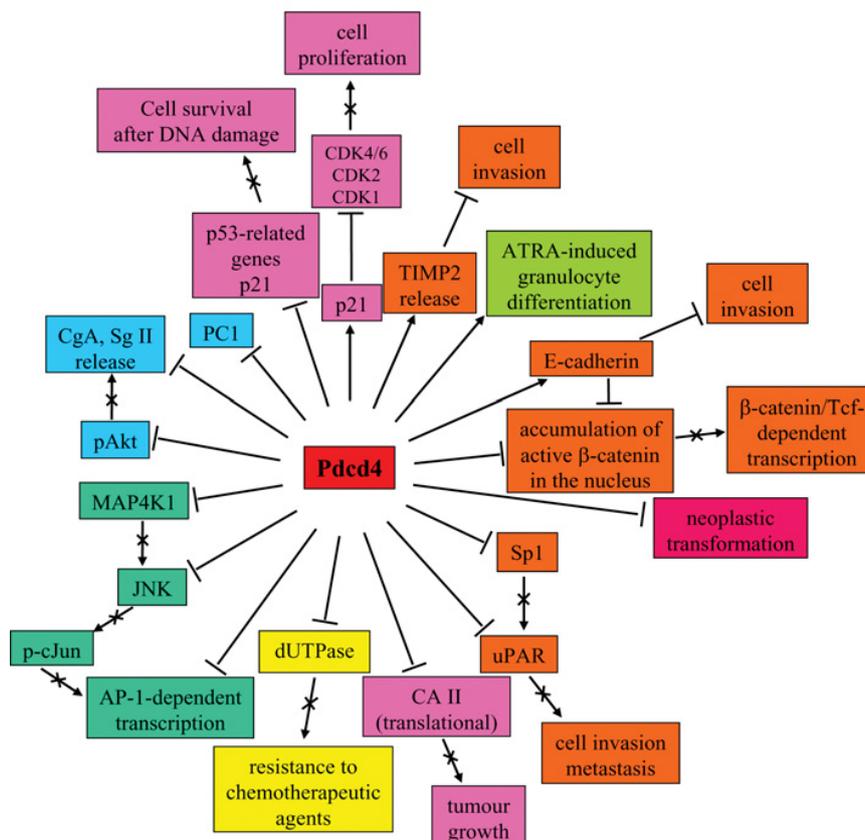
En neuronas, la maquinaria de traducción no sólo es controlada por factores y señales de estrés o crecimiento, sino que también por neurotransmisores. De todas maneras, cómo se vinculan estas dos partes no es comprendido en detalle aunque existan trabajos realizados en ésta área [61-63].

Como se comentaba anteriormente, pocos reguladores traduccionales proteicos nuevos han sido descritos en la literatura, en particular en modelos neuronales. En este sentido, la

presencia de PDCD4 como un factor proteico capaz de regular la traducción, junto con la evidencia obtenida por nuestro grupo que sugiere un posible rol neuronal (ver más adelante), despertaron nuestro interés acerca del posible papel como regulador traduccional de PDCD4 en un modelo neuronal.

### II. 3 PDCD4 y la regulación traduccional

PDCD4 fue identificado inicialmente como un gen cuya expresión aumentaba durante la apoptosis [64]. Estudios posteriores mostraron que se trata de un gen supresor de tumores involucrado en la regulación de la transcripción y traducción de ARNm, en las vías de transducción de señales celulares y en la apoptosis, entre otros (ver Figura 2) [65].



**Figura 2. Esquema respecto a las funciones celulares afectadas por PDCD4.** La figura muestra como PDCD4 estimula (flechas) o inhibe (T) algunas de las funciones celulares. Vale mencionar que no necesariamente todas las vías aquí mostradas están activas en cualquier tipo celular. Figura original de Lankat-Buttgereit&Rudiger Goke, *Biol. Cell* (2009) [65].

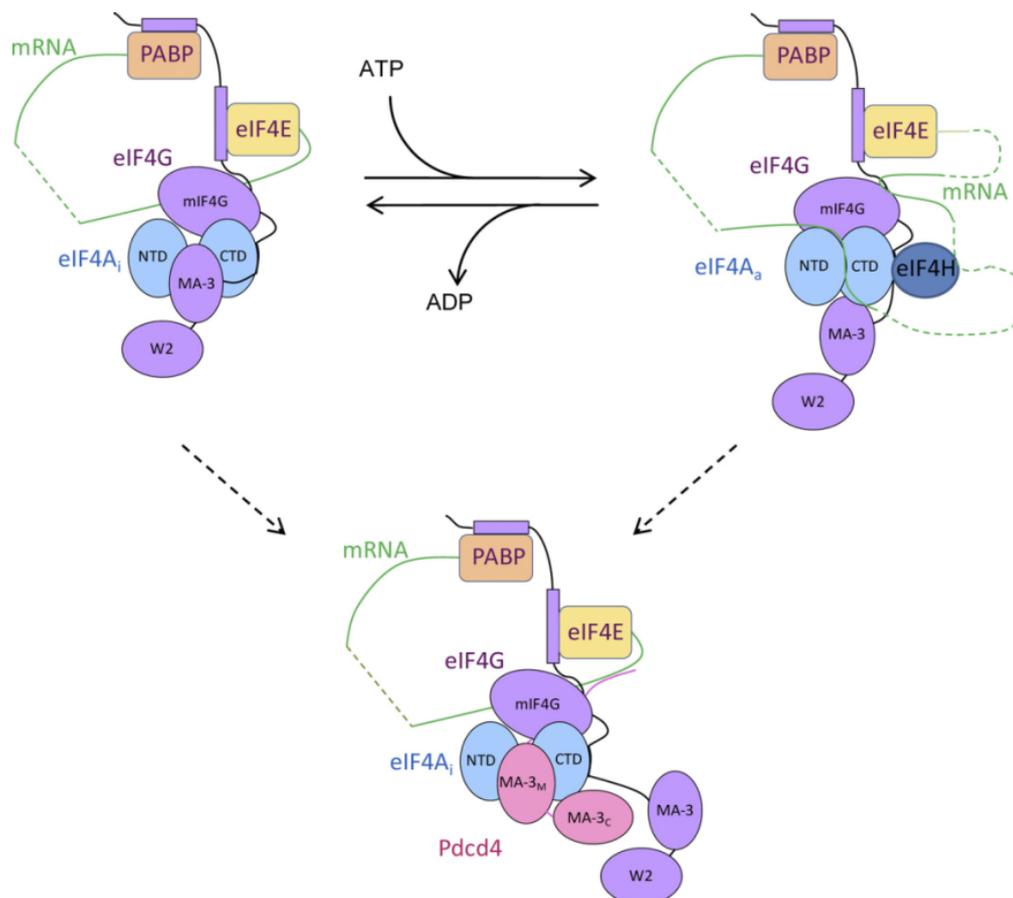
El gen de PDCD4, también conocido como DUG (*Death Upregulated Gene*), está ubicado en el genoma de la rata en el cromosoma 1, banda 1q55 [66]. Dicho gen ocupa unos 23.077 nucleótidos en el genoma y codifica para una proteína de 470 aminoácidos [66], muy conservada en vertebrados [65] y de expresión ubicua en los tejidos [67]. Dicha proteína consta de tres dominios, uno amino-terminal de unión al ARN y dos dominios MA-3 de interacción proteína-proteína: uno central (MA-3m) y otro carboxilo-terminal (MA-3c) [65]. A nivel de secuencia, la proteína cuenta con varios sitios plausibles de fosforilación que regulan su actividad, localización subcelular y degradación mediada por el proteasoma [65,68]. También cuenta con sitios blanco de micro ARN, los cuales regulan su traducción en condiciones fisiológicas alteradas. El caso más estudiado es el del miRNA-21, quien inhibe la traducción de PDCD4 en diversos tipos tumorales [69-72].

Respecto a las funciones a cargo de PDCD4, se ha descrito que interviene en la transformación neoplásica donde se manifiesta como gen supresor de tumores [65]. Esta función la desarrolla tanto a nivel transcripcional como traduccional. A nivel transcripcional se ha visto que PDCD4 regula la actividad de varios factores de transcripción al unirlos de forma directa. Algunos ejemplos son: c-Jun [73,74], sp1 [75], Twist1 [76] y p53 [77].

A nivel traduccional, se plantea que la presencia de interacciones ARN-proteína y proteína-proteína son necesarias para que PDCD4 reconozca estructuras secundarias en los 5'-UTR, ó reconozca una secuencia dentro de la región codificante, e inhiba la traducción de forma específica de ciertos ARNm. Ha sido observado que PDCD4 interacciona tanto con los factores de iniciación eucariotas eIF4A y eIF4G así como con proteínas que se encuentran en el complejo de iniciación 40S y complejo de pre-iniciación 43S [10,12,78]. En condiciones normales, eIF4G une eIF4A e interacciones adicionales activan este último factor para que manifieste su actividad de ARN helicasa, la cual le permite resolver estructuras secundarias

en los 5'-UTR que inhiben la traducción de los ARNm (ver más atrás). PDCD4 compite con eIF4G y con el ARNm por la unión a eIF4A [79]. Cuando PDCD4 logra unir a eIF4A, lo hace de manera estable y bloquea el sitio de unión al ARN de eIF4A, estabilizando la conformación abierta inactiva del complejo de iniciación [11] (ver Figura 3).

De esta forma, la interacción de PDCD4 con eIF4A inhibe su actividad helicasa, lo cual entonces inhibe de forma directa la traducción cap-dependiente de ciertos mensajeros que



**Figura 3. Modelo de regulación propuesto para PDCD4 sobre eIF4A.**

La figura muestra el control sobre el inicio de la traducción y el complejo eIF4F, en particular de eIF4A, que ejerce PDCD4. Arriba a la izquierda se muestra la configuración abierta inactiva del complejo eIF4F y el ARNm. Cuando la helicasa de ARN eIF4A une eIF4H (ó eIF4B), potencia su actividad helicasa la cual lleva adelante mediante la hidrólisis de ATP, adoptando la conformación cerrada activa que se muestra arriba a la derecha. Cualquiera de estas dos conformaciones puede ser inhibida mediante la presencia de PDCD4, que determina la conformación mostrada abajo. En esta conformación, PDCD4 desplaza eIF4H, une eIF4A, e inhibe su actividad helicasa y en consecuencia la traducción de ese ARNm.

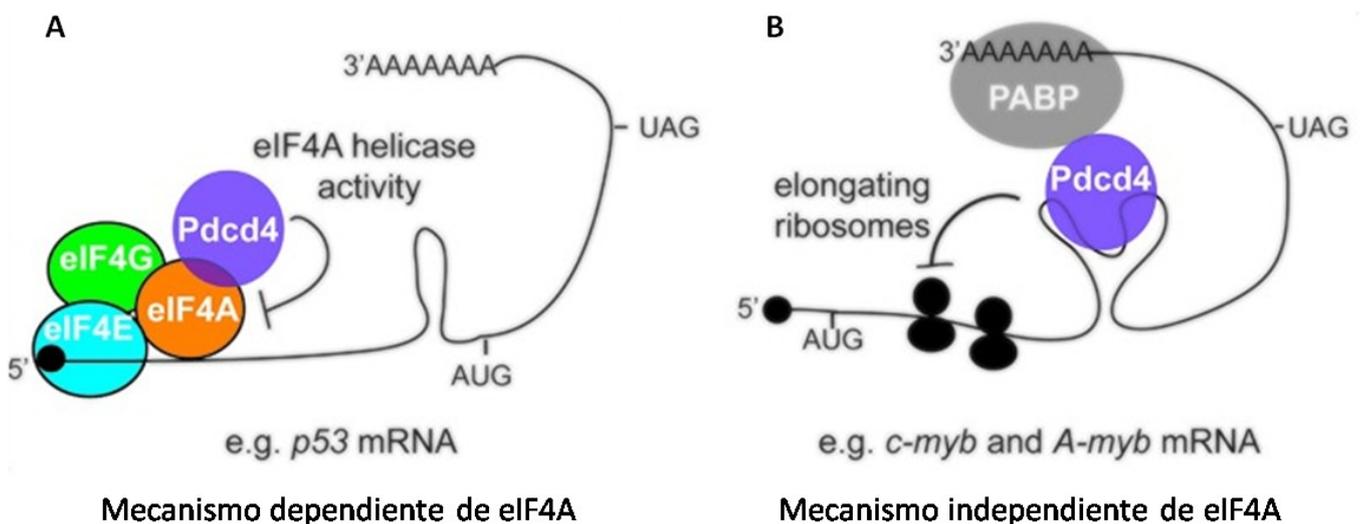
Figura original de Waters *et. al*, *Journal of Biological Chemistry* (2011) [79].

aún no se conocen con detalle. Los mensajeros cuya traducción es inhibida por PDCD4, son los que por tanto se denominan blancos traducionales.

Actualmente se conoce la existencia de unos pocos blancos traducionales de PDCD4. Algunos de ellos, como c-Myb [80], procaspasa-3 [81], p53 [82], reflejan la regulación que ejerce PDCD4 en los procesos tumorales y apoptóticos. Por esto, uno de los objetivos de la presente tesis, es conocer los posibles blancos traducionales regulados por PDCD4.

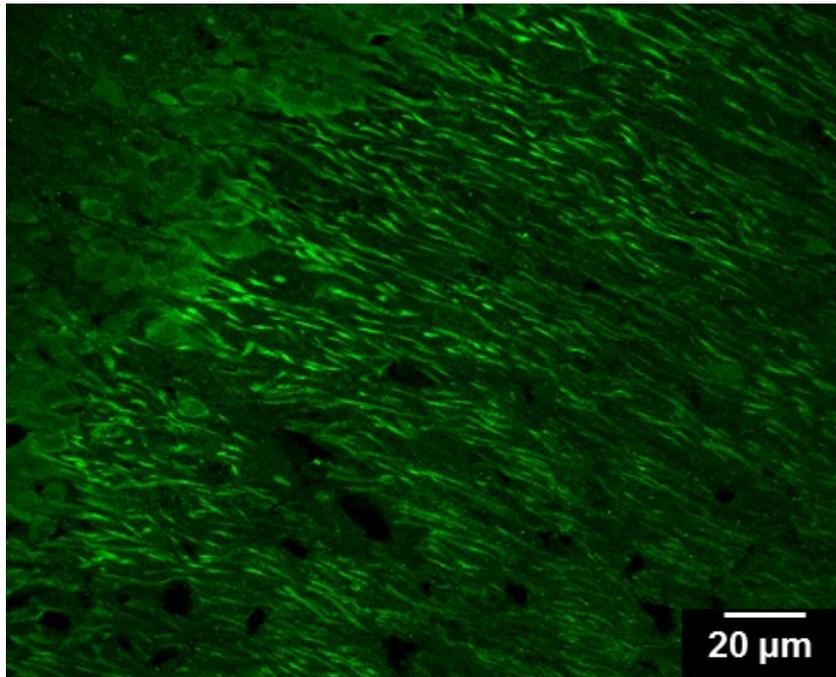
Por otro lado, pero vinculado a lo anterior, recientemente se ha involucrado a PDCD4 en un mecanismo nuevo de control traduccional, inhibiendo no la iniciación de la traducción, sino que la fase de elongación [83,84], mediante un mecanismo independiente de eIF4A (ver Figura 4).

Considerando la importancia de los mecanismos de regulación traduccional que existen en neuronas, el rol regulador de PDCD4 en la traducción [10-12,78,79,83,84] y el hecho de que se expresa en altos niveles en dendritas, axones y somas neuronales [85], como



**Figura 4. Roles de PDCD4 en la inhibición de la traducción.**

Se muestran los dos posibles modelos planteados para explicar la regulación traduccional que ejerce PDCD4 sobre sus ARNm blancos. En **(A)** se muestra el mecanismo dependiente de la helicasa de ARN eIF4A por el cual PDCD4 inhibe la iniciación de la traducción. En **(B)** se muestra el mecanismo independiente de eIF4A planteado, por el cual PDCD4 inhibe también la fase de elongación de la traducción. Figura original de Biyanee *et. al*, *Oncoscience* (2015) [83].



**Figura 5. Expresión de PDCD4 en neuronas del hipocampo.**

Se muestra un preparado de InmunoHistoQuímica, visualizado por microscopia confocal (plano focal único), de la región CA1 del hipocampo de rata. Se puede observar en verde la presencia de PDCD4.

Figura original de Di Paolo, A. tesis de grado – Facultad de Ciencias 2012.

verificara nuestro grupo anteriormente (ver Figura 5), es que resulta interesante estudiar cuál es el papel de PDCD4 en neuronas.

II. 4 Ribosome Profiling, una estrategia para el estudio de la traducción

La técnica de *Ribosome Profiling* se describe por primera vez en un artículo publicado por Ingolia y Weissman, entre otros colaboradores, en la revista *Science* en el año 2009 [86]. La metodología permite estudiar los niveles globales de traducción, evaluando de forma directa y a escala genómica, el número de ribosomas activos que están traduciendo cada ARNm transcripto por la célula [87]. Las publicaciones que utilizan esta metodología han demostrado claramente que los niveles de traducción (que para todos los genes se denomina traductoma) estimados mediante la misma, son muy buenos estimadores del proteoma (ejemplos en [17,86]). Asimismo, al estudiar la traducción con una resolución al

nivel de codones, se han descripto nuevas propiedades generales de la traducción, llegando incluso a desafiar reglas ampliamente aceptadas como dogmas de la biología molecular [88,89].

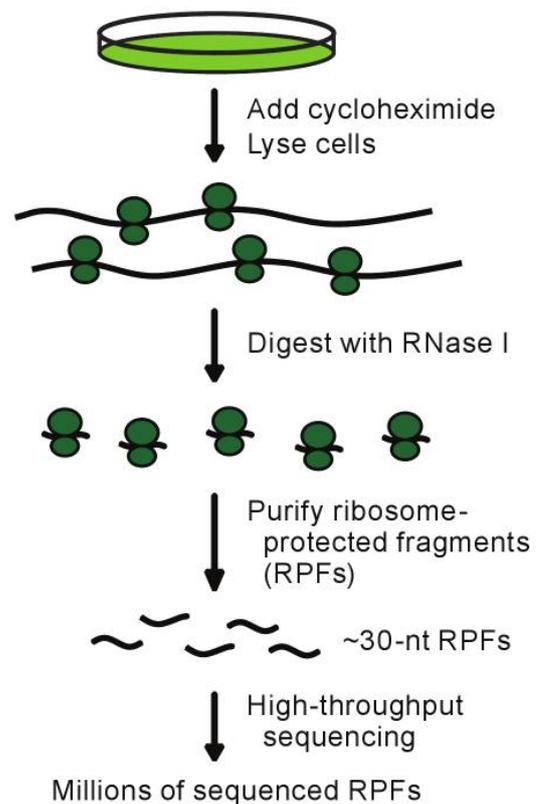
En forma resumida, la técnica consiste en la purificación de los pequeños fragmentos de ARNm que se encuentran protegidos por el ribosoma frente a la acción de ARNasas [90,91]. Para esto, se purifica el sobrenadante post-mitocondrial y se lo somete a una digestión controlada con ARNasas. Luego se purifican los monosomas, y a partir de los mismos se obtienen los fragmentos de ARNm que quedaron protegidos de la digestión por el ribosoma. De esta manera, al tener acceso a la identidad nucleotídica de dichos fragmentos, podemos conocer la ubicación en la que se encontraba un ribosoma sobre un ARNm. Así, mediante la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva a partir de dichos fragmentos, conocidos como huellas ribosomales, se puede tener acceso a millones de secuencias de 30 nucleótidos aproximadamente, que denotan las posiciones de los ribosomas que se encontraban realizando la síntesis proteica (ver Figura 6). Resultado de alinear dichas secuencias frente a la base de datos de ARNm correspondiente y calcular niveles de expresión a partir del conteo de secuencias alineadas, se pueden conocer los niveles estimativos de la traducción de cada ARNm.

Nuestro grupo en particular ha incursionado en el uso de esta tecnología en otros modelos celulares como *Trypanosoma cruzi* (ver manuscrito adjunto en el Anexo [17]), células madre de adipositos (manuscrito en preparación) y modelos tumorales [92], en los cuales no solo hemos evidenciado la mejora en los niveles de correlación en la expresión génica, sino que también se observó la importancia de la regulación traduccional en dichos modelos biológicos. En particular, el uso de la metodología en el modelo tumoral tuvo como objetivo conocer los blancos de regulación de PDCD4 en dicho modelo. En este trabajo se

obtuvo un amplio espectro de regulación traduccional por parte de PDCD4 de entre 400 y 500 mensajeros blanco [92]. Este resultado preliminar apoya el uso de la técnica como herramienta para responder la interrogante aquí planteada, de observar el efecto traduccional a cargo de PDCD4 en un modelo neuronal (ver más adelante Hipótesis de trabajo y Objetivos).

Hoy en día la técnica ha sido utilizada en diversos modelos de estudio biológicos, como levaduras [86], bacterias [94,95], células de mamíferos [93], células embrionarias [16], distintos tipo de parásitos [17,96,97] e incluso virus [98]. Este uso diverso y amplio a la vez, fundamenta su aplicación en nuevos modelos de estudios que busquen cuantificar niveles de expresión traduccional a escala ómica. Cabe mencionar que este tipo de metodología ha sido recientemente aplicado a modelos neuronales [99,100], en particular, en uno de ellos se utilizaron células PC12 como modelo celular neuronal [100].

El encare metodológico descrito por Ingolia y Weissman, y comentado anteriormente, no coincide en detalle con el encare llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo. Las diferencias son fundamentalmente dos: 1) En el protocolo de Ingolia y Weissman se realiza la digestión con



**Figura 6. Representación esquemática del protocolo de Ribosome Profiling.**

La figura muestra una representación esquemática y sencilla del protocolo de Ribosome Profiling, donde se resumen los principales puntos de la metodología.

Figura adaptada de Guo *et. al*, *Nature* (2010) [93].

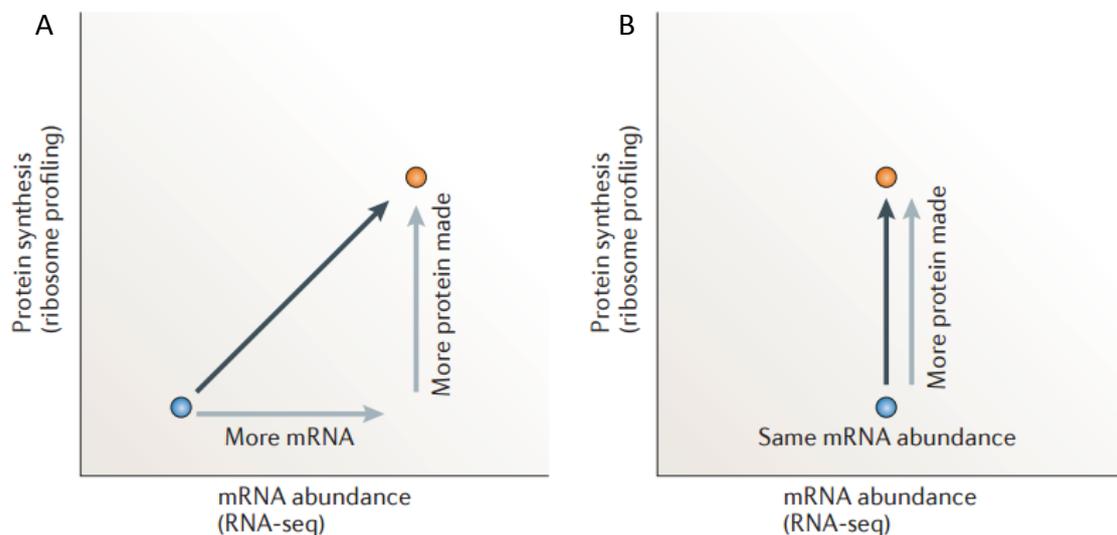
ARNasa sobre el sobrenadante post-mitocondrial y luego se purifican, ya sea por ultracentrifugación o mediante el uso de columnas comerciales, los monosomas. En nuestro caso, primero purificamos la fracción polisomal a partir del sobrenadante post-mitocondrial, mediante ultracentrifugación y sobre ésta realizamos la digestión. La purificación de la fracción polisomal se realiza en colchones de sacarosa, mediante ultracentrifugación en rotores de ángulo variable, como fuera descrito en [101]. 2) Los trabajos publicados por el grupo de Ingolia y Weissman utilizan, en el caso de modelos eucariotas, la RNasa I como enzima encargada de realizar la digestión, mientras que en nuestro caso utilizamos la enzima Benzonase.

Las anteriores diferencias tienen las siguientes razones: por un lado, la generación de las huellas ribosomales a partir de la fracción polisomal nos permite acercarnos mejor a la población de ribosomas activos, ya que al purificar huellas de monosomas de la fracción post-mitocondrial digerida con ARNasas, podemos obtener huellas provenientes de mensajeros cargados solamente con un ribosoma, que podría no ser funcional. Sin embargo evidencia reciente en levaduras apunta a que estos ARNm cargados con sólo un ribosoma podrían ser funcionales [102], aunque es un punto que se encuentra en discusión. De todas maneras, al obtener huellas a partir de polisomas, se puede tener mayor certeza de que cada huella corresponde a la posición de un ribosoma activo sobre un ARNm, ya que la fracción polisomal refleja de una mejor manera la totalidad del compartimento traduccional. Por otro lado, la elección de la enzima Benzonase como ARNasa es únicamente experimental, ya que esta enzima deja los extremos de los fragmentos que produce ya reparados y listos para los subsecuentes pasos en la producción de las bibliotecas de secuenciación. El uso de otras enzimas como la RNasa I implica tener que reparar los extremos de los fragmentos antes de continuar. En nuestro caso, al utilizar la enzima

Benzonase para realizar la digestión, una vez purificadas las huellas polisomales, éstas están listas para ser sometidas a los protocolos de generación de bibliotecas de secuenciación, sin mediar pasos previos.

En el contexto de la metodología descrita, Ingolia y colaboradores [86,90], describen un parámetro muy informativo sobre el grado de traducibilidad de un ARNm, llamado eficiencia traduccional. Este parámetro nos permite distinguir algunos fenómenos de regulación como la inducción transcripcional respecto de una inducción traduccional (ver Figura 7). En este ejemplo mostrado en la figura 7, un mensajero puede aumentar sus niveles traduccionales resultado de una inducción transcripcional (ver Figura 7A), ó aumentarlos debido exclusivamente a una inducción traduccional (ver Figura 7B). En el primer caso el ARNm no sufre un incremento en su eficiencia traduccional, mientras que en el segundo caso sí.

De esta manera, se deben analizar los valores de expresión traduccional en función de la



**Figura 7. Posibles modelos de regulación de la expresión génica que pueden ser detectados mediante *Ribosome Profiling*.**

La figura muestra dos posibles modelos de regulación de la expresión génica. Se muestra un caso de inducción transcripcional (A), y otro de inducción traduccional (B). Ambos casos, donde se observa un aumento en la expresión traduccional, se pueden distinguir considerando el parámetro de eficiencia traduccional. Figura adaptada de Ingolia, *Nat Rev Genet* (2014) [103].

expresión transcripcional, para así obtener un valor de traducibilidad o eficiencia traduccional para cada mensajero. En los datos, la eficiencia traduccional se calcula como el cociente entre el conteo de lecturas en el traductoma, sobre el conteo de lecturas en el transcriptoma. Es por esta razón que el protocolo de *Ribosome Profiling* implica realizar un control transcripcional mediante secuenciación del transcriptoma celular.

#### Modelos celulares para *Ribosome Profiling*

Una de las principales limitantes al momento de llevar a cabo la metodología de *Ribosome Profiling*, es la cantidad de células a utilizar, que debe ser un número alto para poder obtener cantidades adecuadas de huellas polisomales para su secuenciación. Por esta razón es que, hasta el momento, los trabajos donde se aplica esta metodología han utilizado líneas celulares creciendo *in vitro*. En el presente trabajo se decidió utilizar un modelo de diferenciación neuronal *in vitro*, utilizando cultivos de células PC12.

La línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de la médula adrenal de rata (*Rattus norvegicus*). En presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF por su sigla en inglés: *Nerve Growth Factor*) las células son capaces de diferenciar a neuronas [104], dado su origen embriológico como células neuroblásticas. También, frente a NGF, estas células responden desarrollando prolongaciones celulares (neuritas) que aumentan conforme avanza el tiempo de diferenciación. También cesan su actividad mitótica y pierden la capacidad de crecer adheridas al plástico y se adhieren mejor a superficies tratadas con colágeno [104]. Además se vuelven eléctricamente excitables y adquieren gradualmente características de neuronas simpáticas maduras [105].

Estas células son capaces de sintetizar y almacenar grandes cantidades de algunos neurotransmisores como la dopamina y norepinefrina, aunque no epinefrina [104]. El

tratamiento de las células PC12 con NGF no afecta los niveles de enzimas noradrenérgicas o de los neurotransmisores [104]. De hecho, el tratamiento con NGF estimula la síntesis proteica de grupos nuevos de proteínas, muchos de los cuales están probablemente relacionados a los procesos neuronales que se observan [104].

Además de las razones anteriores, otras características de las células PC12 han disparado su extenso uso en la investigación en neurobiología [106-108]. Entre dichas características destacamos: alto grado de diferenciación que se obtiene en presencia de NGF, una respuesta homogénea al estímulo, disponibles en gran número para diversos tipos de experimentos y adecuadas para experimentos de manipulación genética [105].

## II. 5 Antecedentes y resultados preliminares

Una de las líneas de investigación del Departamento de Genómica del que formo parte, refiere al estudio de la regulación traduccional tanto en modelos tumorales como neuronales. En este sentido, desde el desarrollo de mi tesis de grado [92], me he integrado a esta línea de investigación, en particular al estudio de la regulación traduccional ejercida por PDCD4 en modelos tumorales.

Al respecto, en estudios preliminares nuestro grupo ha interrogado mediante aproximaciones ómicas el efecto a nivel traduccional que ejerce el factor proteico PDCD4, en un modelo *in vitro* de cáncer de mama. En este modelo biológico se centró el desarrollo de mi tesis de grado, donde analicé datos generados anteriormente mediante la aplicación de la metodología de *Ribosome Profiling*. Las principales conclusiones obtenidas en dicha tesis fueron la capacidad de detectar el amplio efecto de regulación traduccional ejercido por dicho factor, así como la producción de listas con posibles blancos traduccionales. Estas listas fueron sometidas a análisis más detallados donde se revelaron nuevas funciones

controladas por PDCD4, en particular su posible rol en el control de la respuesta inmune mediada por interferón tipo I [109], función que fuera descrita posteriormente en la literatura [110].

Nos resultó interesante que en los estudios ontológicos de mi tesis de grado se encontraron entre los blancos de PDCD4 redes biológicas relacionadas al sistema nervioso. En este contexto, la presencia de estos posibles blancos traducionales descritos y/o asociados funcionalmente a modelos neuronales, junto con el interés del grupo en la regulación de la síntesis proteica en neuronas, resultaron una combinación de antecedentes atractiva para motivar la realización de la presente tesis. Esta motivación se vio también apoyada por resultados preliminares del grupo donde se constató un alto nivel de expresión proteica de PDCD4 en neuronas del sistema nervioso central y periférico de rata [85] (ver Figura 5). El escaso conocimiento respecto a nuevos reguladores proteicos de la traducción, particularmente en modelos neuronales, motiva también la presente propuesta, que busca comprender cuales funciones biológicas celulares se ven afectadas a nivel traduccional por PDCD4 en modelos neuronales.

### **III HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

#### **III. 1 Hipótesis de trabajo**

La hipótesis de trabajo en la que se basa la presente tesis es que PDCD4 es capaz de regular el inicio de la traducción de un grupo de ARNm particulares en células neuronales.

#### **III. 2 Objetivos Generales y Específicos**

El objetivo general de la presente tesis de maestría apunta a contribuir al entendimiento de los mecanismos de regulación traduccional en células neuronales.

En este contexto, los objetivos específicos son los siguientes:

- Establecer un modelo de silenciamiento inducible de la expresión de PDCD4 en un modelo neuronal celular.
- Estudiar el compartimento traduccional en presencia y ausencia (silenciamiento) de PDCD4 mediante *Ribosome Profiling* en dichas células neuronales.
- Obtener una lista de blancos traduccionales de PDCD4, mediante un análisis bioinformático de los datos producidos.
- Estudiar *in silico* las redes biológicas y procesos celulares representados por los posibles blancos traduccionales de PDCD4 encontrados.

## **IV MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV. 1 Estrategia experimental**

El enfoque estratégico de la presente tesis consistió básicamente en aplicar la técnica anteriormente descrita de *Ribosome Profiling* en células PC12 diferenciadas a neuronas, en presencia y ausencia de PDCD4. Resultado de aplicar dicha técnica y del análisis bioinformático de los datos obtenidos, se produjo una lista de posibles blancos traducionales. Esta lista es analizada en detalle para comprender las principales funciones biológicas representadas por los genes contenidos y así inferir las funciones biológicas reguladas traduccionalmente por PDCD4, en el modelo neuronal utilizado.

Puntualmente, una vez que se establecieron las condiciones adecuadas para el crecimiento y diferenciación de los cultivos celulares de PC12, se utilizaron vectores lentivirales comerciales con el objetivo de silenciar la expresión de PDCD4 en dichas células. Esto nos permitió generar una variante de la línea celular estable de PC12, capaz de silenciar PDCD4 de forma inducible.

A partir de dichas líneas celulares, en presencia y ausencia de PDCD4, se procedió a la cuantificación por secuenciación masiva de huellas polisomales, así como se estudiaron los controles de regulación transcripcional evaluados mediante las lecturas de ambos transcriptomas. El análisis de los datos mediante el uso de los programas adecuados (CLC Genomics [111], SAMtools [112], DESeq [113] y DESeq2 [114], scripts en python, bash, etc.), nos permitió obtener, no solo una visión global del traductoma y transcriptoma de las células, sino que también, resultado de la comparación entre las dos condiciones biológicas evaluadas, se pudieron obtener listas de posibles blancos traducionales de PDCD4 en

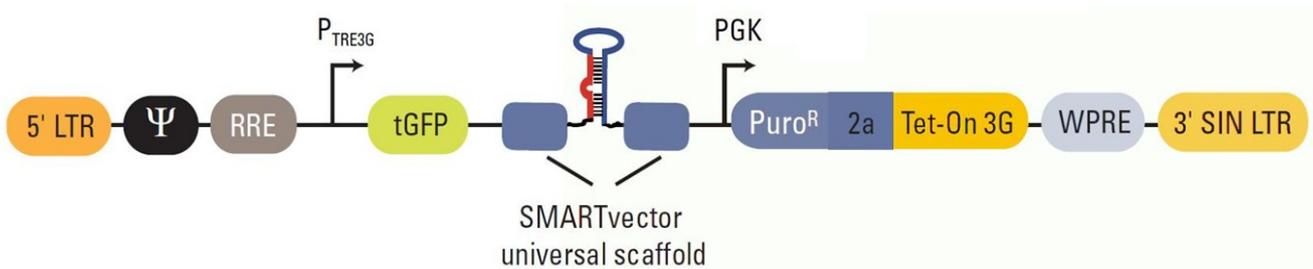
células neuronales. Dichas listas fueron estudiadas de forma ontológica (DAVID [115,116]) a los efectos de atribuirle a las mismas un significado biológico y así proponer el papel de PDCD4 como regulador de la traducción en un modelo neuronal.

#### IV. 2 Cultivos celulares de PC12

Los cultivos de células PC12, adquiridas comercialmente (ATCC CRL-1721), se realizaron sobre superficies de poliestireno tratadas para aumentar su adhesividad con colágeno comercial (ThermoFisher Scientific Cat. #A1048301) a razón de 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Las células se cultivaron en medio RPMI (ThermoFisher Scientific Cat. #31800022) suplementado con 10% de suero de caballo (ThermoFisher Scientific Cat. #26050088), 5% de suero fetal bovino (Capricorn Scientific Cat #FBS-11A) y los siguientes antibióticos: 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina y 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B (Sigma-Aldrich Cat #A5955). La diferenciación a células neuronales fue llevada a cabo removiendo los factores de crecimiento del medio de cultivo y utilizando solamente RPMI complementado con 100 ng/mL de NGF 2.5S (ThermoFisher Scientific Cat. #13257019). La diferenciación neuronal es alcanzada mediante 72 hs de incubación con NGF y es observada mediante cambios en la morfología celular que empiezan a manifestarse a partir de las 24-36 hs de tratamiento.

#### IV. 3 Transfección con vectores lentivirales

Se utilizaron vectores lentivirales comerciales ya empaquetados (ThermoScientific *SMARTchoice Inducible shRNA*) para transfectar los cultivos celulares de PC12, y lograr el silenciamiento inducible de PDCD4. Estos vectores luego de transfectar las células en cultivo, son capaces de integrar su genoma viral artificial, en el genoma celular. Este genoma artificial de las partículas lentivirales (ver Figura 8), contiene:



**Figura 8. Genoma viral de los vectores lentivirales (ThermoScientific SMARTchoice) utilizados.**

Se pueden observar los principales elementos del genoma viral artificial: 5'LTR: Largo Repetido Terminal al 5' necesario para su inserción en el genoma de la célula hospedera. P<sub>TRE3G</sub>: Promotor inducible por la presencia de la proteína Tet-On 3G y doxiciclina. tGFP: Proteína verde fluorescente, gen reportero. shARN contra el ARNm de PDCD4. PGK: promotor constitutivo de la FosfoGlicerol-Quinasa. Puro<sup>R</sup>: Gen de resistencia a la puromicina. Tet-On 3G: Codifica la proteína que en presencia de doxiciclina (agente inductor) activa el promotor P<sub>TRE3G</sub> y activan el silenciamiento.

- Una secuencia tipo shARN (secuencia del shARN contra el ARNm de PDCD4: 5'-CTTGTTAAAGAGATCGATA-3')
- Un sistema de expresión inducible Tet-On 3G: El genoma viral contiene un gen que se expresa constitutivamente y codifica para una proteína transactivadora dependiente de doxiciclina, que se denomina Tet-On 3G. Esta proteína, solamente en presencia de doxiciclina es capaz de unirse al promotor correspondiente y así activar la expresión del shARN.
- Un gen reportero, la proteína verde fluorescente (GFP), que también se expresa resultado de la inducción por doxiciclina.
- El gen de resistencia a puromicina (marcador de selección), bajo la expresión constitutiva de un promotor *housekeeping*, en nuestro caso, el promotor de PGK [117,118]. La presencia de este marcador permite seleccionar las células transfectadas por su habilidad adquirida de resistir al tratamiento con puromicina.
- 3' SIN LTR: En el extremo 3' del genoma se presentan una serie de repetidos largos terminales que se auto-inactivan. Esto asegura que las partículas lentivirales sean

incompetentes a la hora de replicar y le aportan un mayor grado de bioseguridad al sistema biológico.

Previo a realizar los experimentos de transfección se optimizaron los siguientes puntos:

- 1) Determinación del número de células a utilizar en la transfección;
- 2) Optimización de la composición del medio de transfección;
- 3) Optimización de la concentración de puromicina a utilizar para la selección de células transfectadas;
- 4) Optimización de la concentración de doxiciclina (factor de inducción del silenciamiento) a utilizar.

Todos los ensayos de optimización se realizaron cuantificando la viabilidad celular en triplicados biológicos utilizando placas de 96well y el kit comercial *MTT Cell Proliferation Assay* de ATCC (Cat. #30-1010K). Las diferencias significativas se evaluaron mediante ANOVA y posterior Test de Tuckey.

Una vez optimizados los puntos anteriores, se realizó el ensayo de transfección, siguiendo los protocolos comerciales, con las siguientes consideraciones:

1) Se sembraron 250.000 células en placas de 35 mm, permitiendo la adhesión celular al sustrato por 8hs, y se realizó la transfección en las condiciones optimizadas: RPMI suplementado con 2% de suero de caballo y 1% de suero fetal bovino.

2) Se utilizó un *MOI (Multiplicity Of Infection) = 7* (se trata de células difíciles de transfectar) ya sea para los vectores lentivirales con el shARN contra PDCD4 (de aquí en adelante: shPDCD4, con una carga viral original de  $3,70E+05$  TU/ $\mu$ L), como para el control con el shARN scrambled (de aquí en adelante: shScrambled, con una carga viral original de  $7,48E+05$  TU/ $\mu$ L). Luego de 20 hs de transfección se removió el medio y se agregó medio

completo por 24 hs. Posteriormente las células fueron seleccionadas con puromicina (5 µg/mL) durante 3 a 5 días, y luego se cultivaron en medio completo sin puromicina.

Ambas variantes de la línea celular PC12: PC12-shPDCD4 y PC12-shScrambled fueron cultivadas en paralelo, extremando los cuidados para evitar contaminación cruzada, y generando cantidades suficientes para producir viales para congelar.

#### IV. 4 Inmuno-fluorescencia, Microscopía Confocal y cuantificación de imágenes

Para cuantificar la expresión proteica de PDCD4 durante la diferenciación neuronal de PC12 y al inducir la expresión del shARN contra PDCD4, se utilizó inmunomicroscopía confocal. En ambos casos se utilizaron vidrios cubreobjetos de 22x22 mm tratados con colágeno, para células PC12 como fuera descrito, ó Matrigel (Sigma-Aldrich Cat #E1270) como matriz extracelular para células PC12 transfectadas. La fijación se realizó con paraformaldeído al 4% en buffer PHEM. Los sitios de reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos se bloquearon mediante incubación en buffer de bloqueo (Glicina 2%, BSA 3% en buffer PHEM). Se utilizó un anticuerpo primario policlonal comercial producido en conejo anti PDCD4 (Abcam ab51495, dilución 1/200). El anticuerpo secundario utilizado, también comercial (ThermoFisher Scientific Cat. #A-21429), fue anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 555 (dilución 1/1000). En los casos necesarios, se utilizó un marcador del citoesqueleto de actina (*Faloidina Alexa-633*, ThermoFisher Scientific Cat. #A22284, dilución 1/150). Los vidrios se montaron sobre un portaobjetos en una gota de *Prolong* con DAPI (ThermoFisher Scientific Cat. #P36962).

Todos los preparados fueron observados y fotografiados en el microscopio confocal institucional del IIBCE, modelo *Olympus FluoView 300*, utilizando el objetivo 60X (apertura numérica = 1,42). Dicho microscopio está equipado con 4 láseres: láser UV 405 nm, Argón

488 nm, Helio-Neón verde 543 nm y Helio-Neón rojo 633 nm. Para los casos en los que se realizó cuantificación comparativa entre distintas imágenes, se utilizó la misma intensidad en los fotomultiplicadores y en los láseres al momento de fotografiar los preparados.

Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el software libre *ImageJ* (*National Institute of Health*). En los casos correspondientes, las cuantificaciones de intensidad, normalizada por área, fueron evaluadas en búsqueda de diferencias significativas mediante Test de ANOVA y posterior Test de Tuckey.

#### IV. 5 PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación del grado de silenciamiento alcanzado por el sistema lentiviral, a nivel de transcripto (ARNm), fue evaluada mediante PCR semi-cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  [119].

Las distintas muestras de ARN, extraídas ya sea mediante Trizol (ThermoFisher Scientific Cat. #15596026) ó mediante kits comerciales (*mirVana Isolation Kit* – ThermoFisher Scientific Cat #AM1560), fueron siempre sometidas a un paso preliminar de tratamiento con ADNasa (ThermoFisher Scientific Cat #AM2238) para remover la contaminación de ADN genómico. Posteriormente el ARN fue purificado nuevamente mediante Trizol y luego se retrotranscribió a ADN copia (ADNc) mediante kit comercial (*SuperScript® II Reverse Transcriptase*; ThermoFisher Scientific Cat #18064022). La expresión relativa del ARNm de PDCD4 fue evaluada mediante el kit comercial *SYBR® Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific Cat #4309155) en el *Corbett Rotor-Gene 6000*, instrumento institucional del IIBCE. El uso de triplicados biológicos permitió estudiar diferencias significativas evaluadas mediante el Test de Student.

Condiciones de reacción de PCR: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C y 45 segundos a 60°C. *Melting* de 72°C a 90°C.

Secuencia de los *primers* utilizados:

PDCD4 (secuencias obtenidas de [120]):

*Forward*: 5'-TGAGCACGGAGATACGAACGA-3'

*Reverse*: 5'-GCTAAGGACACTGCCAACACG-3'

RPL29 (*gen housekeeping* [121]; secuencias obtenidas de [122]):

*Forward*: 5'-CAAGTCCAAGAACCACACCAC-3'

*Reverse*: 5'-GCAAAGCGCATGTTCTCAG-3'

#### IV. 6 Ribosome Profiling

A partir de  $8E+07$  células aproximadamente de cada condición (PC12-shPDCD4 y PC12-shScrambled) se procedió a realizar el protocolo de *Ribosome Profiling*, utilizando solamente una réplica biológica por condición. Para esto, a tiempo 0hs el medio fue removido, y se agregó RPMI sin factores de crecimiento, suplementado con NGF 2.5S 100 ng/mL y doxiciclina 500 ng/mL. Luego de 72 hs de incubación, cuando las células ya diferenciaron a neuronas y silenciaron la expresión de PDCD4 (ver Resultados más adelante), se las incubó por 1 hora en presencia de cicloheximida (de aquí en adelante: CHX; Sigma-Aldrich Cat #C7698) 100 mg/ $\mu$ L para detener la síntesis proteica. Inmediatamente después las células fueron transferidas en sus botellas de cultivo a hielo, el medio fue removido, se recolectaron las células mediante raspado mecánico (utilizando *scrapers*) y se realizó un lavado con PBS frío en presencia de CHX. Una alícuota de 50  $\mu$ L de células se separó para extracción de ARN mediante el kit de *mirVana Isolation Kit* (ThermoFisher Scientific Cat #AM1560) y posterior secuenciación del transcriptoma. El resto de las células fueron centrifugadas y lisadas en un

buffer de lisis que contiene: 5 mM Tris pH 7,5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 mM KCl y CHX 100 mg/μL. A partir de dicho lisado se obtuvo el sobrenadante post-mitocondrial que se cargó en un colchón de sacarosa 12% / 33,5% preparados en un buffer con 20 mM HEPES pH 7,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; CHX 100 mg/μL y 1 mM DTT. Estas preparaciones fueron ultracentrifugadas en rotor SW40 Ti a 35.000RPM durante 2:45hs a 4°C, en la ultracentrífuga Beckman L-100K clase S institucional del IIBCE. Finalizada la corrida el pellet polisomal se resuspendió en presencia de CHX y se digirió con Benzonase (Sigma-Aldrich Cat #E1014) por 10 minutos a temperatura ambiente. La digestión se detuvo con el agregado del buffer de lisis del kit de extracción de ARN de *mirVana* y se continuó con el protocolo de purificación de ARN. El ARN obtenido de las digestiones se precipitó mediante un protocolo especial, que utiliza una mayor concentración de alcohol para favorecer la precipitación de ácidos nucleicos pequeños, y se concentró posteriormente al resuspenderlo en un volumen pequeño.

Luego se procedió a la purificación de los fragmentos del tamaño esperado para las huellas polisomales (~30 nt), mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en presencia de urea 7M. En todos los casos, los geles fueron revelados con GelRed (Olerup SSP® GelRed™ Cat #39K) y escaneados de forma digital en el instrumento *FUJIFILM FLA-9000*, equipo institucional del IIBCE.

Es necesario mencionar que todo el material electroforético utilizado para ARN es descontaminado de ARNasas previamente tratándolo con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos y enjuagado posteriormente con agua miliQ tratada con DEPC (Sigma-Aldrich Cat #D5758).

En la corrida electroforética se utilizó como indicador de tamaño un marcador de ADN de 10 bp (ThermoFisher Scientific Cat #10821015) y dos oligos de ADN de 26 y 34 nt de largo,

que a pesar de que no migran igual que oligos de ARN (los oligos de ADN migran más rápido), nos aportaron un patrón limpio y fuerte, que se podía utilizar como referencia al momento de cortar las bandas del gel. El recorte de las bandas se realizó en un transiluminador UV y se purificó el ARN a partir del gel siguiendo el protocolo descrito por Ingolia y colaboradores [90]. Brevemente, dicho protocolo consta en dejar las bandas de gel recortadas en agitación circular *over night* en presencia de un buffer de extracción que contiene SDS, acetato de sodio y EDTA. Posteriormente el líquido se traspasa a un nuevo tubo y se precipita el ARN mediante el agregado de alcohol.

Los fragmentos de ARN purificados y concentrados se encuentran en condiciones de ser evaluados en cantidad, tamaño y calidad mediante electroforesis capilar de ácidos nucleicos, para proceder luego a su secuenciación masiva.

#### IV. 7 Electroforesis capilar de ácidos nucleicos

La tecnología del *2100 Agilent Bioanalyzer* disponible en el IIBCE fue utilizada para realizar las electroforesis capilares de ácidos nucleicos, fundamentalmente con los siguientes dos objetivos: Por un lado el *Agilent RNA 6000 Nano kit* (Agilent Technologies Cat #5067-1511) nos permitió evaluar la calidad y cantidad de las muestras de ARN total purificadas para la secuenciación de los transcriptomas. También nos aportó el valor RIN (por sus siglas en inglés: *RNA Integrity Number* [123-125]) de las muestras, el cual es un valor requerido a los efectos de calificar la muestra en distintos niveles de calidad. Por otro lado, el *Agilent Small RNA kit* mencionado más arriba, nos permitió resolver fragmentos pequeños de ARN como las huellas polisomales, para así conocer su tamaño y cantidad. Ambos factores son claves para evaluar los procedimientos hasta aquí realizados y definir los pasos a seguir.

Los dos kits fueron utilizados siguiendo los protocolos comerciales, utilizando muestras puras, o diluciones de las mismas, según correspondiera.

#### IV.8 Secuenciación Masiva

Tanto el par de muestras del transcriptoma, como el par de muestras de huellas polisomales, fueron secuenciados en servicios de secuenciación externos. En particular se optó por el servicio de BGI (*BGI Tech Solutions - Hong-Kong - Co., Limited*).

Las muestras de transcriptoma se secuenciaron bajo el protocolo de *RNA-Seq Quantification Library (Normal Library: 2-10 µg)*, donde se construyen bibliotecas *paired-end* (2x100 pb) a partir de ARN total seleccionado por poly(A)+ durante la preparación de la biblioteca. Para las muestras de huellas polisomales (traductomas) se utilizó el protocolo de *Small RNA Library (Low-Input Library: 0.2-1 µg)*, donde se realiza secuenciación *single-end*.

En nuestro caso se solicitaron 20 millones de lecturas para los transcriptomas y 40 millones para los traductomas debido al mayor grado de contaminación de la muestra (ver Resultados más adelante).

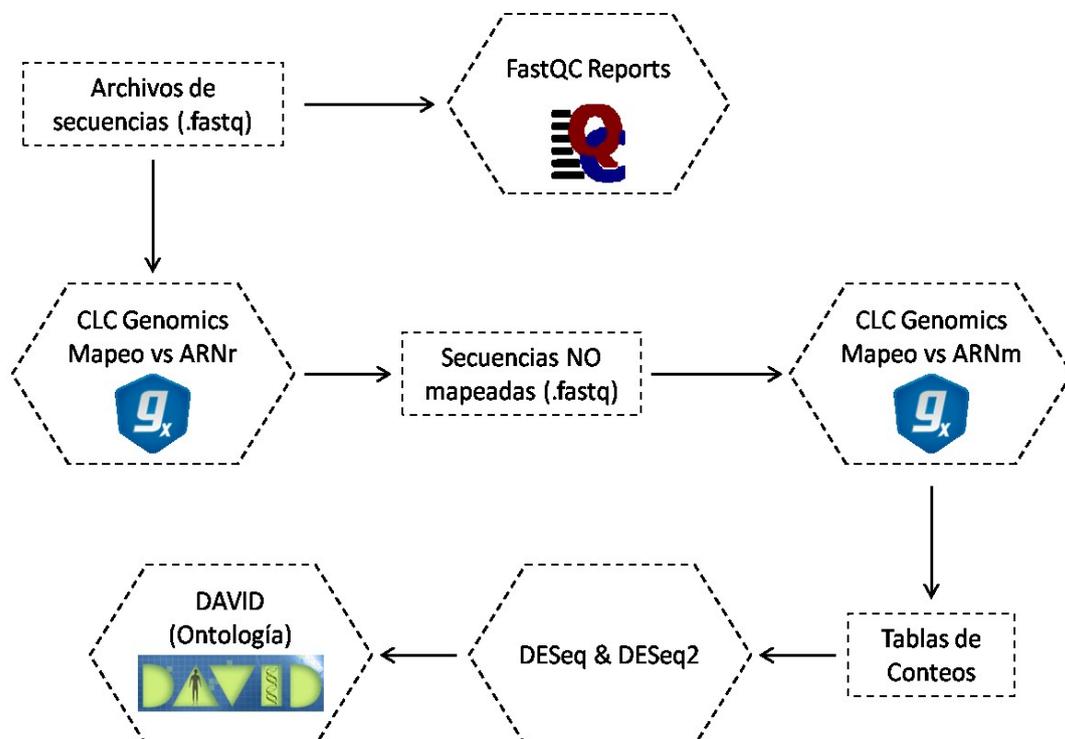
#### IV.9 Análisis de datos

Los archivos de secuencia .fastq luego de ser descargados del servidor de BGI, son analizados mediante el software *FastQC* [126] para estudiar la calidad de las secuencias contenidas en dichos archivos. Luego estos archivos fueron importados al software *CLC Genomics Workbench 6.5* [111], de cuya licencia disponemos en el Departamento de Genómica del IIBCE. En dicho software se realizaron los alineamientos y análisis primarios. Por un lado las muestras de transcriptoma fueron mapeadas directamente a la base de datos de ARNm codificantes para proteínas de rata (*Rattus norvegicus*), descargada del sitio ftp del

GenBank ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/R\\_norvegicus/mRNA\\_Prot/rat.1.rna.gbff.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/R_norvegicus/mRNA_Prot/rat.1.rna.gbff.gz)), y que contiene 17.691 secuencias de referencia.

Por su parte, las muestras correspondientes a los traductomas fueron primero mapeadas contra una base de datos exclusiva de ARN ribosomal (5 genes), para así eliminar las secuencias contaminantes. Luego, las secuencias que no mapearon, fueron alineadas frente a la misma referencia de ARNm utilizada para los transcriptomas (ver Figura 9).

Resultado de los alineamientos anteriores, se exportaron del *CLC Genomics* las tablas de conteo con los datos del número de lecturas mapeadas sobre cada transcripto. Dichos conteos fueron entonces normalizados mediante DESeq [113] y DESeq2 [114]. En ambos casos, tanto DESeq como DESeq2, consideran las dos condiciones biológicas presentadas como réplicas biológicas, ya que en el presente experimento no se cuenta con réplicas biológicas. Utilizando también estos paquetes se realizó la búsqueda de genes expresados



**Figura 9. Pipeline de análisis bioinformático de los datos.**

Se muestran los principales pasos del análisis bioinformático que se le realizó a los datos.

diferencialmente. Ambos paquetes estadísticos corren en R [127], y primero ejecutan la normalización de los datos y luego aplican modelos estadísticos para la búsqueda de genes expresados diferencialmente. Las tablas producidas por ambos programas fueron utilizadas para realizar los cálculos de eficiencia traduccional (expresión traduccional/expresión transcripcional) y para la producción de las listas de posibles blancos traduccionales de PDCD4 en neuronas. Estas listas de posibles blancos traduccionales fueron construidas según tres criterios no excluyentes: utilizando los datos de DESeq (*i*), DESeq2 (*ii*) y los valores de eficiencia traduccional (*iii*). Para los criterios *i* y *ii* las listas se construyeron con los transcriptos que presentaban un fold change traduccional mayor a 2 y un p-valor menor a 0,05. En el caso del criterio *iii*, se seleccionaron los transcriptos con un aumento en el valor de eficiencia traduccional mayor a 2 y con más de 50 lecturas normalizadas en el traductoma de la condición shPDCD4.

Estas listas fueron analizadas según su ontología génica, para conocer las funciones biológicas y procesos celulares representados por los ARNm contenidos, mediante el software libre DAVID [115-116], herramienta disponible *on line*. Dicha herramienta realiza tablas de contingencia de 2x2 para estudiar el enriquecimiento de cada función biológica, y asigna un valor estadístico a la observación realizada según el Test exacto de Fisher.

En particular, para el estudio de expresión de las distintas regiones de los ARNm (UTRs vs CDS) se exportaron los mapeos en formato .bam del *CLC Genomics*, se ordenaron mediante samtools sort, y se juntaron los dos mapeos de cada compartimento utilizando samtools merge. A partir de dichos mapeos convertidos a formato .sam (samtools view), se extrajo para cada lectura, la información acerca de sobre cuál ARNm había mapeado y en qué posición. Esta información es interrogada leyendo el archivo de anotación .gff de la referencia, mediante scripts de elaboración propia en python, para definir si la lectura

mapea en el 5'-UTR, en el CDS ó en el 3'-UTR. Luego de que se distinguen las lecturas según su región de mapeo sobre cada ARNm, el mismo archivo de anotación es consultado para conocer el largo de cada región, y así realizar los cálculos de expresión en términos de RPKM.

Todos los análisis bioinformáticos, incluyendo aquellos análisis que requirieron de la aplicación de *scripting* en bash, o pequeños scripts de elaboración propia escritos en lenguaje python, así como el uso de herramientas de análisis libres como SAMtools [112], bedtools [128], entre otros, fueron realizados en los servidores del Departamento de Genómica del IIBCE: *thor* y *torito*.

## **V    RESULTADOS**

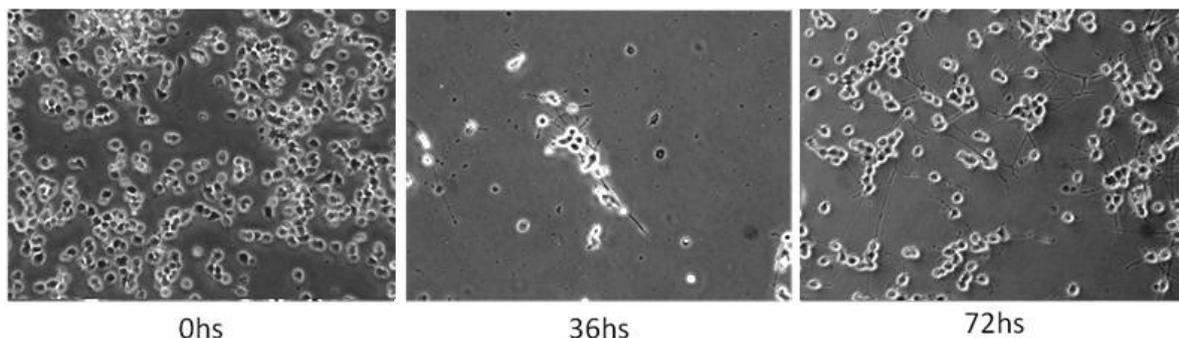
### **V.1    SILENCIAMIENTO DE PDCD4 EN CÉLULAS PC12**

#### **V.1.1    ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES DE PC12**

##### *V.1.1.a Optimización de las condiciones de cultivo*

En primer lugar se realizaron distintos ensayos para optimizar las condiciones de cultivo, crecimiento y diferenciación de las células PC12. En todos los casos las células se cultivaron como se indica en Materiales y Métodos, de acuerdo con Greene & Tischler, PNAS (1976) [104].

El primer ensayo realizado consistió en evaluar la concentración de NGF a utilizar para lograr la diferenciación neuronal, y la cantidad de colágeno por  $\text{cm}^2$  de superficie de crecimiento necesaria para lograr una mejor adhesión celular. Lo que se observó fue, por un lado, un crecimiento y una adhesión similar entre las placas con las distintas concentraciones de colágeno. Por el otro lado, parecía obtenerse un mayor grado de diferenciación (observado según los cambios morfológicos en las células) utilizando NGF a concentración de 100 ng/mL. De esta manera, se establece que cada  $\text{cm}^2$  de superficie de cultivo debe ser adherida con 8  $\mu\text{g}$  de colágeno tipo I proveniente de cola de rata y una concentración final de NGF, factor de diferenciación neuronal, de 100 ng/mL (ver Figura 10).



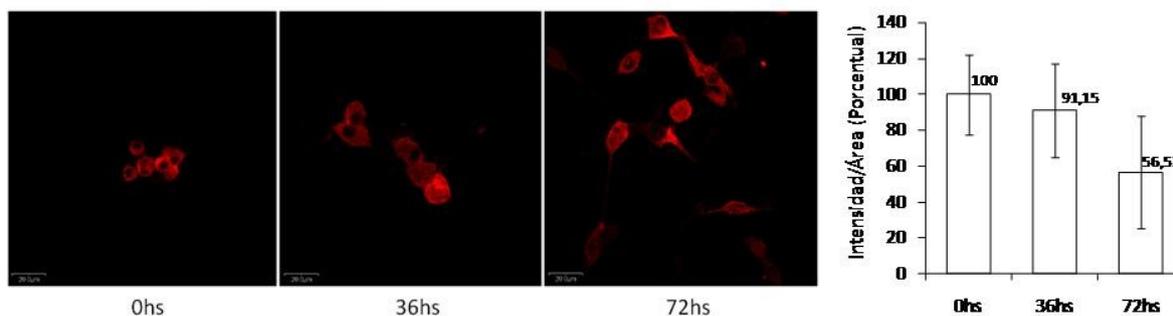
**Figura 10. Optimización de las condiciones de cultivo celular.**

En la figura se muestran, mediante imágenes de microscopía óptica – luz transmitida (10X), células PC12 creciendo en superficies tratadas con colágeno ( $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). La diferenciación neuronal es inducida por cambio en el medio de cultivo (RPMI): se remueven los factores de crecimiento y se suplementa con NGF 2.5S 100ng/mL.

#### V.1.1.b Seguimiento de la expresión de PDCD4 a lo largo de la diferenciación

Como primer punto a considerar y dada la ausencia de trabajos donde se estudie PDCD4 en células PC12, se realizó un seguimiento de la expresión proteica de PDCD4 a medida que avanzaba la diferenciación neuronal (0 hs, 36 hs y 72 hs), mediante inmuno-fluorescencia y microscopía confocal.

En la Figura 11 se muestran imágenes confocales obtenidas a una magnificación de 60X donde se observa en rojo la proteína PDCD4 a los distintos tiempos de diferenciación establecidos. Lo que se observa en la figura es que luego de 72 hs de diferenciación en presencia de NGF, las células PC12 mantienen un nivel de expresión proteico de PDCD4 considerable. Al cuantificar las imágenes se observa una disminución en el nivel de señal, respecto del tiempo 0 hs, cercana al 50% para las 72 hs. Este resultado es consistente con resultados obtenidos *in vitro* en nuestro laboratorio, donde hemos observado una caída en la señal de PDCD4 en neuronas embrionarias en cultivo en pleno desarrollo neurítico (tesis de Maestría de A. Di Paolo - en preparación). Esto indicaría la participación de PDCD4 en el



**Figura 11. Seguimiento de la expresión proteica de PDCD4 por inmunofluorescencia durante la diferenciación neuronal.**

Se muestran imágenes de microscopía confocal (60X) de células PC12 diferenciando a neuronas a distintos tiempos. En rojo se observa PDCD4. A la derecha se observan los niveles de expresión proteica de PDCD4 estimados por cuantificación de la señal correspondiente.

proceso de crecimiento neurítico, mayoritariamente activo en estas etapas (ver Resultados, sección 1.3).

### **V.1.2 GENERACIÓN DE UN MODELO *IN VITRO* CAPAZ DE SILENCIAR LA EXPRESIÓN DE PDCD4 DE MANERA INDUCIBLE**

Para estudiar los efectos traduccionales asociados a una reducción de PDCD4, nos propusimos generar una línea celular capaz de silenciar la proteína en forma inducible. Para lograrlo, se utilizaron vectores lentivirales comerciales (descritos en Materiales y Métodos) que contienen una secuencia shRNA dirigida contra el ARNm de PDCD4.

#### *V.1.2.a Optimización de las condiciones de transfección*

A pesar de contar con un detallado protocolo aportado por la compañía *ThermoScientific*, de la cual se adquirieron los vectores lentivirales, al tratarse de una línea

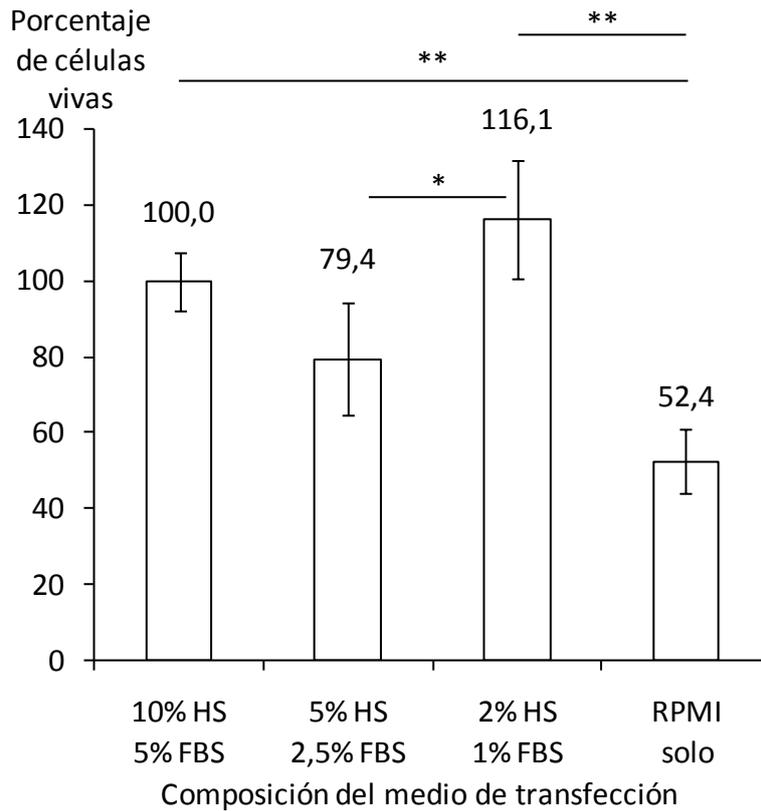
celular no convencional, existen varios ajustes metodológicos que deben realizarse para optimizar la transfección y así asegurar el mejor nivel de silenciamiento posible.

De esta manera se ajustaron los siguientes puntos:

- Número de células a utilizar en la transfección: se debe trabajar a una confluencia cercana al 40% para permitir que las células crezcan y se repliquen con espacio suficiente;
- Composición del medio de transfección: los factores proteicos presentes en los sueros que suplementan el medio de cultivo suelen interferir con el ensayo de transfección;
- Concentración del marcador de selección (puromicina): debe utilizarse a la mínima concentración necesaria para eliminar las células no transfectadas;
- Concentración del agente inductor (doxiciclina): dado que la doxiciclina puede interferir en la viabilidad de algunos tipos celulares, debe utilizarse la mayor concentración que no interfiera con la viabilidad del tipo celular aquí utilizado.

De esta manera, resultado de optimizar los puntos anteriores como se describió en Materiales y Métodos, las condiciones óptimas para la realización del ensayo de transfección fueron las siguientes: se utilizará una siembra de 250.000 células sobre placas de cultivo de 35 mm para alcanzar el 40% de confluencia (resultados no mostrados). La composición del medio de transfección será medio RPMI suplementado con 2% de suero de caballo y 1% de suero fetal bovino (ver Figura 12). La concentración de puromicina a utilizar para la selección de células transfectadas será de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ver Figura 13), mientras que la concentración de doxiciclina a utilizar para inducir el silenciamiento será de 500  $\text{ng}/\text{mL}$  (ver Figura 13).

Una vez optimizados y ajustados todos los pasos del protocolo se procede a realizar el experimento de transfección propiamente dicho, descrito en detalle en Materiales y Métodos.

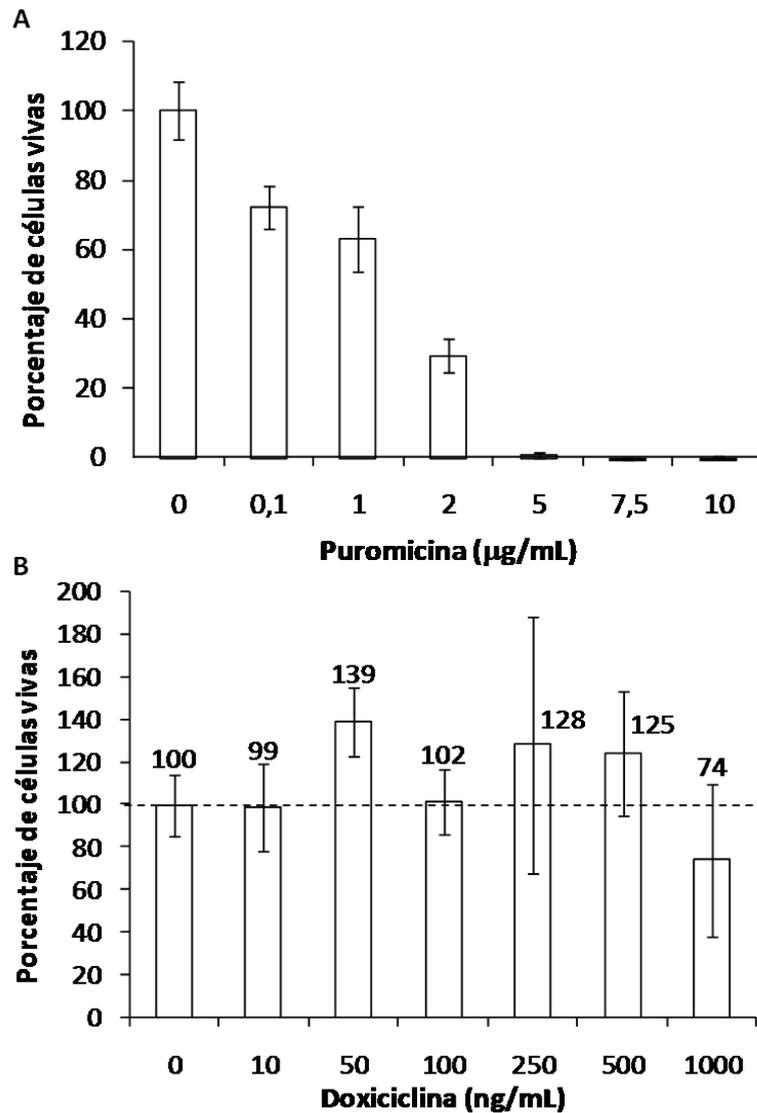


**Figura 12. Optimización de la composición del medio de transfección.**

Se realizó el ensayo de viabilidad celular (*MTT Cell Proliferation Assay – ATCC*) sobre triplicados biológicos de células PC12 cultivadas por 20 hs en medios de cultivo (RPMI) con concentraciones descendientes de suero de caballo (HS) y fetal bovino (FBS). La viabilidad de las células cultivadas en medio completo (10% HS y 5% FBS) es considerada el 100%. (\*\*) indica p-valor < 0,01 y (\*) p-valor < 0,05; estimados por Test de Tuckey posterior a Test de ANOVA.

De esta manera, hemos generado dos variantes de la línea celular PC12, una de las cuales es capaz de inhibir de manera inducible la expresión de PDCD4 y su control correspondiente que ante la presencia del agente inductor no genera ningún silenciamiento sobre PDCD4 (referidas de aquí en más como **PC12-shPDCD4** y **PC12-shScrambled**, respectivamente).

Es necesario mencionar que resultado de la transfección, se observó que las células transfectadas pierden adherencia a la matriz extracelular que se utilizaba. Por esto, luego de probar distintas concentraciones de colágeno mayores a la utilizada hasta el momento, se observó que una concentración de  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de colágeno era suficiente para recuperar un



**Figura 13. Optimización de las concentraciones de puromicina y doxiciclina.** Se determinó la mínima concentración de puromicina (**A**) que mata todas las células (5 µg/mL); y la máxima concentración de doxiciclina (**B**) que no interfiere en la viabilidad celular (500 ng/mL), utilizando el ensayo de viabilidad celular (*MTT Cell Proliferation Assay – ATCC*) sobre triplicados biológicos de células PC12, tratadas durante 72 hs con ambas drogas.

nivel de adherencia celular aceptable (resultados no mostrados) para el crecimiento de cultivos celulares de PC12-shPDCD4 y PC12-shScrambled.

*V.1.2.b Evaluación del silenciamiento de PDCD4 a nivel de transcripto y proteico*

Establecidas las líneas celulares PC12-shPDCD4 y PC12-shScrambled, se procedió a comprobar el silenciamiento inducido de PDCD4 tanto a nivel de transcripto, mediante PCR

semi-cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), como a nivel proteico, mediante cuantificación de imágenes de inmuno-fluorescencia observadas por microscopia confocal.

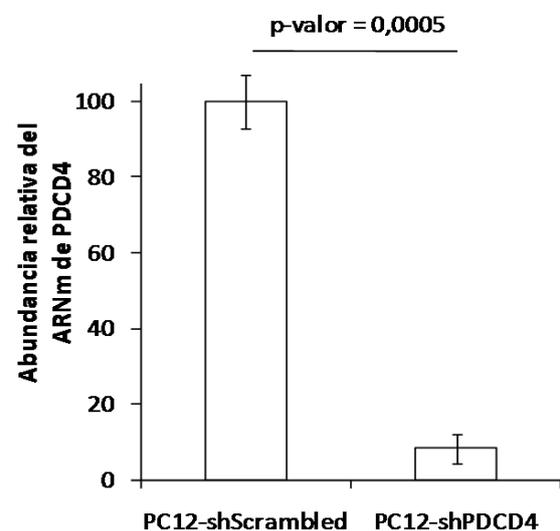
En primer lugar, la verificación del silenciamiento de PDCD4 fue evaluada a nivel de transcripto, cuantificando de forma relativa la cantidad del ARNm de PDCD4 luego de inducir el silenciamiento por 72 hs mediante PCR semi-cuantitativa en tiempo real.

Cabe mencionar que tanto los *primers* para PDCD4, como para el gen *housekeeping* RPL29 (ver más arriba), fueron testeados previamente para descartar la formación de dímeros de *primers*, calcular la eficiencia de los mismos y también asegurar la presencia de un producto de amplificación único, mediante

PCR a tiempo final y revelado del mismo en gel de acrilamida 6% (resultados no mostrados).

Los resultados de la cuantificación relativa se muestran en la Figura 14. Los niveles del ARNm de PDCD4 se reducen significativamente más de 10 veces (de 100% a 8,36% en términos relativos, test de Student p-valor = 0,0005). Con esto, se puede asegurar que el sistema de inducción del silenciamiento de PDCD4 por shARN, a nivel de ARNm, está funcionando en forma correcta, al igual que sus controles correspondientes.

En segundo lugar, el silenciamiento a nivel proteico de PDCD4 fue comprobado por

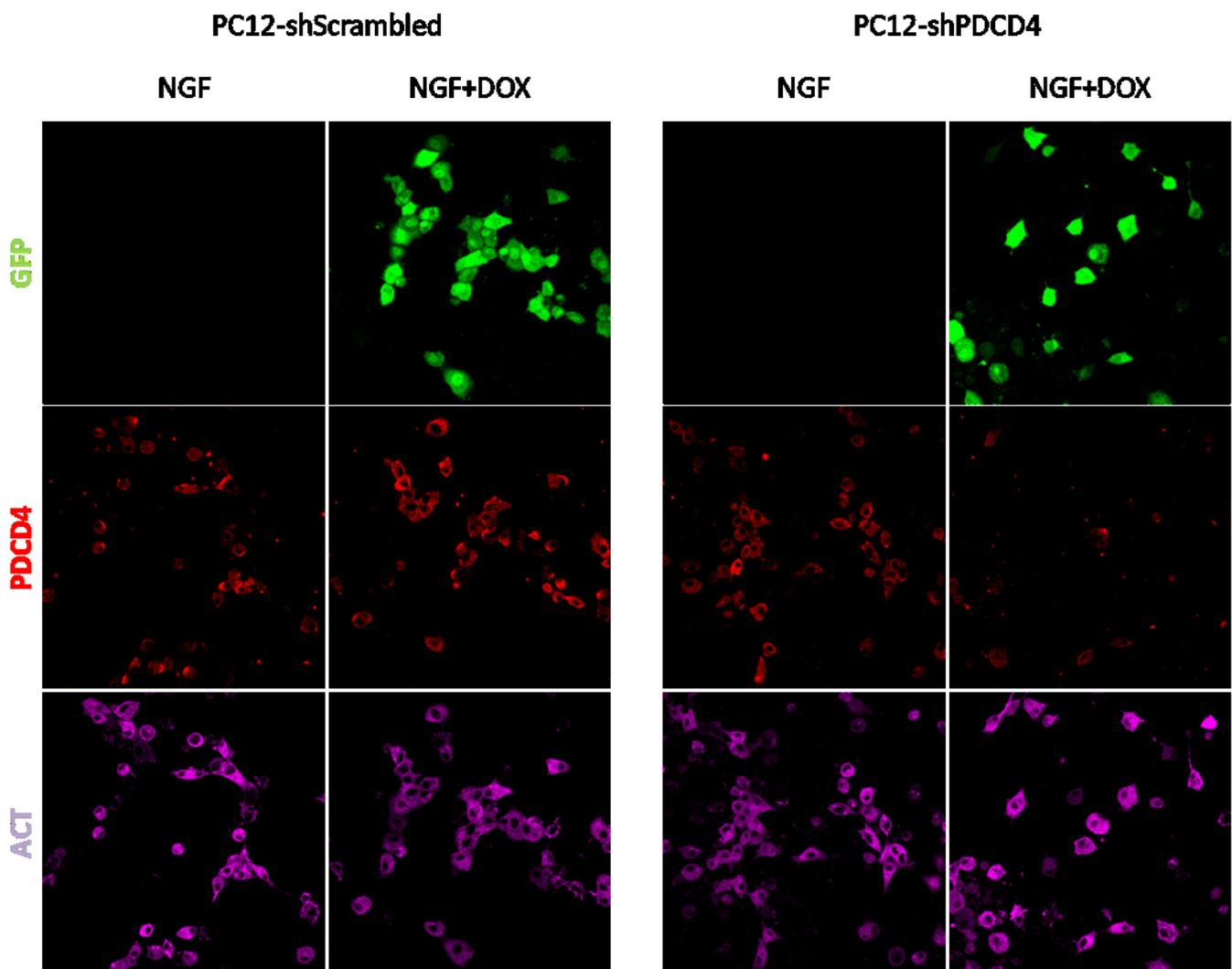


**Figura 14. Cuantificación del silenciamiento de PDCD4 a nivel de transcripto mediante qRT-PCR.**

Triplicados biológicos de cultivos celulares de PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4, luego de 72 hs de diferenciación neuronal e inducción del silenciamiento, fueron sometidos a extracción de ARN, tratamiento con ADNasa, y cuantificación relativa del ARNm de PDCD4 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados muestran la caída en la abundancia relativa de dicho ARNm en células PC12-shPDCD4, la cual es estadísticamente significativa según el Test de Student.

inmuno-fluorescencia, microscopía confocal y cuantificación de imágenes. Las fotografías observadas en la Figura 15 muestran imágenes representativas de preparados de las dos variantes de células PC12 utilizadas (PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4), donde se observa la expresión de GFP, PDCD4 y el citoesqueleto de actina.

Como era de esperar (ver Figura 15), la presencia de GFP (verde), está asociada a la presencia del inductor del silenciamiento (DOX: doxiciclina), para cualquiera de los dos tipos



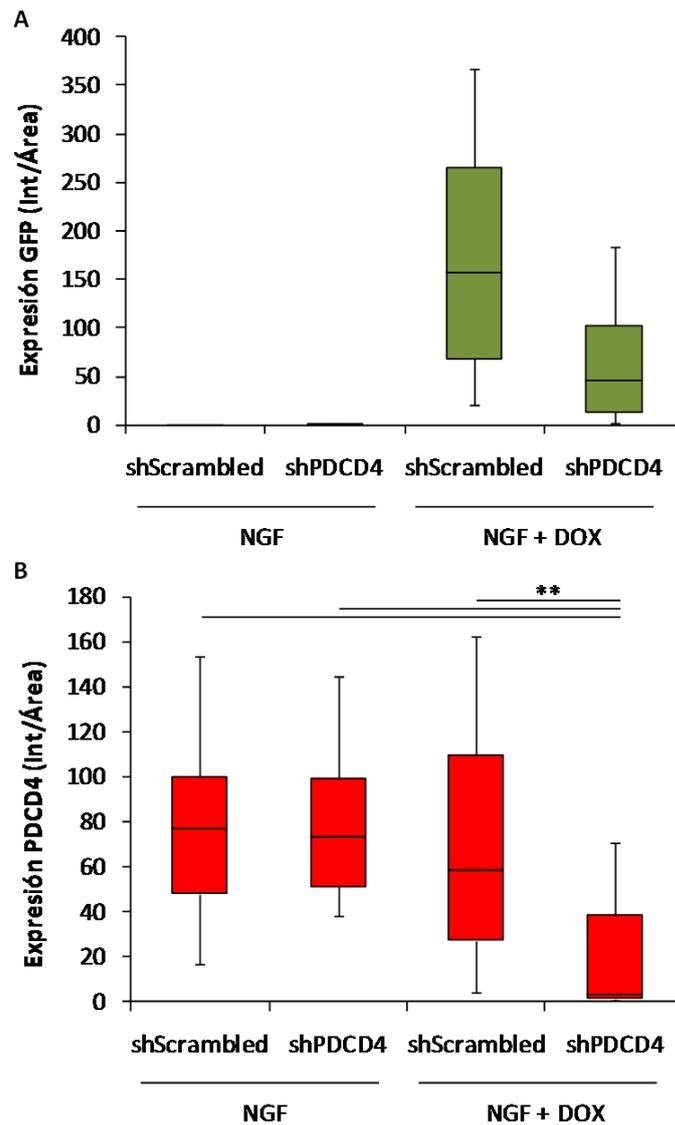
**Figura 15. Inducción del sistema de silenciamiento y expresión de GFP visualizado por inmuno-fluorescencia y microscopía confocal.**

Células PC12-shScrambled (izquierda) y PC12-shPDCD4 (derecha), fueron sometidas al protocolo de inmuno-fluorescencia luego de 72 hs de incubación sólo con NGF ó con NGF y DOX simultáneamente. En verde se muestra GFP, en rojo PDCD4 y en magenta el citoesqueleto de actina.

celulares. Por su parte la expresión de PDCD4 (rojo), se observa para las células PC12-shScrambled inducido o no el silenciamiento. Mientras que para las células PC12-shPDCD4, PDCD4 sí se detecta en condiciones de sólo diferenciación, mientras que no se observan niveles similares al inducir el silenciamiento (NGF+DOX). En último lugar, observar el citoesqueleto de actina mediante el marcaje con faloidina (magenta), permite apreciar el efecto del NGF y evidenciar la diferenciación neuronal morfológicamente.

Resultado de cuantificar la señal de cada color asociada a la expresión de PDCD4 y GFP en los distintos preparados, utilizando el software *ImageJ* (NIH), se puede observar el comportamiento celular de manera poblacional (ver Figura 16). Al graficar los resultados de la cuantificación, se observa de forma clara como la expresión de GFP está sujeta a la presencia de doxiciclina y la consecuente activación del genoma viral insertado en las células huésped (ver Figura 16A). En la figura también se puede observar que los niveles de expresión de GFP varían entre los dos tipos celulares. Este fenómeno puede explicarse considerando diferencias puntuales en la inducción de uno u otro sistema de silenciamiento ó por una mayor eficiencia de transfección causada por un uso mayor de partículas virales al momento de realizar la propia transfección (posibles errores de pipeteo ya que se trabajó con volúmenes de partículas virales muy pequeños).

Por su parte, las gráficas de la cuantificación de la expresión de PDCD4 (ver Figura 16B), muestran claramente niveles comparables excepto para las células PC12-shPDCD4 en presencia de NGF y doxiciclina. A los efectos de evaluar el grado de silenciamiento, si se comparan las medianas de los valores de expresión de PDCD4 para las células PC12-shPDCD4, en ausencia y presencia de doxiciclina, se observa una caída significativa estadísticamente de 25 veces: 73,59 a 2,96 respectivamente, en unidades de intensidad/área ( $p$ -valor  $< 0,01$ ; test de ANOVA y posterior Test de Tuckey). Si se compara



**Figura 16. Cuantificación de la expresión de GFP y PDCD4 tras inducir el silenciamiento.**

Imágenes tipo las mostradas en la Figura 15 fueron cuantificadas mediante *ImageJ*, para obtener los niveles de expresión de GFP **(A)** y PDCD4 **(B)** en las dos líneas celulares: PC12-shPDCD4 (shPDCD4) y PC12-shScrambled (shScrambled). Los valores de intensidad se normalizaron por el área, y se muestran como box plots. Las diferencias estadísticas resultan de aplicar primero un test de ANOVA, y posteriormente el Test de Tuckey corregido por Bonferroni.

n > 100; siendo n número de células cuantificadas.

(\*\*): p-valor menor a 0,01

DOX: doxicilina.

entre células PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4 sometidas ambas a diferenciación y silenciamiento, las diferencias (también significativas estadísticamente) se aproximan a un factor de 20: 58,34 y 2,96 respectivamente, en unidades de intensidad/área, (p-valor < 0,01;

test de ANOVA y posterior Test de Tuckey). Esto indica que el sistema de silenciamiento inducible está funcionando de manera satisfactoria a nivel proteico.

A modo de resumen, se puede decir que hemos establecido dos variantes de la línea celular PC12, las cuales difieren con la línea original en que presentan en su genoma un vector viral en particular. Este vector viral les otorga resistencia a la puromicina y les permite expresar de forma inducible, tanto GFP como un shARN. En un caso dicho shARN silencia la expresión de PDCD4 tanto a nivel de transcripto como proteico (PC12-shPDCD4). En el otro caso (PC12-shScrambled), el shARN está diseñado de manera aleatoria y no reconoce ninguna secuencia, por lo que no produce ningún efecto en la expresión de PDCD4.

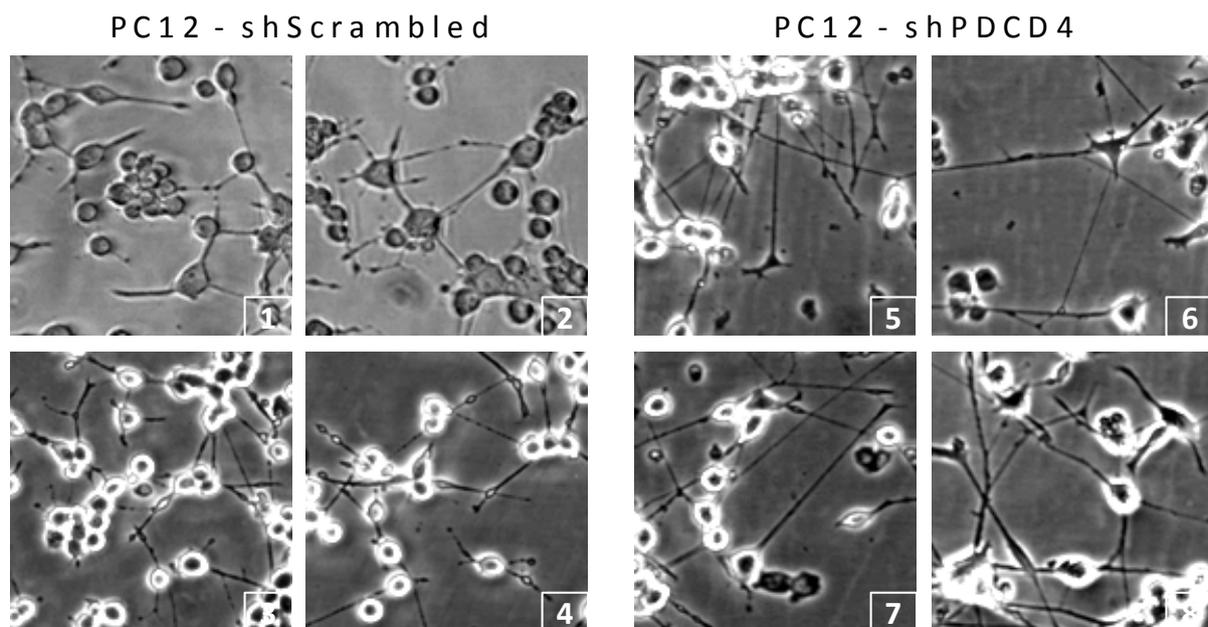
### **V.1.3 EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE PDCD4 EN EL LARGO DE LAS NEURITAS DE PC12 DIFERENCIADAS**

Un punto de análisis que llamó nuestra atención luego de haber establecido el modelo celular a utilizar, fue estudiar si existían cambios fenotípicos al silenciar PDCD4 en las células PC12 diferenciadas a neuronas. En particular, se estudió como cambiaba el largo de las neuritas que desarrollaban las células PC12 al diferenciarse, en presencia y ausencia de PDCD4.

En este caso, primero se silenció por completo la expresión de PDCD4 y luego inducimos la diferenciación neuronal manteniendo el silenciamiento. De esta manera aseguramos que al momento en el que se inicia la diferenciación neuronal y la proyección de neuritas, la célula no cuenta con PDCD4.

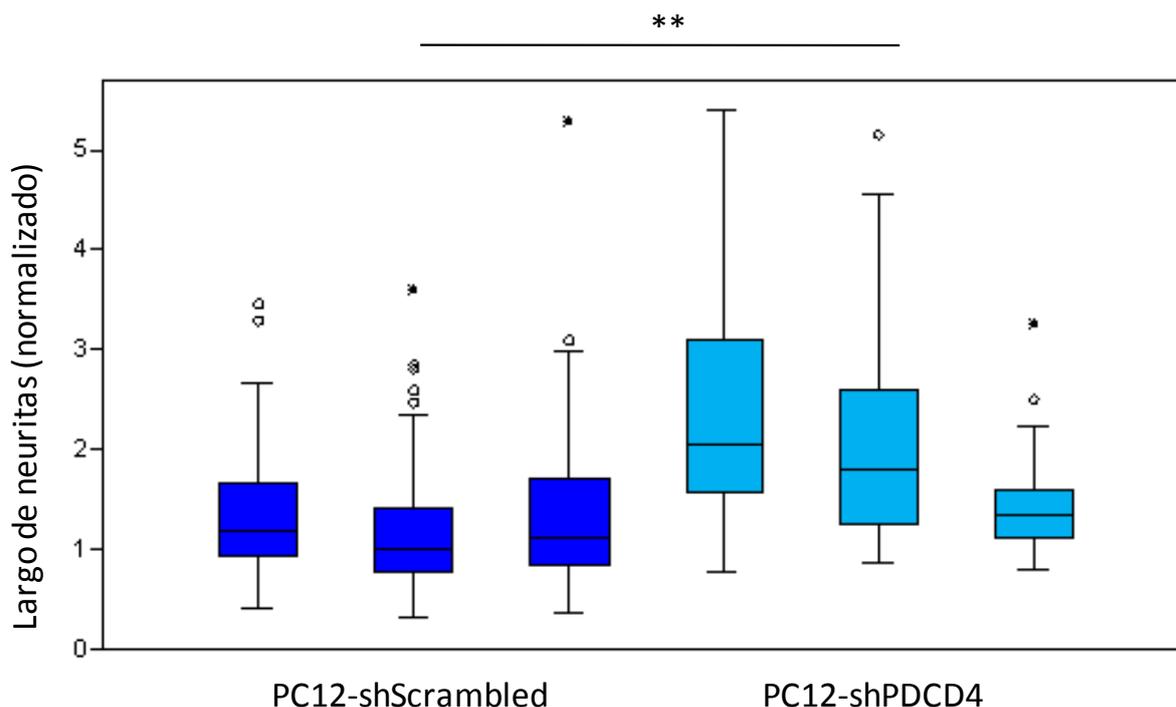
En la Figura 17 pueden observarse distintos campos de células PC12-shPDCD4 y PC12-shScrambled correspondientes al experimento realizado. En la figura se puede apreciar el efecto que tiene el silenciamiento de PDCD4 sobre las células PC12 diferenciadas. La ausencia de PDCD4 determina que las neuritas proyectadas por las células PC12 diferenciadas sean de mayor extensión respecto de las células control. Al cuantificar el largo de las neuritas (un total de aproximadamente 350 neuritas fueron cuantificadas en 3 réplicas biológicas independientes para cada condición) se observa un incremento promedial de 60% ausencia de PDCD4,  $p$  valor  $< 0,01$  según test de ANOVA (ver Figura 18).

Este resultado está en línea con otros resultados que hemos obtenido en nuestro grupo



**Figura 17. Crecimiento neurítico en células PC12 diferenciadas a neuronas en presencia y ausencia de PDCD4.**

En la figura se muestran distintos campos visuales de células PC12-shScrambled (izquierda; 1 a 4) y PC12-shPDCD4 (derecha; 5 a 8) observadas por luz transmitida en microscopio invertido. Ambos tipos celulares fueron sometidos a 72 hs de tratamiento con 500 ng/mL de doxiciclina para inducir el silenciamiento, y posteriormente a otras 72 hs de diferenciación neuronal en presencia de 100 ng/mL de NGF. Puede observarse como las neuritas de las células PC12-shPDCD4, que no expresan PDCD4, presentan un largo mayor que las células control PC12-shScrambled.



**Figura 18. Cuantificación del largo de las proyecciones neuríticas en células PC12 en presencia y ausencia de PDCD4.**

El largo de las neuritas de células PC12 diferenciadas a neuronas en presencia y ausencia de PDCD4 (izquierda -azul oscuro- y derecha -celeste-, respectivamente), fue cuantificado mediante el software *ImageJ*. La figura muestra la distribución de dichos valores, mediante box plots, para cada triplicado biológico de ambas condiciones. Las muestras presentan diferencias significativas según test de ANOVA, p-valor < 0,01.

de trabajo, como se comentaba anteriormente (ver página 42), en donde se plantea que PDCD4 presenta un rol clave en la regulación del crecimiento de las proyecciones neuríticas (ver Discusión, sección VI. 5).

## **V.2 RIBOSOME PROFILING EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PDCD4**

### **V.2.1 PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE RIBOSOME PROFILING EN EL MODELO**

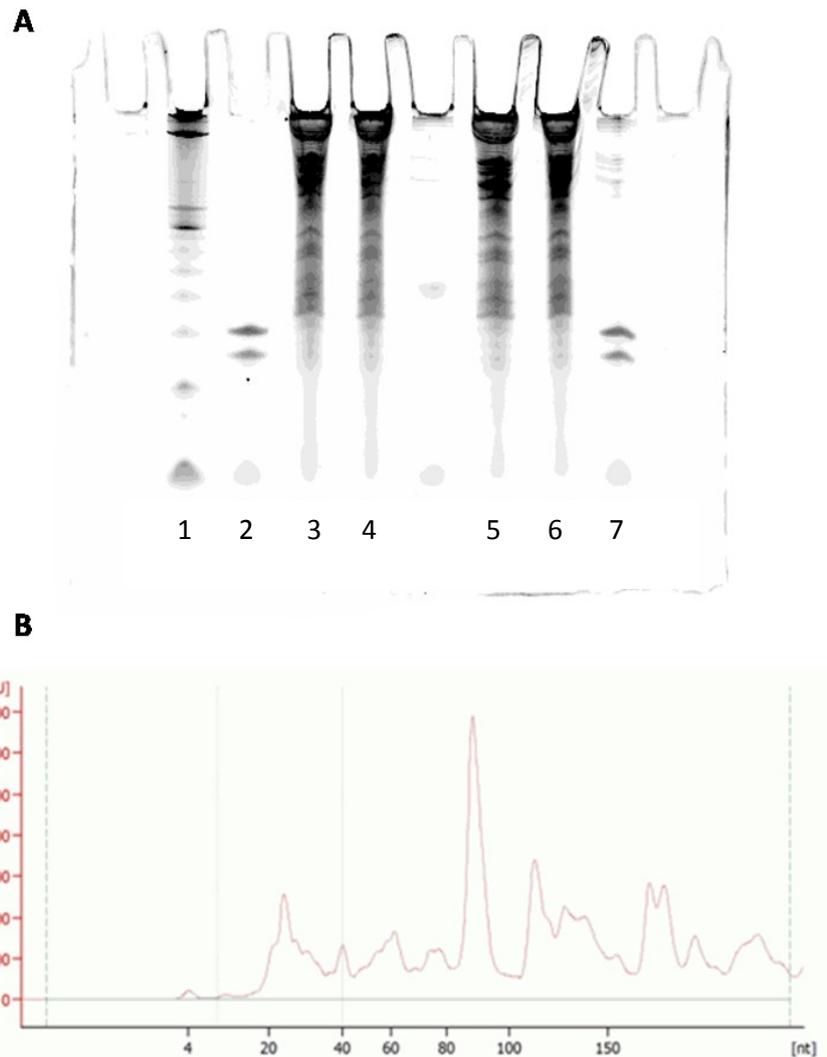
#### **CELULAR GENERADO**

En la introducción se describieron en forma breve los principales puntos de la metodología de *Ribosome Profiling* (ver Figura 6), y en Materiales y Métodos (ver sección IV. 6) se puede encontrar una descripción más detallada de los distintos pasos del protocolo. De todas maneras, la realización de la técnica por primera vez en diferentes modelos implica la puesta a punto de distintos pasos del protocolo que incluyen por ejemplo número de células de partida, la purificación de las huellas polisomales por corrida electroforética y la extracción de ARNs pequeños de la banda recortada del gel de poliacrilamida.

En primer lugar, la cantidad de células utilizada por experimento es un factor clave ya que determina el rendimiento de la técnica en el sentido de que define la cantidad final que se obtiene de huellas polisomales. Mediante el análisis del rendimiento de huellas polisomales obtenidas en función de la cantidad inicial de células utilizadas, se definió que aproximadamente 80 millones de células era una cantidad adecuada, en base a resultados propios (resultados no mostrados).

Respecto a la purificación de las huellas polisomales, hubo dos puntos claves que hubo que poner a punto. En primer lugar la separación de las huellas respecto de la digestión del pellet polisomal con la ARNasa, la cual se realiza mediante corrida electroforética. En segundo lugar, la purificación del ARN contenido en la banda asignada a las huellas polisomales, a partir del gel de poliacrilamida.

Para determinar la movilidad electroforética de la banda correspondiente a las huellas polisomales, relativa a marcadores simple hebra de ADN (más duraderos y menos costosos), se analizaron varias digestiones polisomales en gels desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% (ver Materiales y Métodos, y Figura 19). En la figura se puede apreciar la diversa composición y complejidad de tamaños que presenta la digestión del pellet polisomal. Luego



**Figura 19. Perfil de digestión de la fracción polisomal.**

**(A)** Se muestra una imagen digital del escaneo de una corrida en gel PAGE 15% con urea 7M en buffer TBE, revelada con GelRed. Los carriles señalados son:

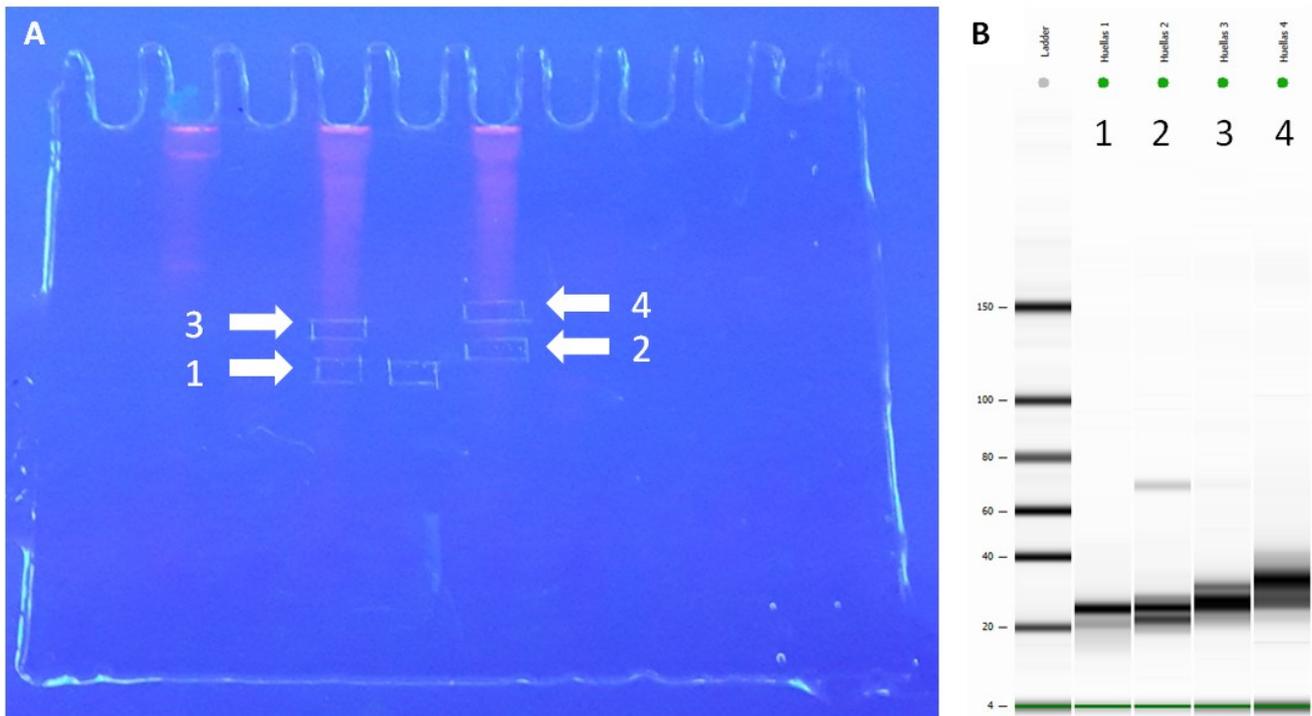
1 – marcador de ADN 10bp; 2 y 7 – oligos de ADN simple hebra de 26 y 34 nt de largo; 3-6 – digestiones del pellet polisomal.

**(B)** La misma muestra sembrada en los carriles 3-6, se siembra en un chip de *small ARN* de *Bioanalyzer*. Se muestra el electroferograma generado por el instrumento donde se puede observar la complejidad de la muestra en cuanto a tamaños: el eje horizontal describe el tamaño de los fragmentos, en nucleótidos.

se purificaron y analizaron varias bandas a distintas alturas de migración, por electroforesis capilar de ácidos nucleicos (ver Figura 20). A pesar de observarse una distribución de tamaños que puede abarcar hasta 20 nt, cada banda suele mostrar entre uno y tres picos específicos de tamaños enriquecidos principalmente. De esta manera se pudo asignar un rango de tamaño de ARN específico a cada banda recortada y relativo a los marcadores de peso molecular de ADN simple hebra utilizados. Este mecanismo fue el que se utilizó regularmente para obtener huellas polisomales en cantidad y pureza adecuada para preparar bibliotecas de secuenciación (ver Figura 21).

La información de concentración mostrada en la Figura 21 es también de gran importancia para definir la cantidad de ARN y así el rendimiento obtenido para las huellas polisomales. La cantidad es lo que define si se puede continuar con la construcción de las bibliotecas de secuenciación, o si en caso contrario, nuestra muestra no llega al mínimo necesario (50 ng).

El otro punto que fue necesario optimizar respecta al protocolo específico de extracción de ARN de la banda recortada. Este protocolo fue siendo optimizado a medida que se ensayaban distintos recortes de bandas como se mencionó en el punto anterior. En particular, en nuestro caso se testeó tanto el funcionamiento de un kit comercial para la purificación de fragmentos de ARN pequeños de geles de poliacrilamida (Zymo Research Cat #R1070), como la performance del protocolo publicado por Ingolia y colaboradores [90]. Lo que se observó fue que este último permitía recuperar mayores cantidades de ARN que el kit comercial (resultados no mostrados). De esta manera, se decidió continuar utilizando dicho protocolo para la extracción de ARN.

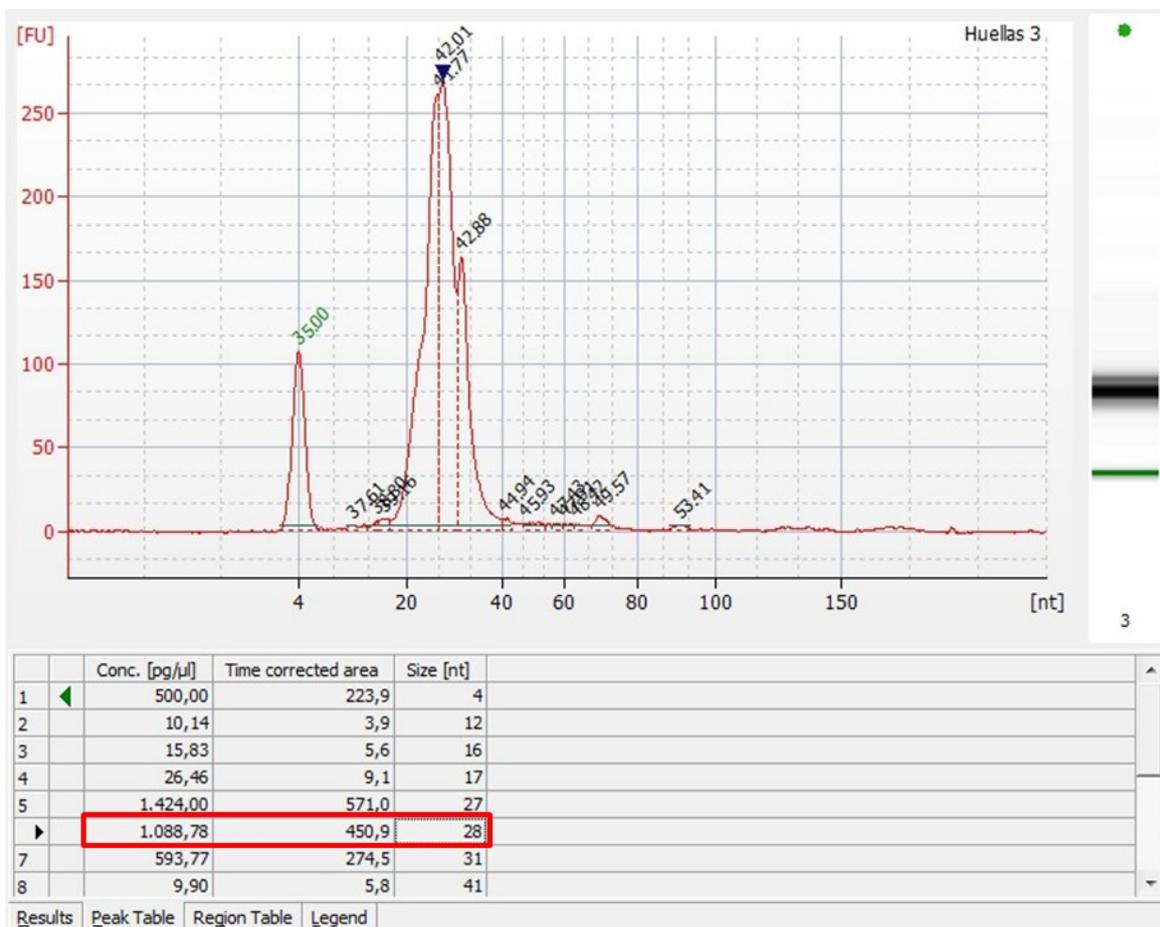


**Figura 20. Recorte de bandas del gel y análisis de la composición de tamaños de las mismas.**

**(A)** Se muestra una imagen digital de un gel PAGE 15% con urea 7M, en transiluminador UV, y luego de recortarle 4 bandas de movilidad electroforética distinta pero sucesiva, donde se supone que se pueden encontrar las huellas polisomales.

**(B)** El ARN contenido en dichas bandas es extraído, purificado y resuelto en un chip de *small ARN* de *Bioanalyzer*. Se muestran los carriles digitales construidos por el software *2100 Agilent Bioanalyzer*, para las 4 bandas recortadas. Se puede apreciar el patrón en "escalera" de los fragmentos purificados.

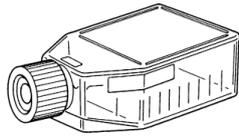
En resumen, se puso a punto el protocolo de *Ribosome Profiling* para el tipo celular específico con el que se está trabajando. Esta puesta a punto involucró: *i)* determinar el número inicial de células a utilizar, *ii)* conocer la movilidad electroforética de la banda correspondiente a las huellas polisomales y *iii)* establecer el protocolo de extracción de ARN desde la banda recortada a utilizar de forma de optimizar los rendimientos. En la Figura 22 puede observarse una descripción más detallada del protocolo de *Ribosome Profiling* llevado a cabo en la presente tesis.



**Figura 21. Perfil electroforético y detalle del tamaño y la concentración de los fragmentos contenidos en la banda correspondiente a las huellas polisomales.**

En la parte superior de la figura se observa el perfil electroforético producido por el software *2100 Agilent Bioanalyzer (kit small RNA)*, correspondiente a la banda asignada a las huellas polisomales (banda 3 de la figura 20). El perfil presenta dos grandes picos de 28 y 29 nt de tamaño y un hombro a 31 nt.

En la parte inferior se observa en detalle las características de la población de fragmentos que compone dicha banda. Se resalta en rojo la presencia de un fuerte pico en 29nt, largo característico de una huella polisomal.



80x10<sup>6</sup> células

+ Cicloheximida  
(100 µg/mL)  
1hr a 37°C

**HIELO**

2 lavados PBS frío  
Levantar las células



Centrifugar células

SE SEPARA UNA ALÍCUOTA DE  
CÉLULAS PARA **TRANSCRIPTOMA**

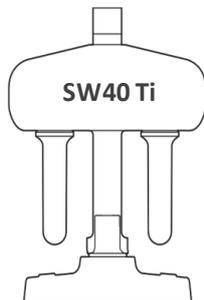
Agregar **BUFFER de LISIS**

DTT  
Tritón X-100  
Desoxicolato de Sodio

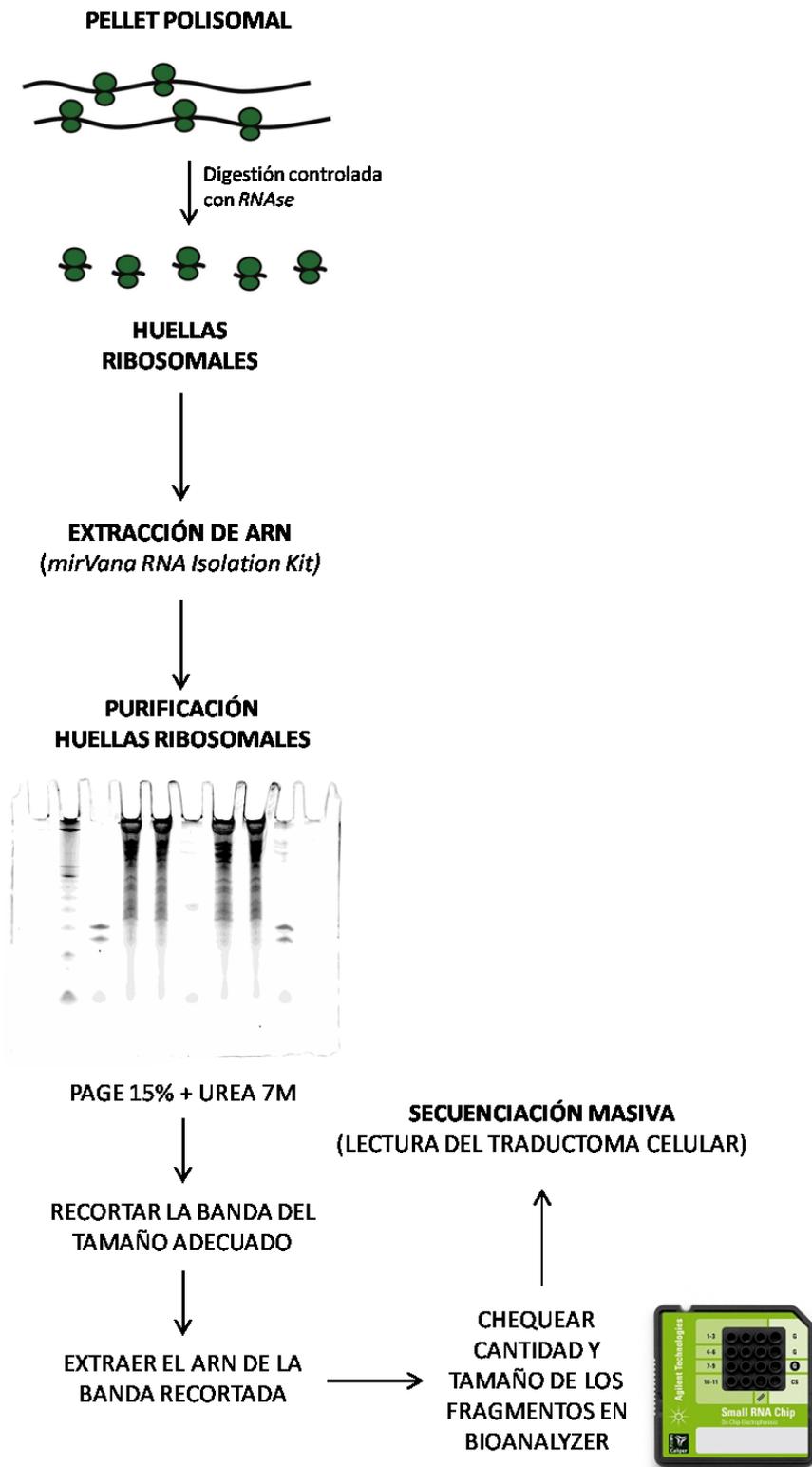
**SOBRENADANTE  
POST-MITOCONDRIAL**

**EXTRACCIÓN DE ARN**  
(*mirVana RNA Isolation Kit*)

**SECUENCIACIÓN MASIVA**  
(LECTURA DEL TRANSCRIPTOMA CELULAR)



**ULTRACENTRIFUGACIÓN**  
35.000RPM – 2HS:45MIN – 4°C



**Figura 22. Descripción detallada del protocolo de *Ribosome Profiling* llevado a cabo.**

La figura muestra los principales puntos del protocolo de *Ribosome Profiling* que se llevó a cabo en la presente tesis.

## **V.2.2 EXPERIMENTO DE RIBOSOME PROFILING EN CELULAS PC12 TRAS INDUCCIÓN DEL SILENCIAMIENTO DE PDCD4.**

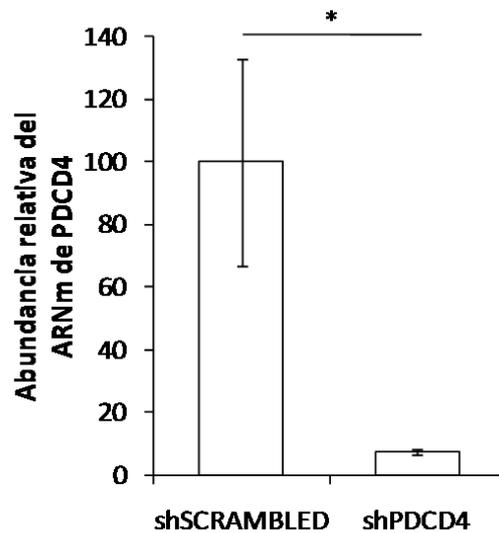
Una vez que se estableció el modelo celular, se comprobó que el silenciamiento de PDCD4 ocurre y es efectivo, y que se puso a punto en detalle el protocolo de *Ribosome Profiling*, se está en condiciones de realizar dicho protocolo en las condiciones biológicas planteadas en la presente tesis.

En la Figura Suplementaria 1 se observan fotografías de microscopía óptica de luz transmitida de los cultivos celulares de las dos condiciones biológicas, a tiempo 0 hs (antes de iniciar los tratamientos con NGF y doxiciclina) y a las 72 hs, el tiempo final de diferenciación neuronal e inducción del silenciamiento. Puede observarse en la figura el nivel de confluencia utilizado, así como también se observa el cambio en la morfología celular resultado de la diferenciación neuronal alcanzada mediante el efecto del NGF.

El silenciamiento de PDCD4 a nivel de ARNm en este experimento puntual, fue comprobado mediante qRT-PCR, tal como se realizó antes (sección V.1.2.b página 46). La Figura 23 muestra el resultado de la cuantificación relativa llevada a cabo, donde los niveles de abundancia relativa del ARNm de PDCD4 descienden más de 13 veces (de 100% a 7,36%), de manera significativa (p-valor < 0,05, test se Student).

Como resultado de llevar a cabo el protocolo de *Ribosome Profiling* se obtienen, para este experimento particular 4 muestras: 2 muestras para cada condición biológica (presencia y ausencia de PDCD4), una de ARN total (Transcriptoma) y otra de huellas polisomales (Traductoma). En la Figura 24 se observa la calidad y cantidad de las mismas evaluada mediante electroforesis capilar, utilizando la tecnología del *Bioanalyzer*.

Las muestras de ARN total fueron evaluadas mediante el kit de *ARN Nano*, para conocer el valor RIN de las mismas. Por su parte, las muestras de huellas polisomales fueron evaluadas utilizando el kit de *small ARN*, para conocer el tamaño y concentración de los fragmentos obtenidos. En la figura 24 se observa la excelente calidad de las muestras de ARN total con valores de RIN de 10 y 9,90. Mientras que las huellas polisomales presentan el patrón de electroferograma esperado, así como una concentración que a pesar de ser baja, representa una cantidad de ARN que es suficiente para iniciar la construcción de bibliotecas de secuenciación.



**Figura 23. Cuantificación relativa del ARNm de PDCD4 mediante qRT-PCR para evaluar el grado de silenciamiento en el experimento.** Triplicados de muestras de ARN de las dos condiciones biológicas: shScrambled y shPDCD4, fueron evaluadas por qRT-PCR para conocer la abundancia relativa del ARNm de PDCD4. Resultado de la inducción del silenciamiento se observa una reducción estadísticamente significativa (Test de Student, p-valor < 0,05) en el ARNm de PDCD4.

### V.2.3 SECUENCIACIÓN MASIVA Y ANÁLISIS DE DATOS

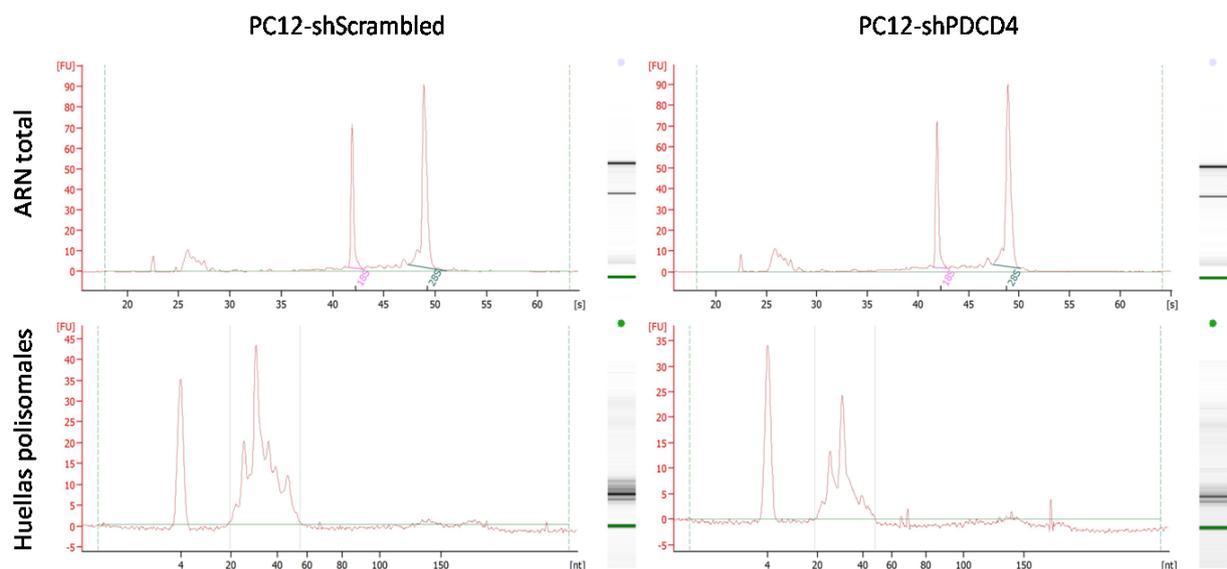
#### *V.2.3.a Evaluación de la calidad de las bibliotecas, alineamientos y análisis primarios*

Como indica la Figura 9, en primer lugar se procedió a evaluar parámetros globales de las bibliotecas secuenciadas. Para dicho objetivo se ejecutó en línea de comando el programa libre FastQC [126]. Básicamente todas las bibliotecas presentaban reportes muy

buenos de calidad, así como una distribución de tamaños aceptable en el caso de los traductomas (ver Figuras Suplementarias 2 y 3).

Luego de estudiar la calidad de las bibliotecas secuenciadas y observar que no es necesario efectuar un *trimming* de calidad sobre las mismas, se procede a realizar los alineamientos, frente a la base de datos correspondiente, en el software *CLC Genomics Workbench* versión 6.5, cuya licencia se encuentra disponible en el servidor *thor* del Departamento de Genómica del IIBCE.

Las pequeñas diferencias existentes en los *pipeline* de alineamiento para las muestras



		Concentración (ng/μL)	RIN
ARN total (Transcriptomas)	PC12-shScrambled	249,0	9,90
	PC12-shPDCD4	253,0	10,00
Huellas polisomales (Traductomas)	PC12-shScrambled	91,5	—
	PC12-shPDCD4	77,5	—

**Figura 24. Evaluación de la calidad y cantidad de las muestras de ARN total y huellas polisomales producidas.**

Se muestran los electroferogramas del *Bioanalyzer* para las muestras de ARN total (kit *ARN Nano*) y huellas polisomales (kit *small ARN*), de las dos condiciones biológicas estudiadas: PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4.

La tabla en la parte inferior resume los resultados cuantitativos obtenidos para las muestras: valores de concentración y los valores de RIN para las muestras de ARN total.

correspondientes a los transcriptomas y traductomas, detalladas en Materiales y Métodos, nos permitió conocer el porcentaje de contaminación con ARN ribosomal (ARNr) presente en las muestras de traductomas: 83% y 86% (ver Tabla 1). Es necesario mencionar que la contaminación de estos fragmentos de ARNr que se arrastra en las bibliotecas de huellas polisomales, puede llegar a ser muy importante y en algunos casos puede ser necesario realizar substracciones específicas de estos fragmentos mediante oligos biotinilados [90] (ver Discusión). En la Tabla 1 pueden observarse también la cantidad de secuencias producidas en la secuenciación masiva de las bibliotecas, así como la cantidad de las mismas que mapean frente a las referencias utilizadas en cada caso. Para ambos compartimentos, el número de secuencias mapeadas es suficiente para el análisis de expresión comparativa que se realizó en la presente tesis.

**Tabla 1. Estadísticos de secuenciación y alineamientos.**

La tabla muestra, tanto para el compartimento transcripcional (arriba), como para el compartimento traduccional (abajo), y para ambas condiciones biológicas (PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4), el número de lecturas presentes en la biblioteca original (secuencias crudas), cantidad de secuenciadas mapeadas y asignadas a contaminación por ARNr.

TRANSCRIPTOMAS	Secuencias crudas	Secuencias mapeadas	Mapeadas en pares	Mapeadas en pares rotos
PC12-shScrambled	46,950,404	29,410,732 (62.6%)*	24,854,896 (84.5%)	4,555,836 (15.5%)
PC12-shPDCD4	45,190,684	28,603,120 (63.3%)*	24,443,538 (85.5%)	4,159,582 (14.5%)

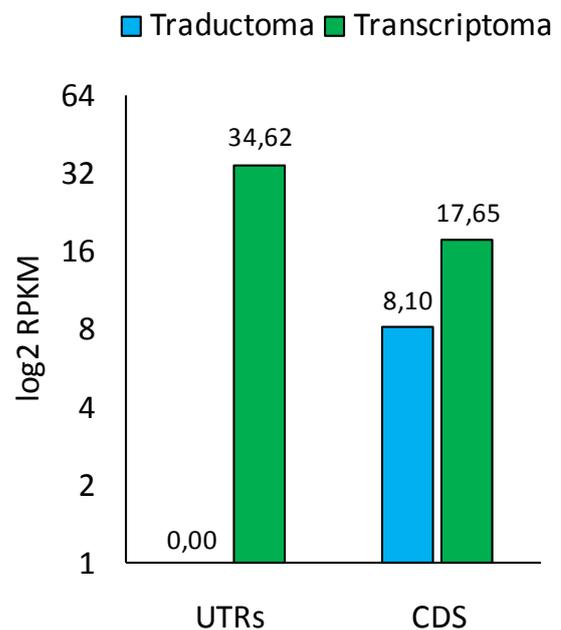
  

TRADUCTOMAS	Secuencias crudas	Secuencias mapeadas*	ARNr
PC12-shScrambled	44,596,401	3,581,437 (8%)* (58%)**	38,433,519 (86%)
PC12-shPDCD4	50,260,297	6,073,677 (12%)* (71%)**	41,750,116 (83%)

\*: Porcentaje calculado sobre el total de secuencias crudas

\*\* : Porcentaje calculado sobre el total de secuencias no-ARNr

Otro análisis primario que se realizó a los efectos de contrastar los compartimentos transcripcional y traduccional, fue contar las lecturas que alineaban en las distintas regiones del ARNm: 5'-UTR, CDS y 3'-UTR, para luego realizar los cálculos de expresión correspondientes para cada región de cada ARNm (Figura 25). En este caso se trabajó con las dos condiciones biológicas juntas, ya que no hay razón por la cual afirmar que la ausencia de PDCD4 pueda distorsionar la distribución de lecturas sobre las distintas regiones de un ARNm, al observar el fenómeno en forma global. Dada la identidad de cada compartimento celular, es de esperar que los traductomas presenten una distribución más sesgada en el mapeo de sus lecturas respecto del transcriptoma, donde se ve favorecido el mapeo de lecturas sobre la región codificante respecto de los UTRs [86]. Esto se debe a que la mayoría de los ribosomas que se encuentran sobre un ARNm, están presentes en su CDS llevando adelante la síntesis proteica, aunque puedan encontrarse en el 5'UTR realizando el *scanning* del codón de iniciación ó en el 3'-UTR de ARNm circulares (ver Figura 1). Por su parte, en el compartimento transcripcional no existe razón biológica alguna para ver favorecida a una región sobre la otra. En este contexto, como se observa en la Figura 25, en el compartimento traduccional las regiones no traducidas (5' y 3'-UTRs) presentan niveles de expresión considerablemente bajos al compararlos con los niveles de expresión de la región traducida



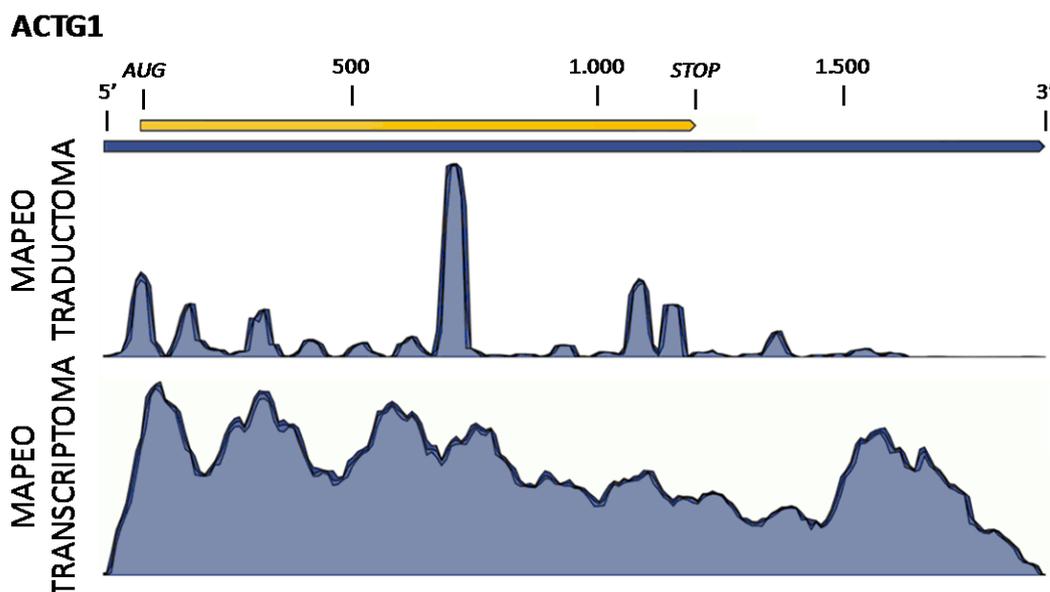
**Figura 25. Niveles de expresión de las distintas regiones del ARNm en los transcriptomas y traductomas.**

Se muestra la mediana de los niveles de expresión en RPKM para las regiones UTRs (5' y 3') y CDS de los ARNm. Se distinguen los dos compartimentos celulares estudiados: transcriptoma (verde) y traductoma (azul).

(CDS). Como se esperaba, este fenómeno no ocurre para el compartimento transcripcional, donde se observan altos niveles de expresión tanto para los UTRs como para los CDS.

En la Figura 26 se muestra un ejemplo puntual del panorama global descrito anteriormente. En la figura se presentan los mapeos de huellas polisomales y lecturas del transcriptoma para el gen ACTG1 (Actina gamma 1). Se pueden observar las evidentes diferencias entre un mapeo y el otro: mientras el mapeo correspondiente al transcriptoma es más uniforme y distribuido a lo largo de todo el transcripto, el mapeo traduccional se concentra en la región codificante, disminuyendo las lecturas mapeadas en las regiones no traducidas.

Un último análisis primario que se realizó en esta primera etapa, fue evaluar la expresión de ciertos marcadores moleculares de diferenciación neuronal. Para esto, por un lado se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar una lista de genes apropiados que indiquen diferenciación neuronal de las células PC12 en presencia de NGF. La lista de



**Figura 26. Mapeos de huellas polisomales y del transcriptoma sobre el gen ACTG1.** En la parte superior se observa la estructura genética del gen ACTG1: CDS (amarillo) y ARNm (azul). En la parte inferior se observan los mapeos de las huellas polisomales (mapeo traductoma) y el mapeo de las lecturas correspondientes al transcriptoma (mapeo transcriptoma).

marcadores construida entonces es la siguiente: BRSK1 [129], DUSP6 [130], MAP2, NEFL, NEFM, NEFH, SYN1 [131], SYN2, SYN3 (todos con referencia en [132]) y TUBB3 [133]. Por otro lado, se utilizaron los datos del artículo mencionado anteriormente en la introducción [100], donde se aplicó la metodología de *Ribosome Profiling* y técnicas transcriptómicas en células PC12 sin diferenciar, para tener referencia de los valores de expresión de los marcadores a tiempo 0 hs de diferenciación. Los resultados que se muestran en la Tabla Suplementaria 1, indican un aumento general en la expresión de dichos marcadores. A nivel transcripcional, 7 de 10 marcadores suben sus niveles de expresión, mientras que en los otros 3 casos la expresión, evaluada en unidades de RPKM, desciende. Cabe mencionar que a pesar de encontrar valores de fold change positivos, éstos son cercanos a 1. Para estos casos se deben considerar los siguientes puntos: la línea celular PC12 tiene un origen embrionario neuronal, con lo cual puede expresar marcadores neuronales aún en ausencia de NGF. También, la comparativa directa de valores de RPKM puede estar sujeta a errores asociados a este tipo de normalización [134,135].

En resumen, en esta primera instancia de análisis se verificó que la calidad de las bibliotecas secuenciadas fue muy buena, por lo que se procedió al mapeo de las mismas frente a una referencia de ARNm de rata. Los mapeos fueron aceptables ya que el porcentaje de lecturas mapeadas fue satisfactorio, así como el grado de contaminación por ARNr presente en las bibliotecas de huellas polisomales estuvo dentro de los valores esperados. Algunas características primarias de estos mapeos fueron evaluadas, como por ejemplo: se determinó el tamaño de los compartimentos transcripcional y traduccional (9.000 y 5.000 ARNm respectivamente) en función de conteo de lecturas (ver Discusión). Se estudió la distribución de las lecturas mapeadas en las distintas regiones del ARNm, donde

se observó como en el compartimento traduccional las regiones no traducidas tendían a tener menos mapeos respecto de la región traducida. Por último también se evaluó el grado de diferenciación neuronal alcanzado por las células PC12, al comparar niveles de expresión de ciertos marcadores neuronales con datos públicos disponibles en otro trabajo de similares características. En este sentido, se observó que la expresión de dichos marcadores aumentaba al cabo de 72 hs de diferenciación neuronal, confirmando de alguna manera una efectiva diferenciación neuronal.

#### *V.2.3.b Normalización y búsqueda de genes expresados diferencialmente: DESeq y DESeq2*

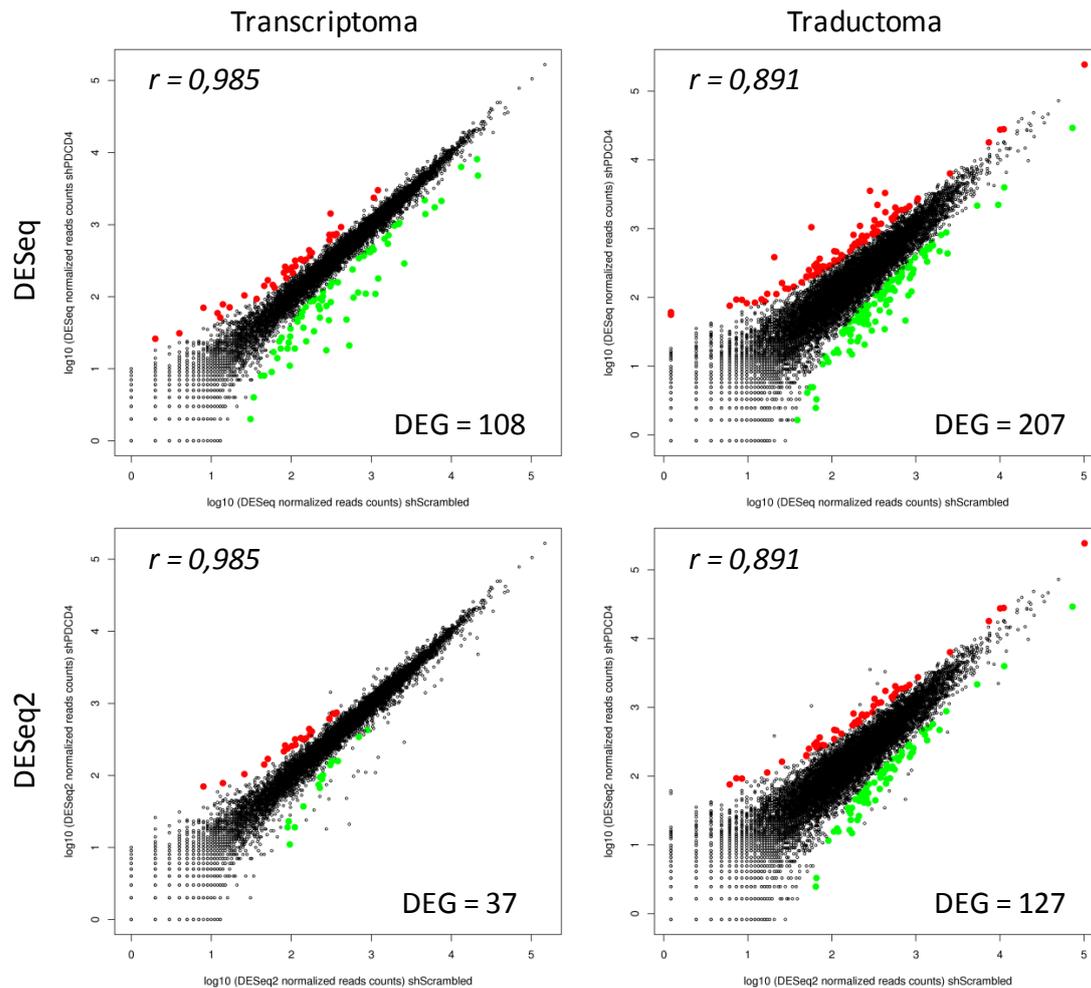
Trabajando *in silico*, se cargan las librerías de DESeq y DESeq2 en el entorno R junto con las tablas con los conteos en los transcriptomas y traductomas. En ambos paquetes de análisis se nos permite trabajar con una única réplica asumiendo las limitaciones estadísticas que esto conlleva, un punto muy discutido en los manuales de DESeq y en la comunidad científica (ver Discusión). En este sentido, los paquetes estadísticos ejecutan en primer lugar la normalización de los conteos para cada compartimento a estudiar, y luego de estimar la varianza, realizan la búsqueda de genes expresados diferencialmente.

En la Figura Suplementaria 4 se observan mediante box plots, la distribución de conteos para ambos compartimentos y condiciones biológicas, antes y después de efectuar la normalización. Lo que se observa a simple vista es que ambas condiciones presentan distribuciones similares, tanto para el transcriptoma como para el traductoma. También se observa que la normalización no distorsiona considerablemente la distribución de los conteos. Esto puede también adelantarse al observar los valores de *size factors* presentes en la tabla de la Figura Suplementaria 4. Estos valores se encuentran muy cercanos a 1, por lo

que el efecto de dividir los conteos entre estos valores no efectuará grandes cambios (más apreciable para los transcriptomas).

Vale mencionar que al momento de efectuar la normalización y aplicar el test estadístico, DESeq2 introduce una variante respecto a DESeq, ya que corrige los valores de fold change mediante una contracción. Esto vuelve más exigente la detección de genes expresados diferencialmente (ver más adelante y Discusión). Si se considera el punto anterior, junto con el hecho de que trabajar sin réplicas disminuye la sensibilidad de los test estadísticos ya que se sobreestima la varianza, se debe anticipar que el uso del paquete DESeq2 será capaz de detectar *pocas* diferencias significativas, y menos que DESeq, donde no se aplica la contracción de los valores de fold change. En este escenario, el paquete DESeq2 es más estricto pero a la vez más seguro.

En la Figura 27 se muestran los scatter plots donde se grafican los conteos normalizados para la condición shPDCD4 en función de los conteos normalizados para shScrambled, ambos en escala logarítmica. En la figura se observan el par de scatter plots correspondientes al transcriptoma y traductoma, para DESeq y para DESeq2, junto con los valores de correlación de Pearson. Más allá de que los conteos normalizados sean iguales para ambos paquetes, la estadística aplicada difiere, por lo que el número de genes expresados diferencialmente (DEG, por su sigla en inglés *Differentially Expressed Genes*;  $|\text{fold change}| > 2$  y p-valor menor a 0,05) es distinto para los dos paquetes. De hecho, como se mencionaba antes, DESeq2 detecta menos DEG que DESeq: 37 contra 108 para el transcriptoma y 127 contra 207 para el traductoma, respectivamente. En la figura también ya se anticipa que la componente de regulación traduccional predomina sobre la transcripcional como se explicará en el siguiente punto (ver más adelante).



**Figura 27. Scatter plots de los conteos normalizados para cada compartimento, indicando genes expresados diferencialmente según DESeq y DESeq2.**

Cada cuadrante muestra un scatter plot de los conteos normalizados para las condiciones shPDCD4 (eje y) vs shScrambled (eje x), ambos en escala logarítmica. Se muestran los compartimentos transcripcional y traduccional (columna izquierda y derecha respectivamente), y los dos paquetes estadístico utilizados (DESeq arriba y DESeq2 abajo). En color se indican los genes expresados diferencialmente ( $|\text{fold change}| > 2$  y p-valor menor a 0,05): en rojo los que aumentan su expresión y en verde los que disminuyen. Para cada cuadrante se muestra el número de genes expresados diferencialmente (DEG; ver texto). También se muestra el valor de correlación de Pearson ( $r$ ), en cada caso.

En suma, en esta etapa se utilizaron los paquetes DESeq y DESeq2, ambas librerías de R, para llevar adelante la normalización de los datos y la búsqueda de genes expresados diferencialmente (DEG). La normalización de los conteos se llevó a cabo considerando a las dos condiciones biológicas como réplicas biológicas, dada la ausencia de las mismas. Esta normalización no afectó la distribución global de los conteos crudos dado que el número de

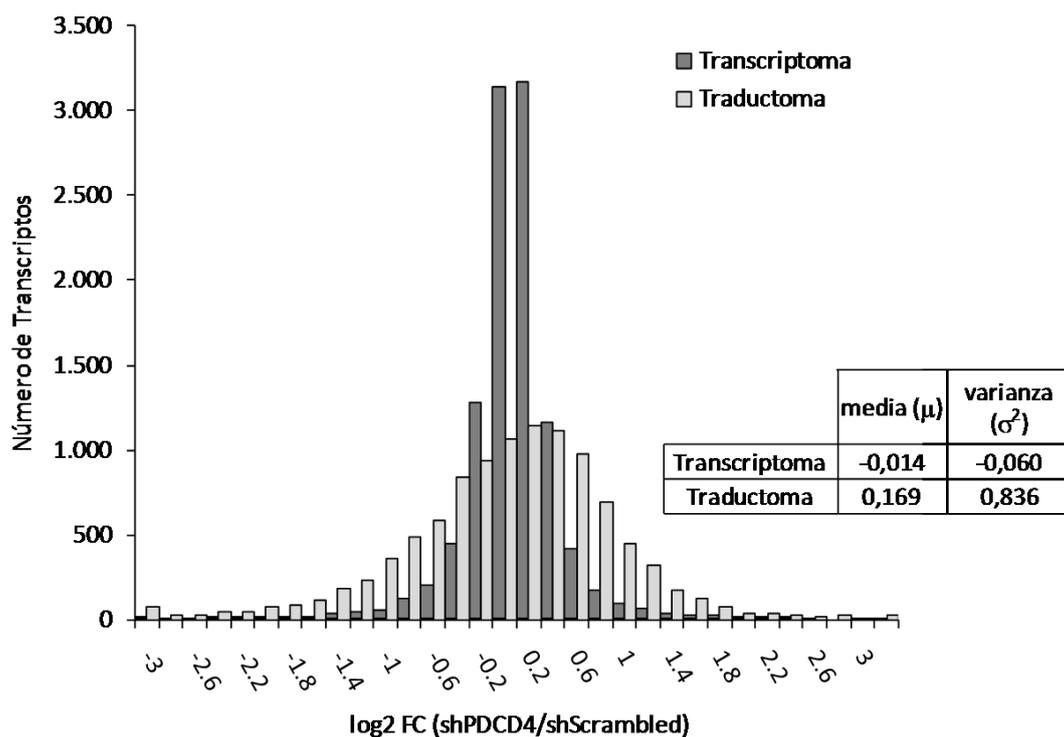
secuencias mapeadas es similar entre las dos condiciones biológicas. Posteriormente se procedió al estudio de la expresión génica diferencial donde cada paquete, haciendo uso de sus modelos estadísticos, es capaz de determinar cambios en la expresión génica específicos para cada compartimento. En este caso, DESeq2 detecta menos DEG que DESeq para los dos compartimentos. De todas maneras, tanto para DESeq como para DESeq2, se observan más DEG en el compartimento traduccional que en el transcripcional.

#### *V.2.3.c Estudio de la regulación traduccional y cálculo de eficiencias traduccionales*

Cuando se observan los resultados obtenidos al comparar transcriptoma vs transcriptoma y traductoma vs traductoma, ya se puede apreciar el efecto de PDCD4 en la regulación traduccional. Particularmente, dos aspectos de la Figura 27 sugieren lo anterior. Por un lado en dicha figura se observa que el número de DEG en el compartimento traduccional es mayor que en el compartimento transcripcional: mientras que para DESeq es casi el doble (de 108 a 207), para DESeq2 casi que se cuadruplica (de 37 a 127). Por el otro lado, puede observarse en la misma figura que los conteos para el compartimento transcripcional correlacionan mejor que en el compartimento traduccional (ver valores de correlación de Pearson en los gráficos de la Figura 27). Una correlación menor en los traductomas, que se puede observar como un gráfico de puntos más *ancho*, implica que los niveles de expresión son más dispersos, o varían más, entre las dos condiciones biológicas estudiadas. Esto implica que la varianza sea mayor en el compartimento traduccional y que por lo tanto sea más difícil encontrar genes expresados diferencialmente, lo que resalta las diferencias mencionadas en primer lugar. Estas apreciaciones podrían indicar que la ausencia de PDCD4 tiende a afectar más el compartimento traduccional respecto del transcripcional.

Otra manera de comparar la regulación transcripcional y la traduccional es observando cómo se distribuyen los valores de fold change en cada compartimento. Para esto, en la Figura 28 se grafica a modo de histograma dicha distribución. En esta figura se agrupan los genes en función del valor de fold change transcripcional y traduccional.

Lo que se observa es que para el transcriptoma, la gran mayoría de genes no cambia su nivel de expresión ( $\log_2$  fold change  $\sim 0$ ). Esto centra la distribución de los valores en cero ( $\mu = -0,014$ ) y disminuye la varianza ( $\sigma^2 = -0,06$ ), por lo que vemos una distribución angosta con un pico alto centrado en cero. En el caso de la distribución de los valores de fold change correspondientes al traductoma, como la regulación es mayor, los valores se distribuyen de forma más amplia, aumentando la varianza ( $\sigma^2 = 0,836$ ). De esta manera, se observa una



**Figura 28. Histograma de distribución de los valores de fold change en el Transcriptoma y Traductoma.**

Los transcritos son agrupados según sus valores de fold change y se contabiliza el total de transcritos en cada intervalo. Se muestra la distribución tanto para el compartimento transcripcional (gris oscuro), como para el traduccional (gris claro). La tabla asociada muestra los valores de media y varianza para ambas distribuciones.

distribución más ancha. También considerando que PDCD4 es un regulador negativo de la traducción, puede observarse un leve corrimiento de la media hacia valores positivos ( $\mu = 0,169$ ). Esto indicaría que, dentro del control traduccional, parece verse favorecido un aumento traduccional.

Posteriormente se calcularon los valores de eficiencia traduccional (expresión traduccional / expresión transcripcional, ver Introducción sección II. 4). En la Figura Suplementaria 5 se puede observar la distribución global de dicho parámetro. Lo que se observa es que, comparando ambas condiciones biológicas, no se aprecia una diferencia sustancial en las distribuciones. Dado que la ausencia de PDCD4 afecta solo a una población específica de ARNm, las medias globales de eficiencia traduccional no se ven afectadas y los box plots mostrados en la figura presentan aspectos similares.

Hasta el momento hemos detectado la regulación traduccional ejercida por PDCD4 a través de dos observaciones: se detecta un número mayor de DEG en el traductoma respecto del transcriptoma, y la distribución de los valores de fold change traduccionales es más amplia que la transcripcional. También se evaluó la distribución global del parámetro de eficiencia traduccional, sin observar cambios entre ambas condiciones biológicas.

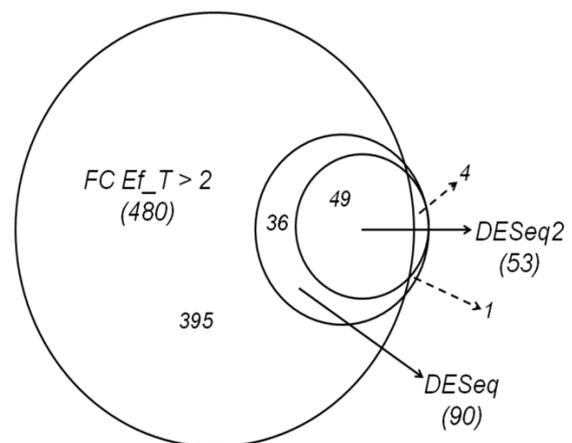
#### *V.2.3.d Búsqueda de blancos traduccionales de PDCD4 y estudios de ontología*

Luego de identificar de manera global el papel que cumple PDCD4 como factor proteico en la regulación de la traducción, es momento de buscar específicamente cuáles son los ARNm blancos cuya traducción se ve regulada negativamente por PDCD4. Para esto se utilizaron los tres criterios descritos en Materiales y Métodos, lo cual produjo listas con 90,

53 y 480 ARNm respectivamente para cada criterio (criterio 1 - datos de DESeq: fold change > 2 y p-valor < 0,05; criterio 2 - datos de DESeq2: idem; criterio 3 - datos de Eficiencia Traduccional: fold change > 2).

En este contexto, la lista producida según el criterio de eficiencia traduccional (la más extensa con 480 ARNm), es la lista que contempla más escenarios de regulación. Por ejemplo, supóngase el caso de un transcripto que no cambia a nivel traduccional, pero sí lo hace a nivel transcripcional: este gen no será seleccionado por ninguno de los dos primeros criterios. Sin embargo, si los niveles transcripcionales en la condición shPDCD4 han descendido, se podría tratar de un blanco traduccional: ante un nivel de expresión traduccional *igual*, si el gen disminuye su expresión transcripcional en ausencia de PDCD4, estaría aumentando en consecuencia su eficiencia traduccional. Por esto, sin ser detectado por los dos criterios anteriores, puede tratarse de un blanco traduccional evidenciado por un cambio en su eficiencia traduccional, detectado al integrar la información transcripcional y traduccional a la vez.

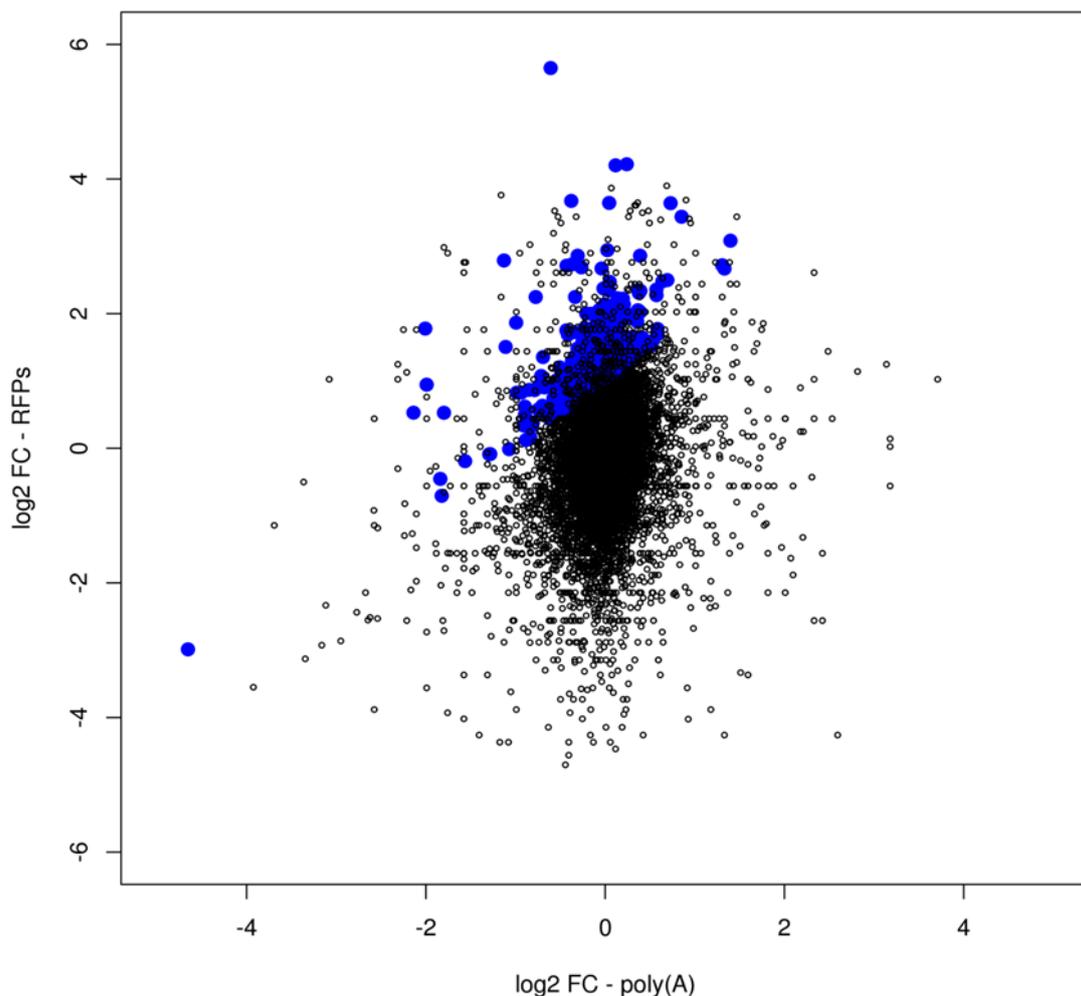
Si se cruzan las listas con los blancos traduccionales determinados por cada uno de los tres criterios, se observa que la amplia mayoría (más del 90%) de los blancos presentes en las listas determinadas por DESeq y DESeq2 (las más pequeñas en tamaño) se encuentran presentes en la lista construida según el criterio que involucra los valores de eficiencia traduccional (ver Figura 29).



**Figura 29. Intersección de las listas de blancos traduccionales construidas según los tres criterios utilizados.** Se muestra mediante diagramas de Venn proporcionales la intersección de las listas de blancos traduccionales, construidas según los datos de DESeq, DESeq2 y de eficiencia traduccional (FC Ef\_T > 2).

La regulación transcripcional y traduccional ejercida sobre los blancos traduccionales puede ser visualizada mediante un gráfico de fold change traduccional vs fold change transcripcional, como se muestra en la Figura 30. Lo que se observa en la figura es cómo se ocurren los cambios transcripcionales y traduccionales para todos los transcritos, al visualizarlos al mismo tiempo. Resaltados en color azul se muestran los 480 ARNm candidatos a ser blancos traduccionales según el criterio de la eficiencia traduccional.

Si se analizan los mapeos transcripcionales (RNA-Seq) y traduccionales (*Ribosome Profiling*) se pueden encontrar ejemplos que ilustren algunos de los mecanismos de

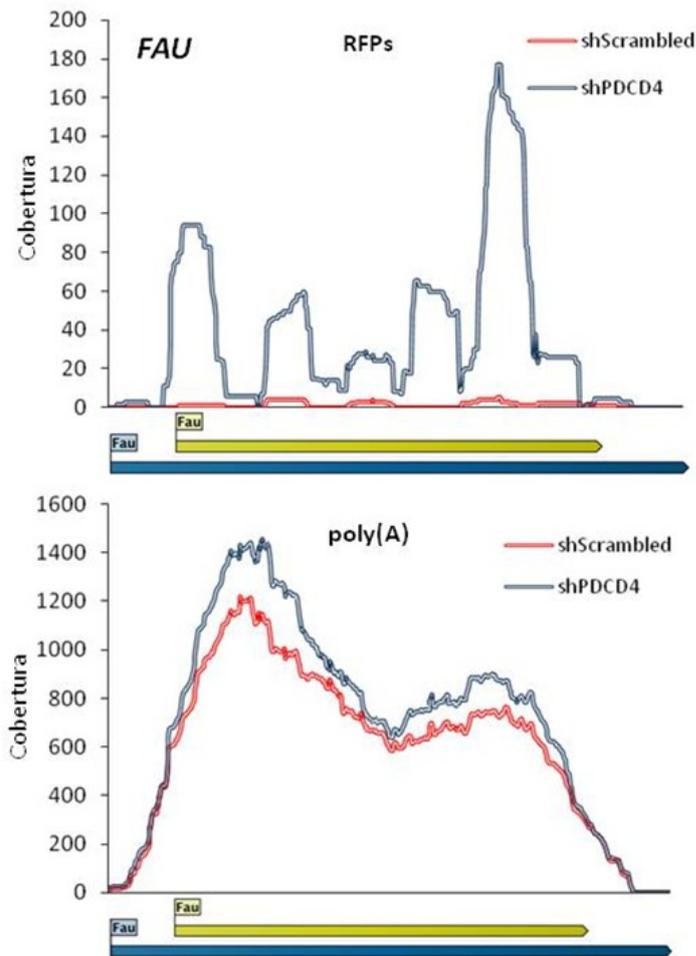


**Figura 30. Cambios traduccionales en función de los cambios transcripcionales.** El scatter plot de la figura grafica los fold change traduccionales en función de los correspondientes fold change transcripcionales, ambos en escala logarítmica de base 2. Resaltados en azul se encuentran los posibles blancos traduccionales de PDCD4 definidos según el criterio de eficiencia traduccional.

regulación a cargo de PDCD4. Un caso particular son aquellos ARNm cuya transcripción no se ve afectada mientras sus niveles traduccionales aumentan al remover PDCD4. Un ejemplo de este tipo es el que se ilustra en la Figura 31, para el gen FAU. En la Tabla Suplementaria 2 se presenta la información respecto al conteo y valores de fold change para dicho gen, junto con otros dos ejemplos mostrados en las Figuras Suplementarias 6 y 7. En estos tres ejemplos se pueden observar los mapeos traduccionales y transcripcionales. Lo que se aprecia es que los mapeos transcripcionales se mantienen prácticamente iguales entre ambas condiciones. Por su parte, el mapeo traduccional para la condición shPDCD4 es mucho mayor que en la condición control shScrambled.

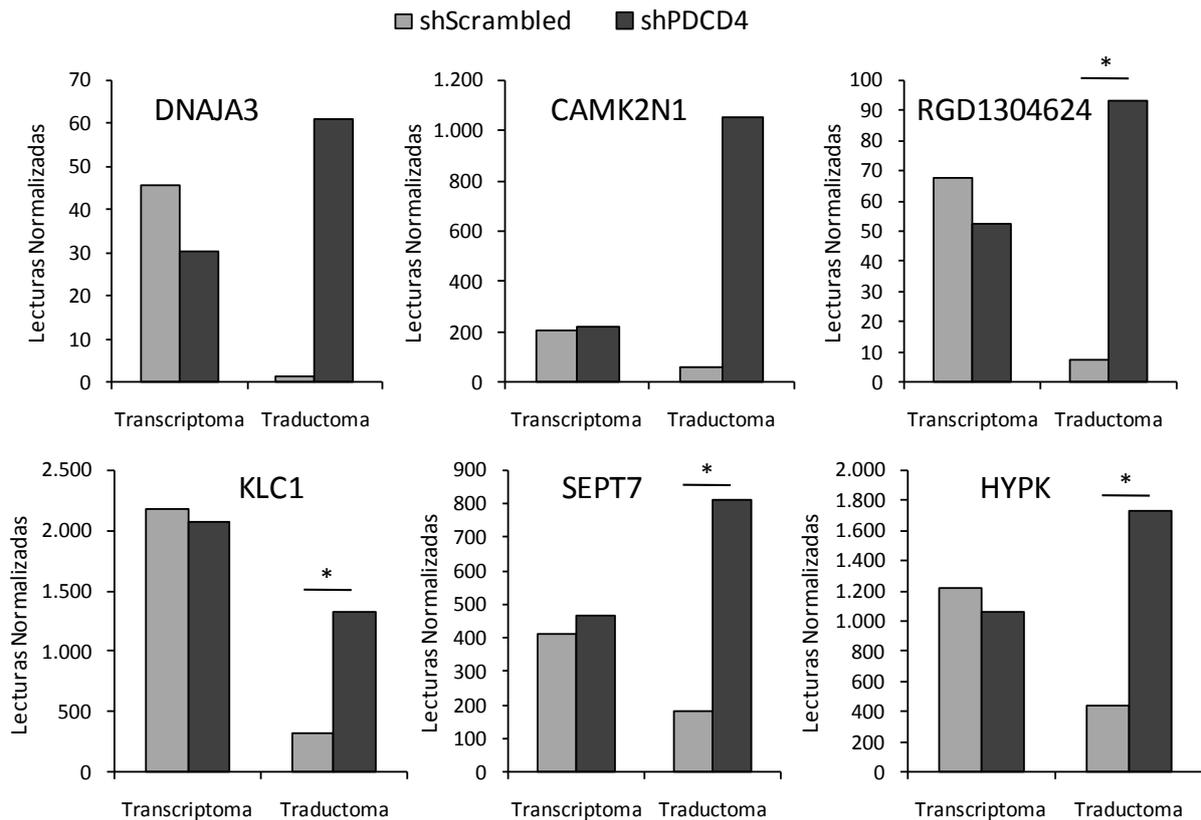
En estos tres mapeos también puede observarse la diferencia respecto al mapeo en sí de las huellas polisomales respecto del mapeo de las lecturas provenientes del transcriptoma. Como se discutió en las páginas 65 y 66, y fue analizado en las Figuras 25 y 26, los mapeos de huellas polisomales tienden a ubicarse exclusivamente en la región codificante, mientras que los mapeos transcripcionales se distribuyen a lo largo de todo el transcripto sin verse alguna región mayoritariamente favorecida.

Respecto a los genes mostrados, FAU es la versión celular de un gen del virus del sarcoma murino que codifica para una proteína fusionada que se procesa post-traduccionalmente y da lugar a una proteína miembro de la familia ubiquitina y a una proteína ribosomal [136]. HYOU1 es una proteína de respuesta a la hipoxia, pero se ha visto reducida en procesos apoptóticos de forma tal que se le atribuye un rol crioprotectivo en la hipoxia [137]. KLC1 es un gen que codifica para una cadena liviana de kinesina [138].



**Figura 31. Mapeos traduccionales y transcripcionales del gen FAU para las dos condiciones biológicas estudiadas.** Se muestran los mapeos traduccionales (arriba – RFPs) y transcripcionales (abajo – poly(A)), para las dos condiciones biológicas: shScrambled (rojo) y shPDCD4 (azul). Se muestra también la estructura génica: transcripto (azul) y CDS (amarillo).

Otra alternativa para visualizar el comportamiento de los posibles blancos traduccionales es observar los niveles de expresión transcripcional y traduccional de dichos blancos en ambas condiciones biológicas. En la Figura 32 se muestra dicho análisis, donde pueden observarse para 6 genes los niveles de conteos normalizados transcripcional y traduccional, en presencia y ausencia de PDCD4. En la figura se aprecian distintos escenarios posibles de regulación, por ejemplo, casos donde los niveles transcripcionales no varían y los traduccionales sí (ejemplo: gen CAMK2N1). Se muestran también otros escenarios más complejos, donde los niveles transcripcionales descienden al disminuir PDCD4, pero los traduccionales aumentan (ejemplo: gen DNAJA3).



**Figura 32. Niveles de expresión transcripcional y traduccional de algunos de los blancos traduccionales de PDCD4.**

En la figura se observan los conteos normalizados para el transcriptoma y traductoma, en las dos condiciones biológicas estudiadas: presencia (gris claro) y ausencia (gris oscuro) de PDCD4. Se muestran seis genes considerados como posibles blancos traduccionales de PDCD4: DNAJA3, CAMK2N1, RGD1304624, KLC1, SEPT7, HYPK. Las diferencias significativas detectadas por DESeq2 son indicadas con un asterisco (\*).

Luego de haber producido las listas con los posibles blancos traduccionales de PDCD4, se realizaron los estudios de ontología para atribuirle a dichas listas el significado biológico correspondiente.

En nuestro caso se utilizó la lista de transcritos definida por el criterio de eficiencia traduccional, ya que además de ser la más extensa (lo cual le da mayor robustez al análisis de ontología), es la lista que contempla la mayor cantidad de escenarios de regulación posibles como se comentó anteriormente. La Tabla Suplementaria 3 presenta la información detallada del top30 de los transcritos candidatos a ser blancos de regulación traduccional,

presentes en las listas producidas por los tres criterios (ver Figura 29). Todos los IDs de la lista son analizados mediante una herramienta web libre llamada DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) [115-116], que permite entre otras funciones, asignarle significado biológico a una lista de genes y conocer las funciones y procesos celulares sobre representados en dicha lista.

Una primera visión global de las funciones biológicas representadas en la lista es aportada por el *Functional Annotation Clustering*. Los resultados arrojados en este análisis reflejan funciones biológicas como:

- fosforilación oxidativa, cadena respiratoria mitocondrial y otros procesos vinculados a la mitocondria como el transporte transmembrana del ión hidrogeno y la síntesis de ATP.
- procesos metabólicos de amino azúcares (glucosamina por ejemplo)
- traducción de proteínas, elongación y procesos asociados al ribosoma
- regulación de la actividad ubiquitin-ligasa y del proteosoma
- control de la homeostasis redox
- endocitosis, organización e invaginación de la membrana
- regulación de procesos de apoptosis neuronal
- mantenimiento de los telómeros
- transporte retículo endoplasmático – aparato de Golgi
- transmisión sináptica y del estímulo nervioso
- procesamiento de ARNm y *splicing* de ARN

En la Tabla Suplementaria 4 pueden encontrarse los primeros 40 clúster construidos por la herramienta aquí utilizada, junto con toda la información obtenida para dichos clústeres de ontología.

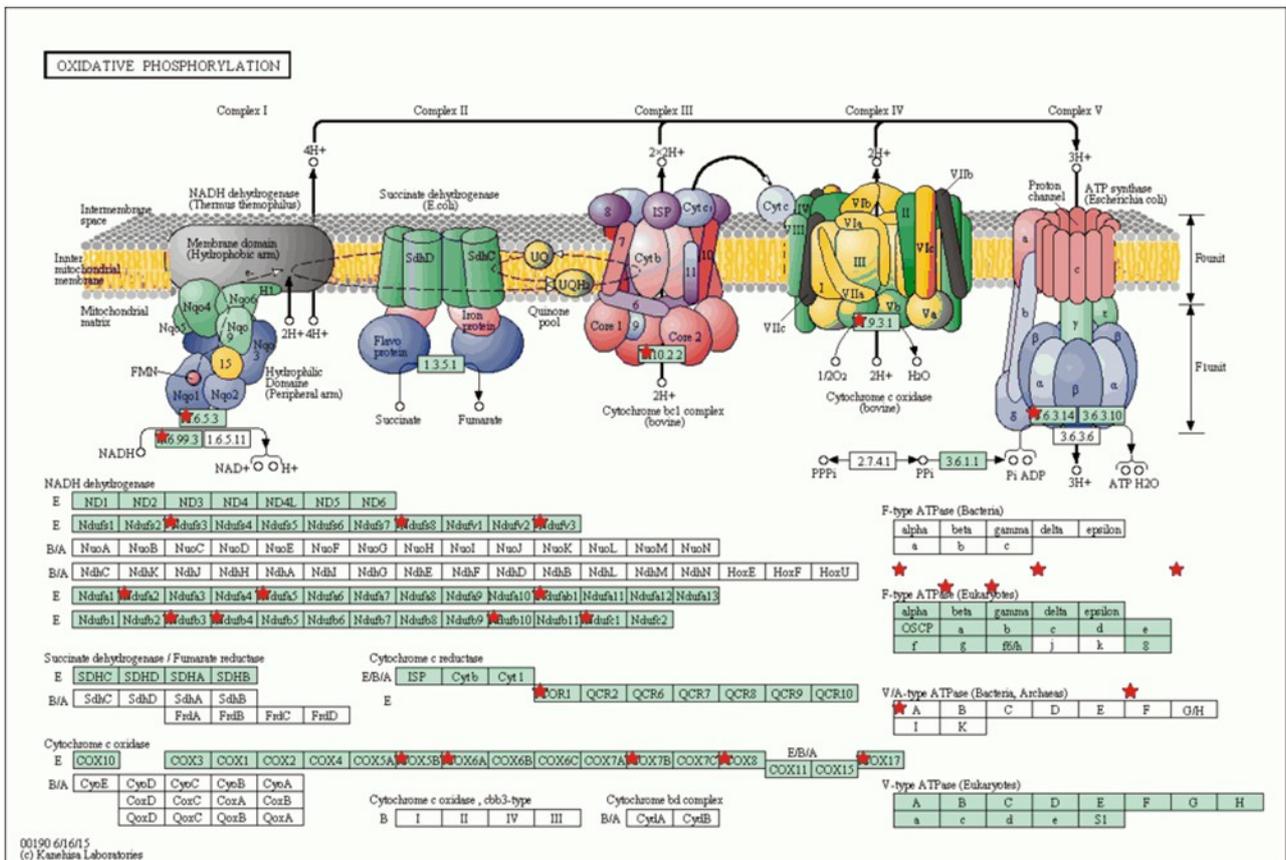
El programa también nos permite visualizar las principales vías ó *pathways* representadas en nuestra lista de genes de forma esquemática. En la Tabla 2 se observan todas los *pathways* representados en la lista de genes, según la base de datos *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Por ejemplo, en la Figura 33 observamos la vía correspondiente a la fosforilación oxidativa, donde se representa la cadena respiratoria mitocondrial y señalados con estrellas rojas los genes de esta vía que se encuentran en nuestra lista. Lo mismo se observa en la Figura 34 donde se muestra la vía asociada al mal de

**Tabla 2. Redes biológicas o *pathways* representadas en la lista de posibles blancos traduccionales de PDCD4.**

Se muestran las *pathways* detectadas por el programa DAVID, utilizando la base de datos *KEGG*, a partir de la lista de 480 posibles blancos traduccionales de PDCD4. Se muestra el nombre de la red biológica, los valores estadísticos asociados y se detallan los IDs de los genes de cada vía presentes en nuestra lista.

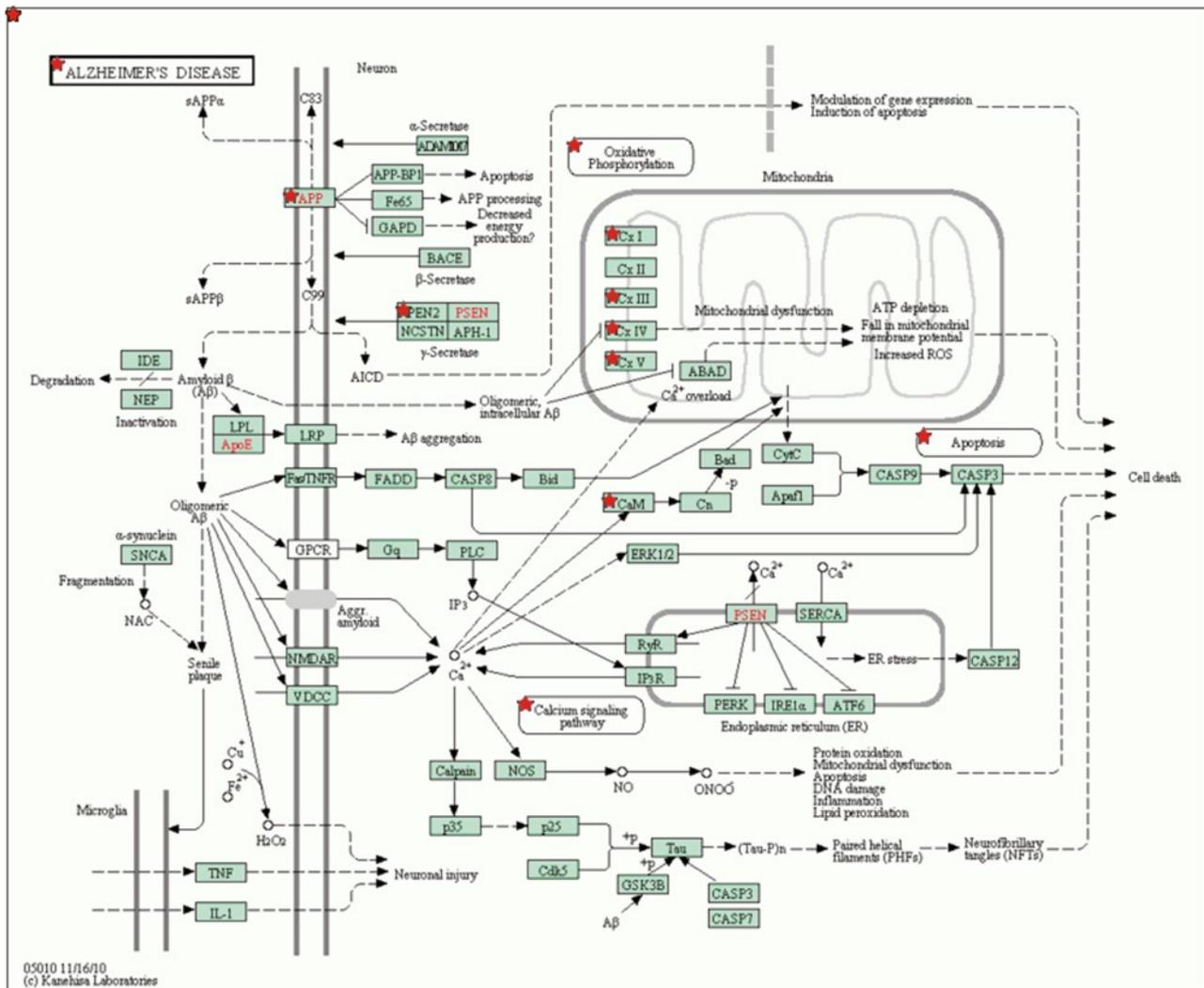
Term	Count	%	Fold Enrichment	PValue	FDR	Genes
mo00190:Oxidative phosphorylation	23	5,55	5,98	1,45E-11	1,67E-08	TCIRG1, NDUFB3, NDUF5A, NDUFB4, NDUF5A2, NDUFB10, UQCRC1, ATP5B, COX8A, COX7B, NDUFC2, NDUFAB1, ATP5G2, COX5B, ATP6V1F, NDUFV3, NDUFS8, COX6A1, ATP5O, NDUFS3, ATP5I, COX17, ATP5J
mo05016:Huntington's disease	22	5,31	4,12	4,74E-08	5,48E-05	NDUFB3, NDUF5A, NDUFB4, NDUF5A2, NDUFB10, UQCRC1, ATP5B, COX8A, COX7B, NDUFC2, NDUFAB1, ATP5G2, POLR2D, COX5B, NDUFV3, HDAC1, NDUFS8, COX6A1, ATP5O, NDUFS3, HAP1, ATP5J
mo05012:Parkinson's disease	19	4,59	4,76	5,65E-08	6,52E-05	NDUFB3, NDUF5A, NDUFB4, NDUF5A2, NDUFB10, UQCRC1, ATP5B, COX8A, COX7B, NDUFC2, NDUFAB1, ATP5G2, COX5B, NDUFV3, NDUFS8, COX6A1, ATP5O, NDUFS3, ATP5J
mo05010:Alzheimer's disease	22	5,31	3,98	8,95E-08	1,03E-04	NDUFB3, NDUF5A, NDUFB4, NDUF5A2, NDUFB10, UQCRC1, ATP5B, COX8A, COX7B, NDUFC2, NDUFAB1, ATP5G2, COX5B, NDUFV3, APP, NDUFS8, COX6A1, ATP5O, PSENE1, NDUFS3, CALM2, ATP5J
mo00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	7	1,69	5,8	0,0011	1,27	GMPPB, RENBP, GNPDA2, UGDH, NAGK, PMM2, UXS1
mo03010:Ribosome	7	1,69	3,00	0,028	27,74	RPS26, RPL35A, RPL36A, RPS9, FAU, RPS21, RPS27A
mo00510:N-Glycan biosynthesis	5	1,21	4,05	0,033	32,42	RFT1, GANAB, DAD1, DPM1, DPM3
mo00240:Pyrimidine metabolism	7	1,69	2,71	0,043	39,68	PRIM1, ITPA, NME1, UCK2, POLR2D, NME7, CMPK1
mo04142:Lysosome	8	1,93	2,43	0,044	40,81	TCIRG1, CLN3, NAGPA, PSAP, ARSA, PPT1, CTNS, CTSF
mo03050:Proteasome	5	1,21	3,56	0,0498	44,59	PSMB2, POMP, PSMA3L, PSMD8, PSMB9

Alzheimer. En las Figuras Suplementarias 8, 9 y 10 se muestran las vías asociadas al mal de Huntington, Parkinson y al ribosoma, respectivamente.



**Figura 33. Representación esquemática de la vía de fosforilación oxidativa afectada por PDCD4.**

Se muestra una representación de la vía de fosforilación oxidativa generada por la herramienta web DAVID utilizada para los estudios de ontología. Con estrellas rojas se señalan los genes de la vía presentes en la lista de posibles blancos traducionales.



**Figura 34. Representación esquemática de la vía del mal de Alzheimer afectada por PCD4.**  
Ídem figura 33, para la vía del mal de Alzheimer.

## **VI DISCUSIÓN**

### VI. 1 Ribosome Profiling en células PC12

Respecto a los resultados obtenidos del experimento de *Ribosome Profiling*, como se observa en la Tabla 1, los porcentajes de secuencias alineadas frente a los ARNm para el caso de los transcriptomas son muy buenos (>60%). De hecho, la gran mayoría de dichas secuencias (alrededor del 85%) mapean correctamente en pares, lo cual apoya la buena calidad de la biblioteca *paired-end* de secuenciación construida, y la referencia utilizada. Por ejemplo, si se utilizara una referencia no actualizada, quizás muchas lecturas mapearían en pares rotos ya que algunas estructuras génicas no estarían contempladas en la referencia. De todas maneras, el 15% de lecturas que mapean en pares rotos pueden deberse fundamentalmente a variantes e isoformas génicas no presentes en la referencia.

Sin embargo, casi un 40% de lecturas no alinean a la referencia utilizada (sólo ARNm). Esto puede deberse a varias razones, entre ellas: secuencias originadas en transcriptos no codificantes de cualquier índole y que se quitaron de la referencia al seleccionar sólo los ARNm, secuencias originadas en cualquier tipo de transcripto no descrito aún en la referencia utilizada, ó secuencias basura producidas durante la secuenciación. Por ejemplo, si se alinean ambos transcriptomas frente al genoma el porcentaje de mapeo aumenta de 62-63% a 73-74% (resultados no mostrados).

Respecto a los valores de mapeo para los traductomas presentes en la Tabla 1, se obtuvo alrededor de un 85% de contaminación por ARNr. A pesar de representar una gran fracción de la biblioteca, dicho porcentaje se aproxima bastante a lo que se encuentra en la literatura (ejemplos en [86,93,139]), y de hecho es muy similar a los valores obtenidos en el

artículo que se mencionaba antes en la Introducción (ver página 21), donde aplicaron la metodología de *Ribosome Profiling* en células PC12 [100]: de 82 a 90%. Sin considerar las lecturas alineadas a ARNr, se obtuvieron porcentajes de mapeo de 58% y 71%, lo cual son porcentajes aceptables, similares a los obtenidos para los transcriptomas, y también similares a los obtenidos en el artículo que recién se mencionaba, donde varía de 65% a 76%. Como se describió para los transcriptomas, si se mapean las huellas ribosomales frente al genoma, los porcentajes de mapeo ascienden a 87% en ambas condiciones. Más allá del valor del porcentaje en sí, los niveles de mapeo representan una cantidad neta de secuencia que es suficiente para obtener una aproximación de expresión del traductoma celular [139]. Por ejemplo, si se cuenta el número de transcritos con más de  $x$  lecturas mapeadas en cada compartimento, se obtiene un panorama relativo del tamaño de ese compartimento, y se puede estimar la cantidad de transcritos cuyo conteo está por encima del ruido. Este análisis ilustrado en la Figura Suplementaria 11, muestra que para el compartimento transcripcional un conteo de entre 50 y 100 lecturas es suficiente para obtener un transcriptoma robusto con cerca de 9.000 ARNm detectados (ver Figura Suplementaria 11A). Por su parte, en el compartimento traduccional (ver Figura Suplementaria 11B), con conteos de entre 100 y 200 lecturas se generan traductomas con entre 4.000 y 6.000 ARNm, lo cual es un número bastante considerable teniendo en cuenta que la cantidad de lecturas mapeadas en este compartimento no es "alta". Por ejemplo, en [139] definen un traductoma *robusto* con 4.840 transcritos. Cabe mencionar que resultado de haber normalizado los conteos, ambos compartimentos se comportan igual independientemente de la condición biológica estudiada.

## VI. 2 Normalización

Como se mencionó en Materiales y Métodos, el experimento de *Ribosome Profiling* realizado no cuenta con réplicas biológicas. A pesar de esto, los paquetes estadísticos utilizados para los análisis de datos nos permiten realizar una normalización de los conteos sobre cada gen, considerando el tamaño de las muestras.

En ambos casos, tanto DESeq como DESeq2, consideran las dos condiciones biológicas presentadas como réplicas biológicas. Esto se debe a la asunción de que dadas dos condiciones biológicas distintas, solo se espera que una pequeña fracción de los genes se encuentre expresada diferencialmente, mientras que la mayoría de los genes presentan niveles de expresión comparables [113]. De esta manera, se puede calcular la dispersión estimándola de la comparación entre las dos condiciones, como si se estuviera estimando a partir de réplicas. De hecho, la presencia de genes expresados diferencialmente solo genera que la estimación de la dispersión sea aún más alta, de modo tal que el test estadístico puede ser hasta más conservador. Este es un punto a considerar y tener presente, ya que se debe tener en claro cuáles son las asunciones y suposiciones que se hacen al trabajar sin replicas y cuáles son las consecuencias de las mismas. En este caso, se cuenta con la ventaja de poder realizar conclusiones considerando significancias estadísticas, pero la desventaja asociada es que dichas significancias serán solo evidenciadas en casos claros, ya que el test que se aplica es severo por la manera en la que se estima la varianza.

Por otro lado, el paquete DESeq2 aplica otro tipo de normalización, pero esta vez sobre los valores de fold change. Esta normalización tiene como objetivo contrarrestar el efecto de la sobreestimación de los valores de fold change en genes con bajos conteos, ya que cuando esto ocurre repercute considerablemente en el cálculo de los fold change. Por ejemplo, es evidente que no significa lo mismo un fold change igual a 2, si el gen cambia de 1 a 2

lecturas, que si cambia de 100 a 200 o si pasa de 10.000 a 20.000. Esta característica conocida como heterocedasticidad, implica que la varianza de los valores fold change depende de la media. Para remediar este efecto, DESeq2 implementa una estrategia empírica Bayesiana, donde en forma muy resumida, los valores de fold change son comprimidos y centrados en cero. Este encogimiento o contracción de los valores de fold change, que los autores llaman *shrinkage*, es dependiente de la cantidad de información que se tiene para cada gen. De esta manera, los genes con bajos conteos sufrirán una contracción mayor en sus valores de fold change. Estos valores de fold change contraídos, junto con sus errores, son utilizados por los test de expresión diferencial y test estadísticos, para atribuir significancia a los cambios de expresión. Con el objetivo de visualizar el efecto de la contracción en los valores de fold change, la Figura Suplementaria 12 muestra los plots M vs A (se grafican los valores de fold change en función del promedio de expresión) del compartimento transcripcional y traduccional, para los valores de fold change sin contraer y contraídos. Como se puede apreciar (la escala de los ejes verticales es la misma), al aplicar la contracción, los valores de fold change se pegan al eje horizontal de forma considerable. Más allá de que en la presente tesis siempre se utilizaron los valores de fold change sin "contraer", la estadística que aplica DESeq2 toma en cuenta dichos valores junto con sus errores para la búsqueda de DEG, por tanto era necesaria la explicación y discusión anterior.

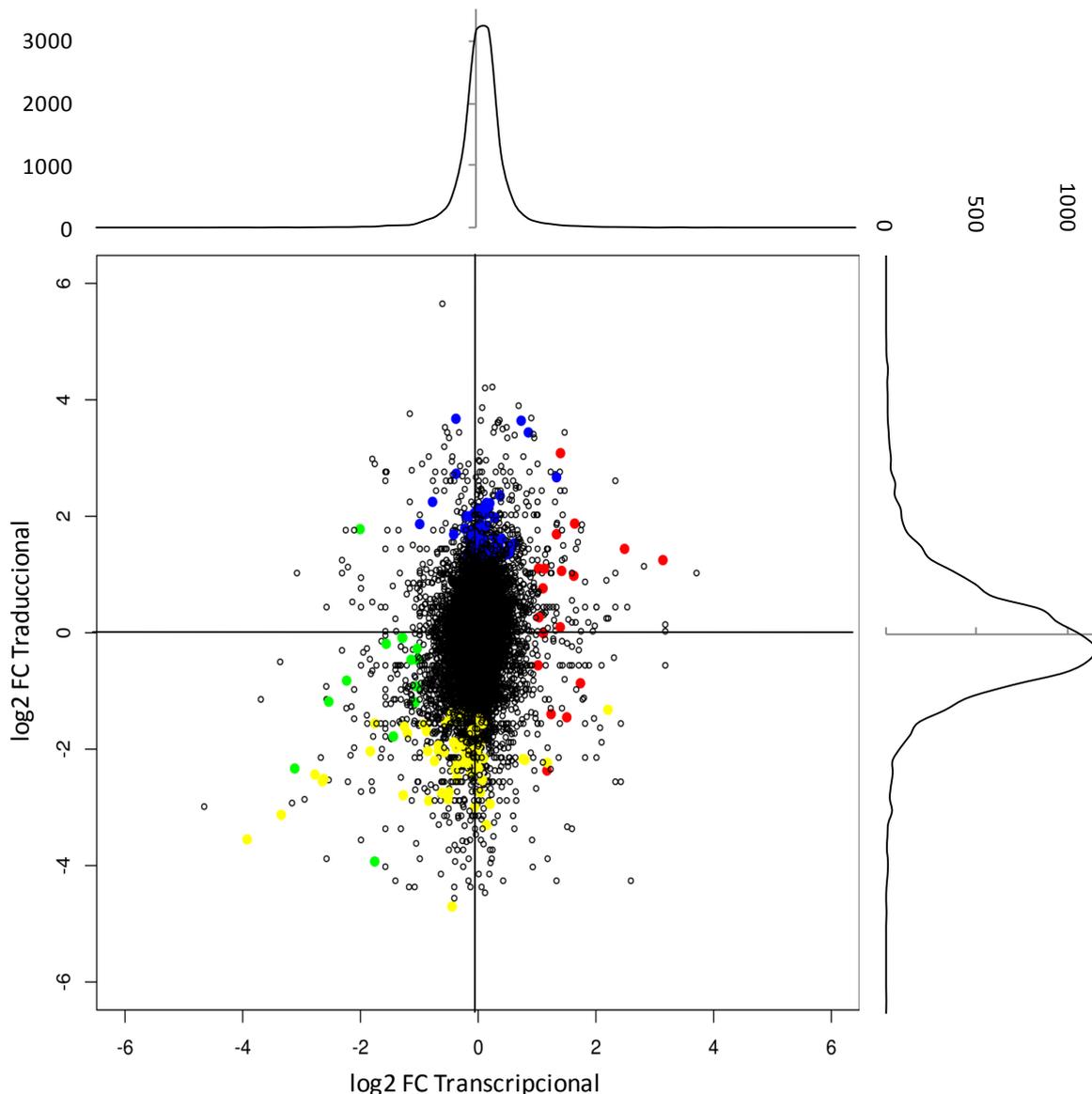
### VI. 3 Regulación traduccional vs regulación transcripcional

Con el objetivo de estudiar la regulación ejercida por parte de PDCD4 en la expresión génica, se realizaron varios tipos de análisis (ver Figuras 27, 28 y 30). En dichos análisis se observaba que el efecto de PDCD4 fue más significativo a nivel traduccional, que transcripcional. Por ejemplo en la Figura 27 se observan más genes detectados

diferencialmente en el traductoma. También, en dicha figura se puede observar que los valores de correlación de Pearson son más altos para los transcriptomas, que para los traductomas. Esto significa, como se mencionó, que los conteos para los traductomas varían más entre ambas condiciones. Pensamos que esto refleja que estamos observando la influencia regulatoria de PDCD4 específica a nivel traduccional, dado que la variación que normalmente se obtiene entre replicas biológicas es menor (ver Figura Suplementaria 13).

La regulación predominantemente traduccional que ejerce PDCD4 también es explícita en las Figuras 28 y 30. De hecho, si construimos una figura en combinación de las dos anteriores el efecto puede ser visualizado de manera más directa (ver Figura 35). En dicha figura se observa mediante un scatter plot como se comportan los valores de fold change traduccional y transcripcional para todos los transcriptos, tal como se mostró en la Figura 30. En primera instancia puede observarse una clara componente vertical en la distribución de la nube de puntos, que forma una especie de ovalo vertical centrado en  $x = 0$ . Esta distribución implica que los cambios en la expresión génica tienden a ocurrir principalmente a nivel traduccional. Esta observación se ve apoyada si se considera lo anterior en conjunto con los histogramas de la distribución de los valores de fold change de cada compartimento, también mostrados en la figura. En dichos histogramas, como se mostró en la Figura 28, se puede apreciar una importante presencia de cambios traduccionales, mientras que a nivel transcripcional la mayoría de los genes presentan valores de fold change muy cercanos a 0 (sin cambios a nivel de expresión).

En la figura 35 también se observan marcados en diferentes colores los genes expresados diferencialmente según DESeq2, para el transcriptoma y traductoma. En este sentido, los genes regulados traduccionalmente (azul y amarillo), tienden a ubicarse sobre la componente vertical  $x = 0$ , mostrando una regulación exclusivamente traduccional. Por su



**Figura 35. Efecto de PDCD4 sobre la regulación traduccional.**

Se grafican los cambios de expresión a nivel traduccional y transcripcional para todos los ARNm. Se indican en color los genes expresados diferencialmente de manera significativa según DESeq2: azul - regulados positivamente a nivel traduccional; amarillo - regulados negativamente a nivel traduccional; rojo - regulados positivamente a nivel transcripcional; verde - regulados negativamente a nivel transcripcional. Para cada eje se muestra, asociado al gráfico de puntos, la distribución de los valores graficados a modo de histograma.

parte los genes regulados transcripcionalmente, además de ser menos, presentan un comportamiento más disperso donde al cambio transcripcional se le ve asociado un cambio también traduccional, posiblemente consecuencia del primero (ver ejemplo en Figura 7)

#### VI. 4 Procesos biológicos regulados traduccionalmente por PDCD4

Al analizar la función biológica de los transcritos regulados por PDCD4, encontramos funciones como transmisión del impulso nervioso y sinapsis. En este punto en particular, aparecen en la lista de posibles blancos, varios genes vinculados a los procesos sinápticos que sin duda despiertan nuestro interés. Algunos ejemplos son: SYN1 y SYN2 (sinapsina I y II), SYT3 (sinaptogamin III), NLGN3 (neuroligina 3). La presencia de estos genes en la lista de posibles blancos, así como la presencia de funciones asociadas a la sinapsis reflejadas en los estudios de ontología, nos indica un posible rol de PDCD4 como regulador de eventos asociados a la sinapsis, controlando algunos de los eventos traduccionales propios de dicho proceso neuronal. La vinculación de la regulación de eventos sinápticos con la regulación traduccional ya ha sido documentada en la literatura científica (ejemplos en [140,141]) y apoya la idea de que PDCD4 puede estar efectivamente ejerciendo un rol como regulador traduccional en la sinapsis.

Por otro lado, dentro de los clúster de funciones biológicas detectados, aparecen clústers relacionados a la respuesta inmune y a la respuesta inflamatoria. Como ya se había visto en la lista de blancos generada en el modelo tumoral [92], PDCD4 parece tener un rol en la regulación de la respuesta inmune y en la producción de citoquinas pro-inflamatorias. En aquel momento, nuestro grupo planteaba un posible rol de PDCD4 en el control de la respuesta inmune mediada por interferón tipo I [109]. Este mecanismo, que fuera luego confirmado por un artículo publicado en 2012 [110], sentó el primer antecedente vinculando a PDCD4 con la respuesta inmune.

A partir de dicho momento, han surgido varios trabajos donde se vincula el papel regulador traduccional de PDCD4 con la respuesta inmune y la producción de una respuesta

pro-inflamatoria, por ejemplo se plantea que PDCD4 es el encargado de mantener el balance entre la inflamación y la formación de tumor [110,142].

Aquí en la lista producida aparecen varios genes que podrían evidenciar este papel de PDCD4, por ejemplo: IRF7, IRF4 y STAT5A. Por ejemplo, se ha visto que IRF7 presenta un 5'-UTR muy estructurado y evolutivamente conservado, el cual inhibe su traducción [143]. En este contexto, IRF7 parece ser un serio candidato a vincular el control traduccional ejercido por PDCD4 y la regulación de la respuesta inmune. De hecho, la vinculación entre los mecanismos de control traduccional y la activación de IRF7 ya ha sido descrita en la literatura [143] (ver Figura Suplementaria 14), aunque sin involucrar a PDCD4.

Otro aspecto que llama la atención es la abundante presencia de procesos y funciones asociados a la mitocondria, vinculando a PDCD4 con el control de los procesos metabólicos que allí ocurren, como la producción de energía y la fosforilación oxidativa, aspecto que hasta el momento no había sido descrito para PDCD4. Más allá de que PDCD4 pueda estar regulando los procesos asociados a la apoptosis que involucran a la mitocondria (dado que PDCD4 regula los procesos de muerte celular programada), las funciones específicas que puede estar llevando adelante regulando varios genes de las familias citocromo oxidasa C y NADH deshidrogenasa, entre otras, resta por ser aclarada y descrita en mayor profundidad. En este sentido, como se discutirá a continuación, es posible asociar la regulación que ejerce PDCD4 sobre la mitocondria y los procesos de producción de energía, con el crecimiento neurítico de la siguiente manera: en ausencia de PDCD4 se observa un mayor crecimiento neurítico que debe ser sustentado con energía disponible aportada por las mitocondrias. Al respecto, nuestro grupo ha observado que tras lesionar nervios periféricos de ratas, se observa una caída en la expresión de PDCD4 [144] y un aumento considerable del número de ARNm mitocondriales en el cabo proximal [145].

Es importante señalar también que en los últimos años se han asociado disfunciones mitocondriales a muchas de las enfermedades neurodegenerativas (ejemplo en [146]). Por esto, es que en la Tabla 2 se repiten muchos genes en las *pathways* correspondientes a la fosforilación oxidativa, mal de Alzheimer, mal de Huntington y mal de Parkinson. De todas maneras, en cada vía aparecen genes específicos de dicha vía, lo cual parece indicar que su presencia no sea exclusivamente artefactual.

#### VI. 5 Fenotipo asociado al silenciamiento de PDCD4 en células PC12

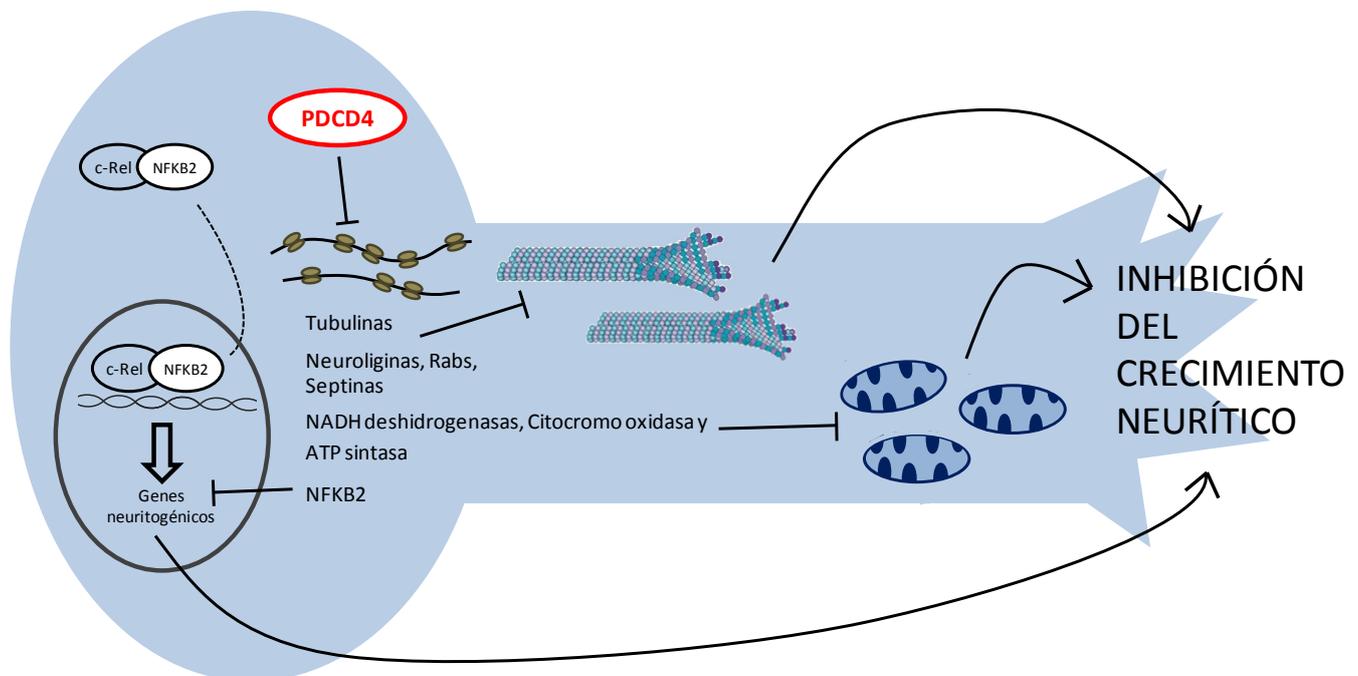
Una vez que se estableció el modelo de silenciamiento inducido de PDCD4 en células PC12, se estudió el largo de las neuritas que estas células proyectan al diferenciarse como forma de observar si la ausencia de PDCD4 tenía un efecto sobre el fenotipo de estas células. Lo que se observó (ver Figuras 17 y 18), fue que las células donde la expresión de PDCD4 era silenciada, desarrollaban prolongaciones de mayor tamaño que las células control. Esta observación va en línea con otras hipótesis de trabajo en las que estamos investigando, en las cuales planteamos que PDCD4 regula específicamente procesos como el crecimiento axonal y la regeneración luego de inducida una lesión. También, otros resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con dichas hipótesis, por ejemplo el hecho de que a medida que progresa la diferenciación neuronal la expresión de PDCD4 tiende a disminuir, y que al silenciar por completo la expresión de este factor, las neuritas proyectadas son más largas. Adicionalmente, en experimentos preliminares del laboratorio hemos observado efectos similares en cultivos primarios de neuronas provenientes de ganglios embrionarios de la raíz dorsal creciendo *in vitro*, donde el silenciamiento de PDCD4 aumenta el largo de los axones creciendo en cámaras compartimentalizadas (tesis de Maestría de A. Di Paolo - en preparación). En este contexto, la hipótesis que manejamos es que PDCD4 interviene en los

procesos de crecimiento axonal, regulando este proceso de manera negativa. Para que ocurra un óptimo crecimiento axonal debe activarse la síntesis proteica de varios genes, cuya traducción puede estar siendo inhibida por PDCD4. En la lista de posibles blancos traduccionales aparecen varios genes que podrían estar implicados en la base molecular del fenotipo observado. Un caso interesante es el de NFKB2, ya que recientemente se ha asociado el factor NF- $\kappa$ B con el control del crecimiento neurítico y la sobrevivencia en células PC12 [147,148]. Por ejemplo, el grupo de Anouar demostró que en células PC12 diferenciadas con PACAP (por sus siglas en inglés: *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*), el crecimiento neurítico y la sobrevivencia eran promovidas a través de la vía de NF- $\kappa$ B [148]. En particular, los autores demuestran que los miembros del complejo NF- $\kappa$ B que participan mediando estos procesos son c-Rel y NFKB2 (también llamado p52). Este resultado va en línea con lo que aquí observamos, donde PDCD4 regula negativamente el crecimiento neurítico, mediando varios blancos, entre ellos NFKB2/p52.

En este sentido, otros genes presentes en la lista de posibles blancos traduccionales parecen tener funciones que pueden estar asociadas al proceso de crecimiento neurítico que aquí vemos inhibido por PDCD4. Algunos ejemplos son genes asociados al citoesqueleto, como la tubulina (TUBA1B y TUBB4B) y la profilina 1 (PFN1). Una mayor expresión de tubulina es necesaria para extender proyecciones neuríticas ya que dicha molécula es la principal componente del citoesqueleto de microtúbulos. Al respecto se vio que la isoforma  $\beta$ -4B que aquí vemos regulada traduccionalmente por PDCD4, está asociada a microtúbulos más estables que podrían ser necesarios en el desarrollo de las prolongaciones neuríticas [149,150]. Por su parte, la profilina 1 codifica para una proteína que pertenece a una familia de pequeñas proteínas de unión a la actina y que juega un rol importante en la dinámica de la misma contribuyendo a su polimerización [151,152]. Otros genes presentes en la lista de

posibles blancos traduccionales de PDCD4 también han sido asociados a la neuritogénesis, por ejemplo: neuroliginas (NLGN3 [153]), genes de la familia Rabs (RAB33A y RAB31L1 [154-156]) y de la familia de las septinas (SEPT6, SEPT7 y SEPT9 [157-160]), MT2A [161], entre otros. Vale mencionar que en todos los casos anteriores, la literatura citada muestra cambios en los genes que ocurren en el mismo sentido respecto a la neuritogénesis que los que observamos en la presente tesis.

En resumen, el efecto negativo de PDCD4 sobre el crecimiento neurítico mediando varios factores de regulación está ilustrado en forma esquemática en la Figura 36.



**Figura 36. Modelo propuesto del efecto de PDCD4 sobre el crecimiento neurítico.**

El modelo muestra una célula tipo neuronal donde se observa el efecto negativo de PDCD4 sobre la traducción. Se muestran algunos de los genes regulados negativamente por PDCD4 y su función celular. La integración de estas funciones, inhibidas en parte por la acción de PDCD4, es la que aquí proponemos determina la inhibición del crecimiento neurítico.

## **VII CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Las principales conclusiones obtenidas en la presente tesis son las siguientes:

- Se observó el efecto traduccional ejercido por PDCD4 en un modelo neuronal celular (PC12) mediante el protocolo de *Ribosome Profiling*. Mediante dicha estrategia se pudo observar una mayor cantidad de genes expresados diferencialmente en el traductoma, respecto del transcriptoma. También se observó una mayor dispersión en los valores de fold change traduccionales, lo cual refleja que el compartimento traduccional es el que se ve más afectado al silenciar el factor PDCD4.

- Al analizar la ontología de la lista de 480 ARNm candidatos a ser blancos traduccionales de PDCD4, se observaron principalmente funciones biológicas asociadas a la mitocondria, cadena respiratoria y fosforilación oxidativa, junto con otras funciones como la síntesis proteica y procesos asociados al ribosoma, apoptosis neuronal y sinapsis.

- Se observó también que al silenciar PDCD4 en células PC12 diferenciando a neuronas bajo la influencia de NGF, las prolongaciones que éstas células proyectan son de mayor tamaño (1,6 veces más). Al analizar este resultado junto con la lista de blancos traduccionales encontrados, hemos planteado una hipótesis capaz de explicar cómo PDCD4 regula el crecimiento neurítico en este tipo celular. Particularmente, pensamos que PDCD4 modula proteínas del citoesqueleto y de anclaje necesarias para la neuritogénesis (TUBB4B, NLGN3, RAB33A, SEPT6, 7 y 9), así como genes de la cadena respiratoria mitocondrial necesarios para abastecer de energía celular a los procesos de crecimiento neurítico. También encontramos otros genes regulados por PDCD4, como NFKB2 y MT2A, asociados de forma directa al crecimiento neurítico en modelos celulares como PC12 y otros.

Sin dudas que estas conclusiones acerca del rol que puede ejercer PDCD4 en modelos neuronales plantean nuevas interrogantes a futuro y abren un abanico de perspectivas. Por ejemplo, entender en forma más precisa que papel cumple PDCD4 en la regulación de los procesos mitocondriales, sinapsis y hasta en enfermedades complejas como el Alzheimer. También, parece establecerse de forma concreta el papel de PDCD4 como factor pro-inflamatorio, ya descrito en la literatura, por lo que restaría vincular sus funciones en estos procesos con algún gen en particular, por ejemplo IRF7, IRF4, ó IRF9.

Respecto a los posibles blancos traduccionales de PDCD4 encontrados, surgen varios análisis posibles para realizar. Por ejemplo, estudiar la presencia de estructuras secundarias comunes a los 5'-UTRs de dichos blancos. Estas estructuras podrían regular la interacción de PDCD4 con los ARNm y la consecuente inhibición del complejo de pre-iniciación de la traducción. Nuevos experimentos podrían diseñarse donde utilizando las estructuras secundarias de ARN encontradas se inhiba la expresión de un gen reportero por parte de PDCD4, a los efectos de comprobar dicha relación.

Otro tipo de análisis posibles de realizar con la lista de posibles blancos es estudiar alguno de ellos de forma individual para entender y comprobar el efecto de regulación traduccional que ejerce PDCD4 sobre éstos. En tal sentido estamos desarrollando la cuantificación mediante qRT-PCR de genes específicos sobre las distintas fracciones de polisomas separados en gradientes de sacarosa en relación al silenciamiento de PDCD4.

También parece interesante estudiar la condición opuesta a la estudiada aquí en la presente tesis: sobre-expresar PDCD4 en el mismo modelo y observar que ocurre con el comportamiento traduccional y con el crecimiento neurítico.

Por otra parte, la disponibilidad del modelo desarrollado, donde somos capaces de realizar ensayos de silenciamiento puntuales y controlados en el tiempo, nos aporta grandes

ventajas a la hora de intentar comprender las funciones que cumple PDCD4. En este sentido, el estudio del fenotipo neuronal asociado al silenciamiento de PDCD4 es un ejemplo de línea de investigación que puede desarrollarse en base a los resultados obtenidos en la presente tesis, para así comprender en forma más profunda la relación entre PDCD4 y el crecimiento neurítico.

De igual manera, la herramienta lentiviral con la que contamos también nos puede permitir diseñar otros experimentos de transfección sobre otro sustrato biológico, por ejemplo cultivos neuronales primarios, a los efectos de estudiar las funciones de PDCD4 mediante otro tipo de metodologías pero en un modelo más similar a neuronas *in vivo*.

En último lugar, la puesta a punto de esta metodología ha traído aparejados aspectos muy positivos para mi formación, dado que ha propiciado el establecimiento de colaboraciones con otros grupos y temas de trabajo. Por ejemplo, destaco mi participación en una publicación de mi grupo de trabajo donde se aplican conceptos y metodologías presentadas en esta tesis para estudiar el rol de la regulación traduccional en la diferenciación de *Trypanosoma cruzi* (ver publicación adjunta en Anexo).

## **VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Larsson O, Tian B and Sonenberg N. *Toward a Genome-Wide Landscape of Translational*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Jan 1;5(1):a012302. doi: 10.1101/cshperspect.a012302.
- [2] Larsson O, Nadon R. *Gene expression - time to change point of view?* Biotechnol Genet Eng Rev. 2008;25:77-92.
- [3] Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo JR. *RNA trafficking in axons*. Traffic. 2006 May;7(5):508-15.
- [4] Kim E, Jung H. *Local protein synthesis in neuronal axons: why and how we study*. BMB Rep. 2015 Mar;48(3):139-46.
- [5] Holt CE, Schuman EM. *The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons*. Neuron. 2013 Oct 30;80(3):648-57. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.036.
- [6] Perry RB, Fainzilber M. *Local translation in neuronal processes--in vivo tests of a "heretical hypothesis"*. Dev Neurobiol. 2014 Mar;74(3):210-7. doi: 10.1002/dneu.22115. Epub 2013 Oct 11.
- [7] Crispino M, Chun JT, Cefaliello C, Perrone-Capano C, Giuditta A. *Local gene expression in nerve endings*. Dev Neurobiol. 2014 Mar;74(3):279-91. doi: 10.1002/dneu.22109. Epub 2013 Sep 17.
- [8] Wells DG. *mRNA translation: regulating an out of soma experience*. Curr Opin Cell Biol. 2012 Aug;24(4):554-7. doi: 10.1016/j.ceb.2012.06.005. Epub 2012 Jul 6.
- [9] Jung H, Yoon BC, Holt CE. *Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair*. Nat Rev Neurosci. 2012 Apr 13;13(5):308-24. doi: 10.1038/nrn3210.
- [10] LaRonde-LeBlanc N, Santhanam AN, Baker AR, Wlodawer A, Colburn NH. *Structural basis for inhibition of translation by the tumor suppressor Pcd4*. Mol Cell Biol. 2007 Jan;27(1):147-56. Epub 2006 Oct 23.
- [11] Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG, Marintchev A, Wagner G. *PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4;105(9):3274-9. doi: 10.1073/pnas.0712235105. Epub 2008 Feb 22.
- [12] Loh PG, Yang HS, Walsh MA, Wang Q, Wang X, Cheng Z, Liu D, Song H. *Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4*. EMBO J. 2009 Feb 4;28(3):274-85. doi: 10.1038/emboj.2008.278. Epub 2009 Jan 15.
- [13] Narasimhan M, Rathinam M, Riar A, Patel D, Mummidi S, Yang HS, Colburn NH, Henderson GI, Mahimainathan L. *Programmed cell death 4 (PDCD4): a novel player in ethanol-mediated suppression of protein translation in primary cortical neurons and developing cerebral cortex*. Alcohol Clin Exp Res. 2013 Jan;37(1):96-109. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01850.x. Epub 2012 Jul 3.
- [14] Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Vedpathak D, Mummidi S, Henderson GI, Mahimainathan L. *Ethanol-induced transcriptional activation of programmed cell death 4 (Pcd4) is mediated by GSK-3 $\beta$  signaling in rat cortical neuroblasts*. PLoS One. 2014 May 16;9(5):e98080. doi: 10.1371/journal.pone.0098080. eCollection 2014.
- [15] Hack CJ. *Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead*. Brief Funct Genomic Proteomic. 2004 Nov;3(3):212-9.
- [16] Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. *Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes*. Cell. 2011 Nov 11;147(4):789-802. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002. Epub 2011 Nov 3.
- [17] Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slompo EP, Garat B, Goldenberg S, Munroe DJ, Dallagiovanna B, Holetz F, Sotelo-Silveira JR. *Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics. 2015 Jun 9;16:443. doi: 10.1186/s12864-015-1563-8.
- [18] Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV. *Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes*. Cell. 2007; 131:286-299
- [19] Sonenberg N, Hinnebusch AG. *Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets*. Cell. 2009 Feb 20;136(4):731-45. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042.
- [20] Richter JD, Collier J. *Pausing on Polyribosomes: Make Way for Elongation in Translational Control*. Cell. 2015 Oct 8;163(2):292-300. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.041.
- [21] Mata J, Marguerat S, Bähler J. *Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective*. Trends Biochem Sci. 2005 Sep;30(9):506-14.
- [22] Gebauer F, Hentze MW. *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Oct;5(10):827-35.

- [23] MacNicol MC, Cragle CE, Arumugam K, Fosso B, Pesole G, MacNicol AM. *Functional Integration of mRNA Translational Control Programs*. *Biomolecules*. 2015 Jul 21;5(3):1580-99. doi: 10.3390/biom5031580.
- [24] Munroe D, Jacobson A. *mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation*. *Mol Cell Biol*. 1990 Jul;10(7):3441-55.
- [25] Anderson P, Kedersha N. *RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jun;10(6):430-6. doi: 10.1038/nrm2694.
- [26] Merrick WC. *Overview: mechanism of translation initiation in eukaryotes*. *Enzyme*. 1990;44(1-4):7-16.
- [27] Pickering BM, Willis AE. *The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease*. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Feb;16(1):39-47. Epub 2004 Dec 10.
- [28] Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY. *Control of mammalian translation by mRNA structure near caps*. *RNA*. 2006 May;12(5):851-61. Epub 2006 Mar 15.
- [29] McGeachy AM, Ingolia NT. *Starting too soon: upstream reading frames repress downstream translation*. *EMBO J*. 2016 Apr 1;35(7):699-700. doi: 10.15252/embj.201693946. Epub 2016 Feb 19.
- [30] Hinnebusch AG. *Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast*. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:407-50.
- [31] Pelletier J, Sonenberg N. *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*. *Nature*. 1988 Jul 28;334(6180):320-5.
- [32] Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. *J Virol*. 1988 Aug;62(8):2636-43.
- [33] Komar AA, Hatzoglou M. *Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states*. *Cell Cycle*. 2011 Jan 15;10(2):229-40. Epub 2011 Jan 15.
- [34] Bartel DP. *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [35] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. *Nature*. 2008 Sep 4;455(7209):58-63. doi: 10.1038/nature07228. Epub 2008 Jul 30.
- [36] Topisirovic I, Borden KL. *Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship*. *HistolHistopathol*. 2005 Oct;20(4):1275-84.
- [37] Livingstone M, Atas E, Meller A, Sonenberg N. *Mechanisms governing the control of mRNA translation*. *Phys Biol*. 2010 May 12;7(2):021001. doi: 10.1088/1478-3975/7/2/021001.
- [38] Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G. *Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation*. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):447-60. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.014.
- [39] Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. *Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation*. *Cell BiochemFunct*. 2011 Apr;29(3):227-34. doi: 10.1002/cbf.1740. Epub 2011 Mar 10.
- [40] Topisirovic I, Sonenberg N. *Translational control by the eukaryotic ribosome*. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):333-4. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.006.
- [41] Kondrashov N, Pusic A, Stumpf CR, Shimizu K, Hsieh AC, Xue S, Ishijima J, Shiroishi T, Barna M. *Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning*. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):383-97. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.028.
- [42] Ganapathi KA, Shimamura A. *Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure*. *Br J Haematol*. 2008 May;141(3):376-87. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07095.x.
- [43] Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Elizondo V, Canclini L, Sotelo JR. *Localization of mRNA in vertebrate axonal compartments by in situ hybridization*. *Methods Mol Biol*. 2011;714:125-38. doi: 10.1007/978-1-61779-005-8\_8.
- [44] Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. *Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation*. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(2):545-57. Epub 2007 Oct 24.
- [45] Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. *Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers*. *J Neurosci Res*. 2007 Aug 1;85(10):2087-98.
- [46] Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR. *Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons*. *J Neurobiol*. 2004 Aug;60(2):187-96.
- [47] Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Benech JC, Sanguinetti C, Chalar C, Sotelo JR. *Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve*. *J Neurosci Res*. 2000 Oct 1;62(1):65-74.

- [48] Sotelo JR, Kun A, Benech JC, Giuditta A, Morillas J, Benech CR. *Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: an immunocytochemical study*. Neuroscience. 1999 May;90(2):705-15.
- [49] Kandel ER. *The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses*. Biosci Rep. 2001 Oct;21(5):565-611.
- [50] Malenka RC, Bear MF. *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. Neuron. 2004 Sep 30;44(1):5-21.
- [51] Davis HP, Squire LR. *Protein synthesis and memory: a review*. Psychol Bull. 1984 Nov;96(3):518-59.
- [52] Matthies H. *In search of cellular mechanisms of memory*. ProgNeurobiol. 1989;32(4):277-349.
- [53] Sutton MA, Schuman EM. *Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory*. Cell. 2006 Oct 6;127(1):49-58.
- [54] Gal-Ben-Ari S, Kenney JW, Ounalla-Saad H, Taha E, David O, Levitan D, Gildish I, Panja D, Pai B, Wibrand K, Simpson TI, Proud CG, Bramham CR, Armstrong JD, Rosenblum K. *Consolidation and translation regulation*. Learn Mem. 2012 Aug 16;19(9):410-22. doi: 10.1101/lm.026849.112.
- [55] Henderson C, Wijetunge L, Kinoshita MN, Shumway M, Hammond RS, Postma FR, Brynczka C, Rush R, Thomas A, Paylor R, Warren ST, Vanderklish PW, Kind PC, Carpenter RL, Bear MF, Healy AM. *Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen*. SciTransl Med. 2012 Sep 19;4(152):152ra128.
- [56] El Fatimy R, Tremblay S, Dury AY, Solomon S, De Koninck P, Schrader JW, Khandjian EW. *Fragile X mental retardation protein interacts with the RNA-binding protein Caprin1 in neuronal RiboNucleoProtein complexes*. PLoS One. 2012;7(6):e39338. doi: 10.1371/journal.pone.0039338. Epub 2012 Jun 21.
- [57] Niere F, Wilkerson JR, Huber KM. *Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression*. J Neurosci. 2012 Apr 25;32(17):5924-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4650-11.2012.
- [58] Wang T, Bray SM, Warren ST. *New perspectives on the biology of fragile X syndrome*. Curr Opin Genet Dev. 2012 Jun;22(3):256-63. doi: 10.1016/j.gde.2012.02.002. Epub 2012 Feb 28.
- [59] Pei JJ, Hugon J. *mTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease*. J Cell Mol Med. 2008 Dec;12(6B):2525-32. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00509.x.
- [60] Santini E, Heiman M, Greengard P, Valjent E, Fisone G. *Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia*. Sci Signal. 2009 Jul 21;2(80):ra36. doi: 10.1126/scisignal.2000308.
- [61] Deguil J, Perault-Pochat MC, Chavant F, Lafay-Chebassier C, Fauconneau B, Pain S. *Activation of the protein p70S6K via ERK phosphorylation by cholinergic muscarinic receptors stimulation in human neuroblastoma cells and in mice brain*. ToxicolLett. 2008 Nov 10;182(1-3):91-6. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.08.012. Epub 2008 Sep 2.
- [62] Weatherill DB, McCamphill PK, Pethoukov E, Dunn TW, Fan X, Sossin WS. *Compartment-specific, differential regulation of eukaryotic elongation factor 2 and its kinase within Aplysia sensory neurons*. J Neurochem. 2011 Jun;117(5):841-55. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07251.x. Epub 2011 Apr 7.
- [63] Dagestad G, Kuipers SD, Messaoudi E, Bramham CR. *Chronic fluoxetine induces region-specific changes in translation factor eIF4E and eEF2 activity in the rat brain*. Eur J Neurosci. 2006 May;23(10):2814-8.
- [64] Shibahara K, Asano M, Ishida Y, Aoki T, Koike T, Honjo T. *Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death*. Gene. 1995 Dec 12;166(2):297-301.
- [65] Lankat-Buttgereit B, Goke R. *The tumor suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation*. Biol Cell. 2009 Jun;101(6):309-17. doi: 10.1042/BC20080191.
- [66] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64031>
- [67] Song X, Zhang X, Wang X, Zhu F, Guo C, Wang Q, Shi Y, Wang J, Chen Y, Zhang L. *Tumor suppressor gene PDCD4 negatively regulates autophagy by inhibiting the expression of autophagy-related gene ATG5*. Autophagy. 2013 May;9(5):743-55. doi: 10.4161/auto.24069. Epub 2013 Mar 13.
- [68] Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. *S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth*. Science. 2006 Oct 20;314(5798):467-71.
- [69] Frampton AE, Castellano L, Colombo T, Giovannetti E, Krell J, Jacob J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Funel N, Gall TM, De Giorgio A, Pinho FG, Fulci V, Britton DJ, Ahmad R, Habib NA, Coombes RC, Harding V, Knösel T, Stebbing J, Jiao LR. *MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression*. Gastroenterology. 2014 Jan;146(1):268-77.e18. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.010. Epub 2013 Oct 9.
- [70] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. Oncogene. 2008 Apr 3;27(15):2128-36. Epub 2007 Oct 29.

- [71] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. *Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.* J Biol Chem. 2008 Jan 11;283(2):1026-33. Epub 2007 Nov 8.
- [72] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, Li J, Li X, Zhou L, Huang Y. *miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma.* Oncol Rep. 2012 May;27(5):1660-8. doi: 10.3892/or.2012.1682. Epub 2012 Feb 9.
- [73] Bitomsky N, Böhm M, Klempnauer KH. *Transformation suppressor protein Pdc4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun.* Oncogene. 2004 Sep 30;23(45):7484-93.
- [74] Yang HS, Knies JL, Stark C, Colburn NH. *Pdc4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation.* Oncogene. 2003 Jun 12;22(24):3712-20.
- [75] Leupold JH, Yang HS, Colburn NH, Asangani I, Post S, Allgayer H. *Tumor suppressor Pdc4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors.* Oncogene. 2007 Jul 5;26(31):4550-62. Epub 2007 Feb 12.
- [76] Shiota M, Izumi H, Tanimoto A, Takahashi M, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Hirano G, Masubuchi D, Fukunaka Y, Yasuniwa Y, Naito S, Nishizawa S, Sasaguri Y, Kohno K. *Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth.* Cancer Res. 2009 Apr 1;69(7):3148-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2334. Epub 2009 Mar 24.
- [77] Bitomsky N, Wethkamp N, Marikkannu R, Klempnauer KH. *siRNA-mediated knockdown of Pdc4 expression causes upregulation of p21 Waf1/Cip1 expression.* Oncogene. 2008 Aug 14;27(35):4820-9. doi: 10.1038/onc.2008.115. Epub 2008 Apr 21.
- [78] Wedeken L, Ohnheiser J, Hirschi B, Wethkamp N, Klempnauer KH. *Association of Tumor Suppressor Protein Pdc4 With Ribosomes Is Mediated by Protein-Protein and Protein-RNA Interactions.* Genes Cancer. 2010 Mar;1(3):293-301. doi: 10.1177/1947601910364227.
- [79] Waters LC, Strong SL, Ferlemann E, Oka O, Muskett FW, Veverka V, Banerjee S, Schmedt T, Henry AJ, Klempnauer KH, Carr MD. *Structure of the tandem MA-3 region of Pdc4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: molecular mechanisms of a tumor suppressor.* J Biol Chem. 2011 May 13;286(19):17270-80. doi: 10.1074/jbc.M110.166157. Epub 2011 Mar 16.
- [80] Singh P, Wedeken L, Waters LC, Carr MD, Klempnauer KH. *Pdc4 directly binds the coding region of c-myc mRNA and suppresses its translation.* Oncogene. 2011 Dec 8;30(49):4864-73. doi: 10.1038/onc.2011.202. Epub 2011 Jun 6.
- [81] Eto K, Goto S, Nakashima W, Ura Y, Abe SI. *Loss of programmed cell death 4 induces apoptosis by promoting the translation of procaspase-3 mRNA.* Cell Death Differ. 2012 Apr;19(4):573-81. doi: 10.1038/cdd.2011.126. Epub 2011 Sep 30.
- [82] Wedeken L, Singh P, Klempnauer KH. *Tumor suppressor protein Pdc4 inhibits translation of p53 mRNA.* J Biol Chem. 2011 Dec 16;286(50):42855-62. doi: 10.1074/jbc.M111.269456. Epub 2011 Oct 27.
- [83] Biyanee A, Ohnheiser J, Singh P, Klempnauer KH. *A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation.* Oncogene. 2015 Mar 12;34(11):1384-92. doi: 10.1038/onc.2014.83. Epub 2014 Mar 31.
- [84] Fehler O, Singh P, Haas A, Ulrich D, Müller JP, Ohnheiser J, Klempnauer KH. *An evolutionarily conserved interaction of tumor suppressor protein Pdc4 with the poly(A)-binding protein contributes to translation suppression by Pdc4.* Nucleic Acids Res. 2014;42(17):11107-18. doi: 10.1093/nar/gku800. Epub 2014 Sep 4.
- [85] Di Paolo A, et. al. *Estudio de la distribución de la proteína Pdc4 (reguladora de transcripción y traducción) en distintos dominios neuronales del sistema nervioso central y periférico de rata.* Poster SUB, Neurociencias; Piriápolis, Maldonado, Uruguay (2012).
- [86] Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. *Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling.* Science. 2009 Apr 10;324(5924):218-23. doi: 10.1126/science.1168978. Epub 2009 Feb 12.
- [87] Ingolia NT. *Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome.* Cell. 2016 Mar 24;165(1):22-33. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.066.
- [88] Mouilleron H, Delcourt V, Roucou X. *Death of a dogma: eukaryotic mRNAs can code for more than one protein.* Nucleic Acids Res. 2016 Jan 8;44(1):14-23. doi: 10.1093/nar/gkv1218. Epub 2015 Nov 17.
- [89] Piras V, Tomita M, Selvarajoo K. *Is central dogma a global property of cellular information flow?* Front Physiol. 2012 Nov 23;3:439. doi: 10.3389/fphys.2012.00439. eCollection 2012.
- [90] Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. *The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments.* Nat Protoc. 2012 Jul 26;7(8):1534-50. doi: 10.1038/nprot.2012.086.

- [91] Steitz JA. *Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA*. Nature. 1969 Dec 6;224(5223):957-64.
- [92] Eastman G. *Determinación de blancos traduccionales de PDCD4 (Programmed Cell Death 4) mediante análisis de datos generados por secuenciación masiva de huellas polisomales*. Tesina de Grado. Biblioteca, Facultad de Ciencias - UdelaR, Montevideo, Uruguay (2012).
- [93] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature. 2010 Aug 12;466(7308):835-40. doi: 10.1038/nature09267.
- [94] Li GW, Oh E, Weissman JS. *The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria*. Nature. 2012 Mar 28;484(7395):538-41. doi: 10.1038/nature10965.
- [95] Latif H, Szubin R, Tan J, Brunk E, Lechner A, Zengler K, Palsson BO. *A streamlined ribosome profiling protocol for the characterization of microorganisms*. Biotechniques. 2015 Jun 1;58(6):329-32. doi: 10.2144/000114302. eCollection 2015.
- [96] Vasquez JJ, Hon CC, Vanselow JT, Schlosser A, Siegel TN. *Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different Trypanosoma brucei life cycle stages*. Nucleic Acids Res. 2014 Apr;42(6):3623-37. doi: 10.1093/nar/gkt1386. Epub 2014 Jan 17.
- [97] Jensen BC, Ramasamy G, Vasconcelos EJ, Ingolia NT, Myler PJ, Parsons M. *Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of Trypanosoma brucei*. BMC Genomics. 2014 Oct 20;15:911. doi: 10.1186/1471-2164-15-911.
- [98] Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, Weissman JS. *Decoding human cytomegalovirus*. Science. 2012 Nov 23;338(6110):1088-93. doi: 10.1126/science.1227919.
- [99] Katz Y, Li F, Lambert NJ, Sokol ES, Tam WL, Cheng AW, Airoidi EM, Lengner CJ, Gupta PB, Yu Z, Jaenisch R, Burge CB. *Musashi proteins are post-transcriptional regulators of the epithelial-luminal cell state*. Elife. 2014 Nov 7;3:e03915. doi: 10.7554/eLife.03915.
- [100] Andreev DE, O'Connor PB, Zhdanov AV, Dmitriev RI, Shatsky IN, Papkovsky DB, Baranov PV. *Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes*. Genome Biol. 2015 May 6;16:90. doi: 10.1186/s13059-015-0651-z.
- [101] Angenstein F, Evans AM, Ling SC, Settlage RE, Ficarro S, Carrero-Martinez FA, Shabanowitz J, Hunt DF, Greenough WT. *Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex*. J Biol Chem. 2005 Feb 25;280(8):6496-503. Epub 2004 Dec 13.
- [102] Heyer EE, Moore MJ. *Redefining the Translational Status of 80S Monosomes*. Cell. 2016 Feb 11;164(4):757-69. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.003.
- [103] Ingolia NT. *Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale*. Nat Rev Genet. 2014 Mar;15(3):205-13. doi: 10.1038/nrg3645. Epub 2014 Jan 28.
- [104] Greene LA, Tischler AS. *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Jul;73(7):2424-8.
- [105] Teng KK, Angelastro JM, Cunningham ME, Greene LA. *Cultured PC12 Cells: A Model for Neuronal Function, Differentiation, and Survival*. CELL AND TISSUE CULTURE: ASSORTED TECHNIQUES: Chapter 21: 171-176 (2006).
- [106] Martin TF, Grishanin RN. *PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells*. Methods Cell Biol. 2003;71:267-86.
- [107] Sombers LA, Colliver TL, Ewing AG. *Differentiated PC12 cells: a better model system for the study of the VMAT's effects on neuronal communication*. Ann N Y Acad Sci. 2002 Oct;971:86-8.
- [108] Roth JA, Horbinski C, Higgins D, Lein P, Garrick MD. *Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation*. Neurotoxicology. 2002 Jul;23(2):147-57.
- [109] Eastman G, et. al. *Estudios de ontología de los posibles blancos traduccionales para PDCD4 revelan relaciones con funciones de señalamiento por interferón tipo I y procesos tumorales*. Exposición oral - Bioinformática, SUB. Piriápolis, Maldonado, Uruguay (2012).
- [110] Kroczyńska B, Sharma B, Eklund EA, Fish EN, Platanias LC. *Regulatory effects of programmed cell death 4 (PDCD4) protein in interferon (IFN)-stimulated gene expression and generation of type I IFN responses*. Mol Cell Biol. 2012 Jul;32(14):2809-22. doi: 10.1128/MCB.00310-12. Epub 2012 May 14.
- [111] CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>)
- [112] Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. *The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools*. Bioinformatics, 25, 2078-9 (2009)
- [113] Anders S, Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biol. 2010;11(10):R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106. Epub 2010 Oct 27.

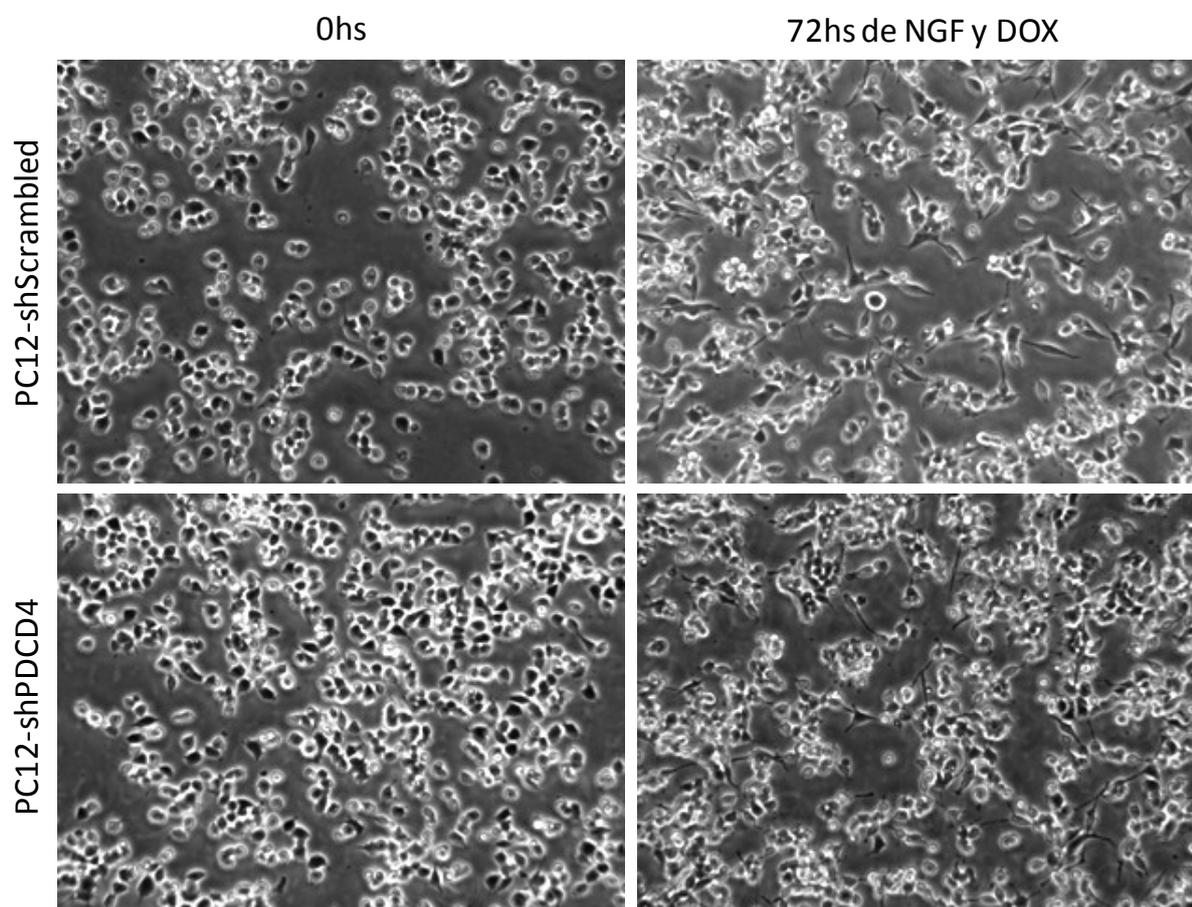
- [114] Love MI, Huber W, Anders S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
- [115] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- [116] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13. doi: 10.1093/nar/gkn923. Epub 2008 Nov 25.
- [117] Moore JM, Papke JB, Cahill AL, Harkins AB. *Stable gene silencing of synaptotagmin I in rat PC12 cells inhibits Ca<sup>2+</sup>-evoked release of catecholamine*. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Aug;291(2):C270-81. Epub 2006 Feb 8.
- [118] Cahill AL, Herring BE, Fox AP. *Stable silencing of SNAP-25 in PC12 cells by RNA interference*. *BMC Neurosci.* 2006 Jan 30;7:9.
- [119] Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- [120] Liu X, Cheng Y, Yang J, Krall TJ, Huo Y, Zhang C. *An essential role of PDCD4 in vascular smooth muscle cell apoptosis and proliferation: implications for vascular disease*. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Jun;298(6):C1481-8. doi: 10.1152/ajpcell.00413.2009. Epub 2010 Mar 31.
- [121] Zhou L, Lim QE, Wan G, Too HP. *Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells*. *BMC Genomics.* 2010 Jan 29;11:75. doi: 10.1186/1471-2164-11-75.
- [122] Parker SS, Mandell EK, Hapak SM, Maskaykina IY, Kusne Y, Kim JY, Moy JK, St John PA, Wilson JM, Gothard KM, Price TJ, Ghosh S. *Competing molecular interactions of aPKC isoforms regulate neuronal polarity*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Aug 27;110(35):14450-5. doi: 10.1073/pnas.1301588110. Epub 2013 Aug 12.
- [123] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. *BMC Mol Biol.* 2006 Jan 31;7:3.
- [124] Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 30;33(6):e56.
- [125] Agilent Publication 5989-1165EN. *RNA Integrity Number (RIN)- Standardization of RNA Quality Control*.
- [126] <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- [127] R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- [128] Quinlan AR, Hall IM. *BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features*. *Bioinformatics.* 2010 Mar 15;26(6):841-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btq033. Epub 2010 Jan 28.
- [129] Arantzazu Rodríguez Asiain. *REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS BRAIN-SPECIFIC KINASES 1 Y 2 (BRSK1 Y BRSK2, TAMBIÉN LLAMADAS SAD QUINASAS) EN LA DIFERENCIACIÓN Y SINAPSIS NEURONALES*. TESIS DOCTORAL Bellaterra, España. (2012).
- [130] Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S. *Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12*. *FEBS Lett.* 1998 Mar 27;425(2):271-6.
- [131] Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. *Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures*. *Neurotoxicol Teratol.* 2004 May-Jun;26(3):397-406.
- [132] Mundy WR, Robinette B, Radio NM, Freudenrich TM. *Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development*. *Toxicology.* 2008 Jul 30;249(2-3):220-9. doi: 10.1016/j.tox.2008.05.012. Epub 2008 May 27.
- [133] Sadri S, Khazaei M, Ghanbari A, Khazaei MR, Shah P. *Neuronal differentiation of PC12 and embryonic stem cells in two- and three-dimensional in vitro culture*. *Indian J Exp Biol.* 2014 Apr;52(4):305-11.
- [134] Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F; French StatOmique Consortium. *A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis*. *Brief Bioinform.* 2013 Nov;14(6):671-83. doi: 10.1093/bib/bbs046. Epub 2012 Sep 17.
- [135] Oshlack A, Wakefield MJ. *Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology*. *Biol Direct.* 2009 Apr 16;4:14. doi: 10.1186/1745-6150-4-14.
- [136] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29752>
- [137] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/192235>

- [138] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/171041>
- [139] Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. *A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation*. Nature. 2012 May 2;485(7396):109-13. doi: 10.1038/nature11083.
- [140] Fernandez-Moya SM, Bauer KE, Kiebler MA. *Meet the players: local translation at the synapse*. Front Mol Neurosci. 2014 Nov 11;7:84. doi: 10.3389/fnmol.2014.00084. eCollection 2014.
- [141] Richter JD, Klann E. *Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation*. Genes Dev. 2009 Jan 1;23(1):1-11. doi: 10.1101/gad.1735809.
- [142] Cohen TS, Prince AS. *Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN $\lambda$  regulation of PDCD4*. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003682. doi: 10.1371/journal.ppat.1003682. Epub 2013 Oct 3.
- [143] Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, Breitbach CJ, Martineau Y, Larsson O, Rong L, Svitkin YV, Makrigiannis AP, Bell JC, Sonenberg N. *Translational control of the innate immune response through IRF-7*. Nature. 2008 Mar 20;452(7185):323-8. doi: 10.1038/nature06730. Epub 2008 Feb 13.
- [144] Di Paolo A. *Análisis de expresión de la Proteína Pdc4 en Sistema Nervioso*. Tesina de Grado. Biblioteca, Facultad de Ciencias - UdelaR, Montevideo, Uruguay (2012).
- [145] Farias J. *Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secuenciación masiva*. Tesis de Maestría - PEDECIBA, Biología, 2014.
- [146] Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. *Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration*. J Neurol Sci. 2012 Nov 15;322(1-2):254-62. doi: 10.1016/j.jns.2012.05.030. Epub 2012 Jun 4.
- [147] Haenold R, Weih F, Herrmann KH, Schmidt KF, Krempler K, Engelmann C, Nave KA, Reichenbach JR, Löwel S, Witte OW, Kretz A. *NF- $\kappa$ B controls axonal regeneration and degeneration through cell-specific balance of RelA and p50 in the adult CNS*. J Cell Sci. 2014 Jul 15;127(Pt 14):3052-65. doi: 10.1242/jcs.140731. Epub 2014 May 23.
- [148] Manecka DL, Mahmood SF, Grumolato L, Lihmann I, Anouar Y. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neurogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL*. J Biol Chem. 2013 May 24;288(21):14936-48. doi: 10.1074/jbc.M112.434597. Epub 2013 Apr 5.
- [149] Tischfield MA, Engle EC. *Distinct alpha- and beta-tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons: new support for the 'multi-tubulin' hypothesis*. Biosci Rep. 2010 Apr 15;30(5):319-30. doi: 10.1042/BSR20100025.
- [150] Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF, Wilson L. *Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91(24):11358-62.
- [151] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64303>
- [152] Rust MB, Kullmann JA, Witke W. *Role of the actin-binding protein profilin1 in radial migration and glial cell adhesion of granule neurons in the cerebellum*. Cell Adh Migr. 2012 Jan-Feb;6(1):13-7. doi: 10.4161/cam.19845.
- [153] Gutierrez RC, Hung J, Zhang Y, Kertesz AC, Espina FJ, Colicos MA. *Altered synchrony and connectivity in neuronal networks expressing an autism-related mutation of neuroligin 3*. Neuroscience. 2009 Aug 4;162(1):208-21. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.062. Epub 2009 May 3.
- [154] Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M, Inagaki N. *Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth*. J Neurosci. 2012 Sep 12;32(37):12712-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0989-12.2012.
- [155] Wang L, Liang Z, Li G. *Rab22 controls NGF signaling and neurite outgrowth in PC12 cells*. Mol Biol Cell. 2011 Oct;22(20):3853-60. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0277. Epub 2011 Aug 17.
- [156] Ayala J, Touchot N, Zahraoui A, Tavitian A, Prochiantz A. *The product of rab2, a small GTP binding protein, increases neuronal adhesion, and neurite growth in vitro*. Neuron. 1990 May;4(5):797-805.
- [157] Xie Y, Vessey JP, Konecna A, Dahm R, Macchi P, Kiebler MA. *The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology*. Curr Biol. 2007 Oct 23;17(20):1746-51. Epub 2007 Oct 11.
- [158] Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M. *Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation*. Nat Commun. 2013;4:2532. doi: 10.1038/ncomms3532.
- [159] Cho SJ, Lee H, Dutta S, Song J, Walikonis R, Moon IS. *Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions*. Mol Cells. 2011 Jul;32(1):89-98. doi: 10.1007/s10059-011-1048-9. Epub 2011 May 2.
- [160] Tada T, Simonetta A, Batterton M, Kinoshita M, Edbauer D, Sheng M. *Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons*. Curr Biol. 2007 Oct 23;17(20):1752-8. Epub 2007 Oct 11.

[161] Chung RS, Vickers JC, Chuah MI, West AK. *Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury*. J Neurosci. 2003 Apr 15;23(8):3336-42.

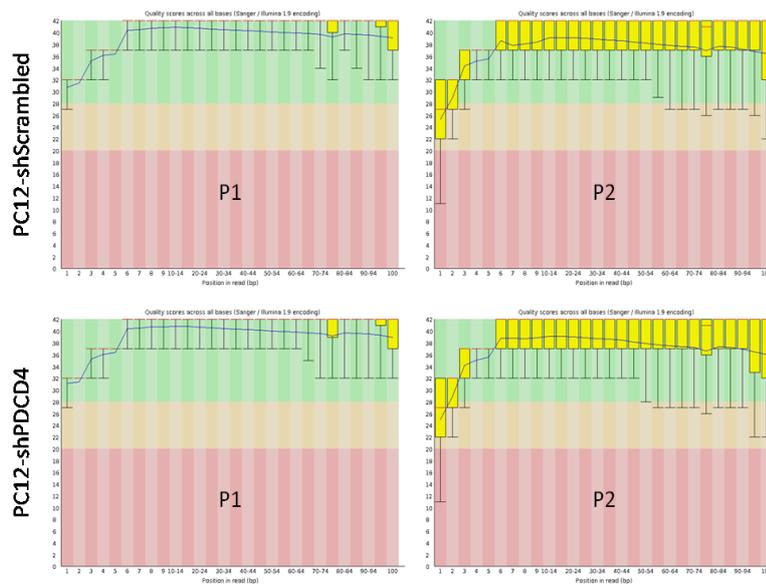
## **IX MATERIAL SUPLEMENTARIO**

A continuación se presenta el Material Suplementario citado antes en el texto.



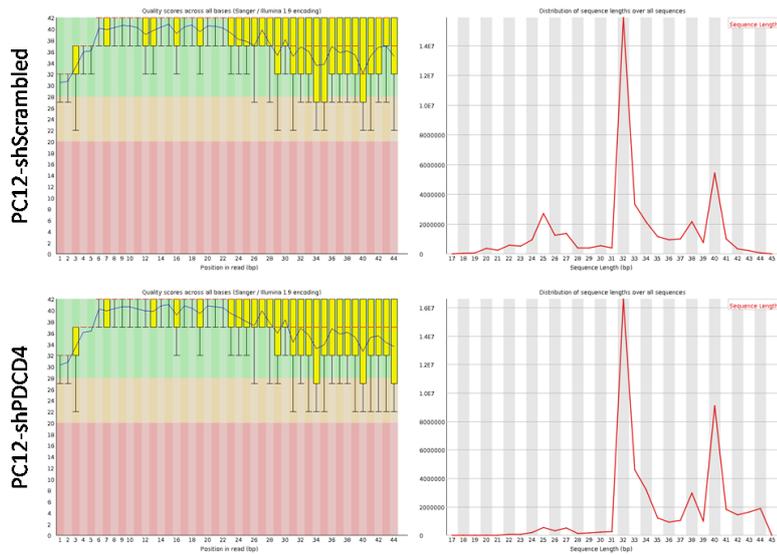
**Figura Suplementaria 1. Fotografías de los cultivos celulares de ambas condiciones biológicas, antes y después del tratamiento de diferenciación neuronal e inducción del silenciamiento.**

Las dos filas representan las dos condiciones biológicas estudiadas: PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4. Mientras que las columnas indican el momento en el cual los cultivos fueron fotografiados: a las 0 hs, antes de iniciar los tratamientos, y a las 72 hs, a tiempo final luego del tratamiento con NGF y doxiciclina.



**Figura Suplementaria 2. Reporte de calidad de las secuencias correspondientes al transcriptoma.**

Se muestran los reportes de calidad por base generados por el software *FastQC*. Para cada una de las condiciones biológicas (PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4) se muestran dos reportes (P1 y P2), cada uno de los cuales corresponde a los fragmentos *forward* y *reverse* de las bibliotecas de secuenciación *paired-end*.

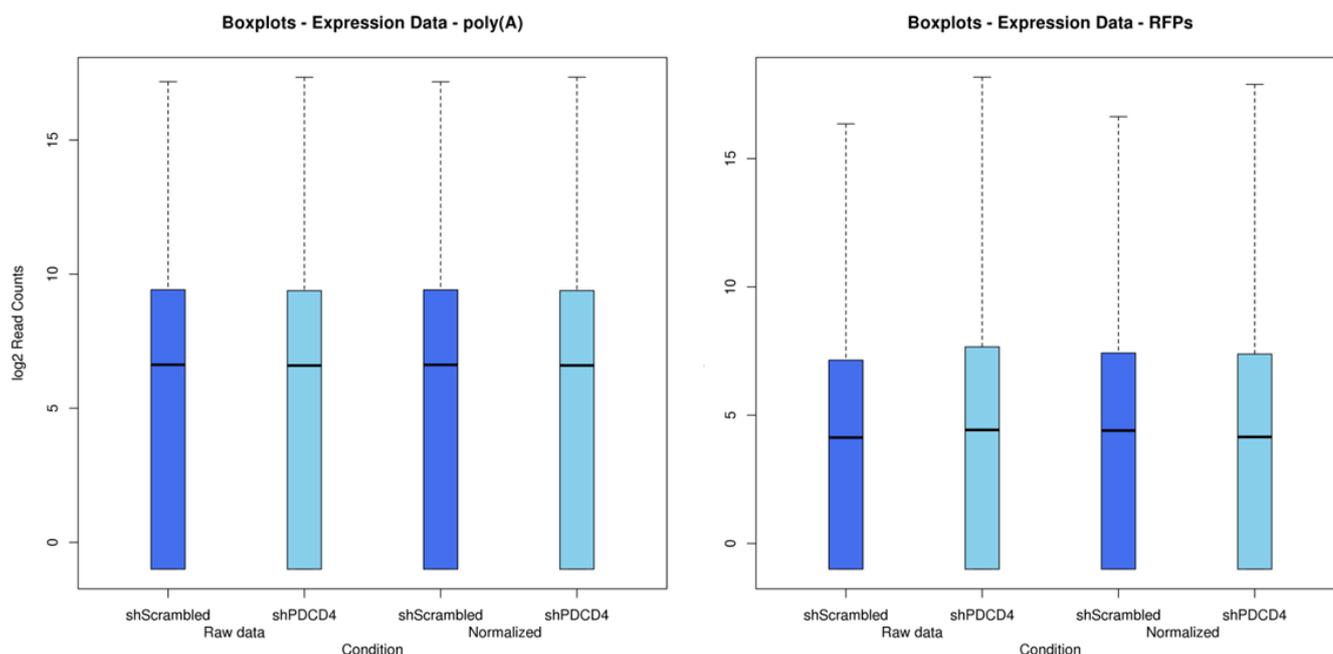


**Figura Suplementaria 3. Reporte de calidad y distribución de tamaños de las huellas polisomales.**

Para cada condición biológica (filas): PC12-shScrambled y PC12-shPDCD4, se muestra: A la izquierda, los reportes de calidad por base, y a la derecha, los histogramas de distribución de los tamaños de los fragmentos secuenciados. Ambos gráficos fueron generados por el software *FastQC*.

## Transcriptomas

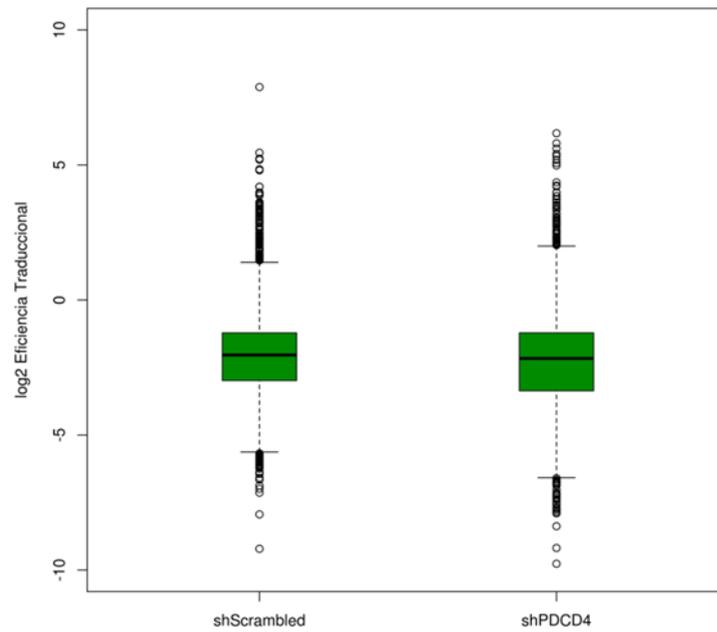
## Traductomas



	Transcriptomas		Traductomas	
	shScrambled	shPDCD4	shScrambled	shPDCD4
<b><i>sizeFactors</i></b>	<b>1,0031008</b>	<b>0,9969088</b>	<b>0,8235053</b>	<b>1,2143213</b>

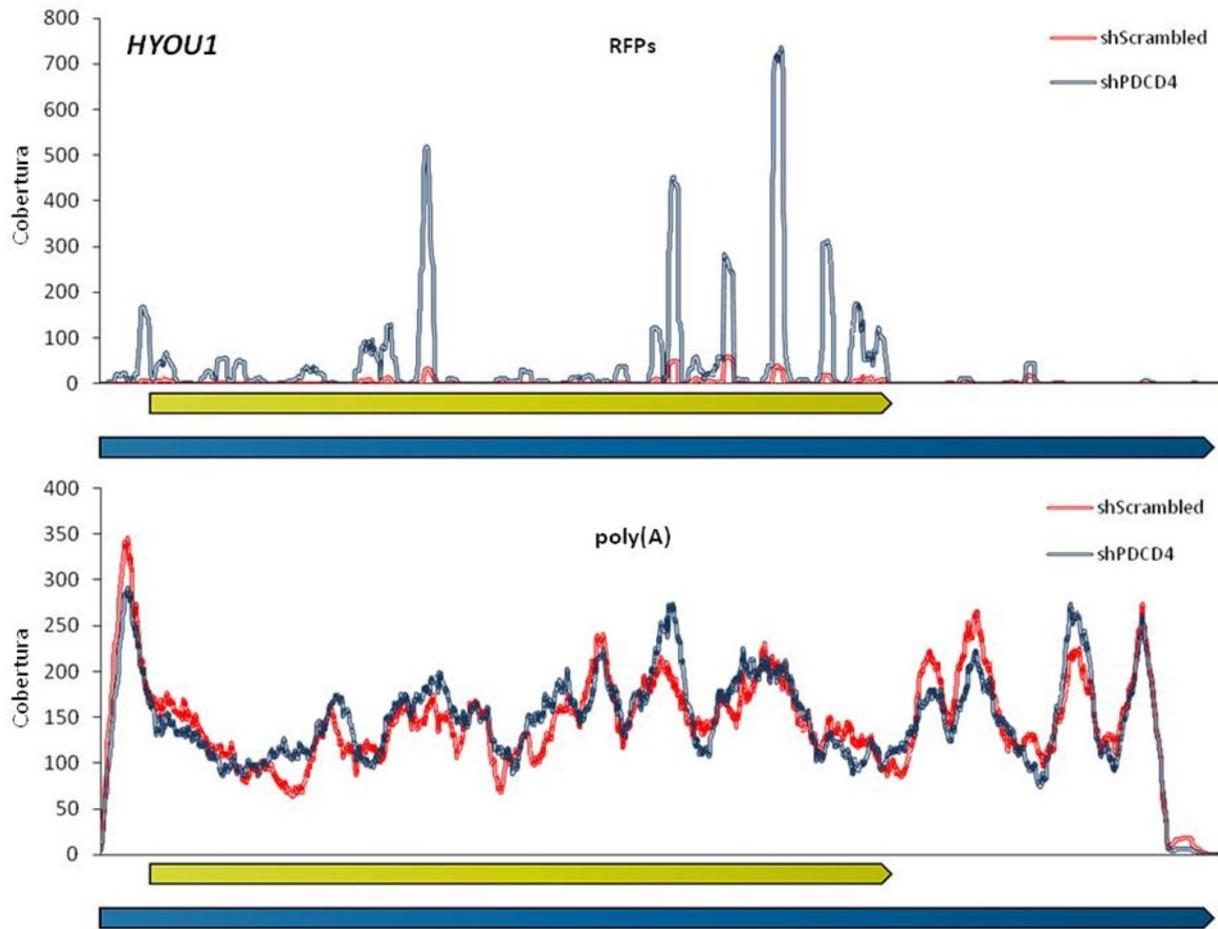
### Figura Suplementaria 4. Efecto de la normalización efectuada por DESeq en los transcriptomas y traductomas.

La figura muestra el efecto de la normalización en los transcriptomas (arriba-izquierda) y en los traductomas (arriba-derecha). En cada caso se muestra la distribución de los conteos, mediante box plots, sin normalizar (primer par) y luego de normalizar (segundo par); para cada condición biológica: shScrambled (azul) y shPDCD4 (celeste). En la parte inferior se muestra mediante una tabla los valores de *size factors* computados por DESeq en la normalización.

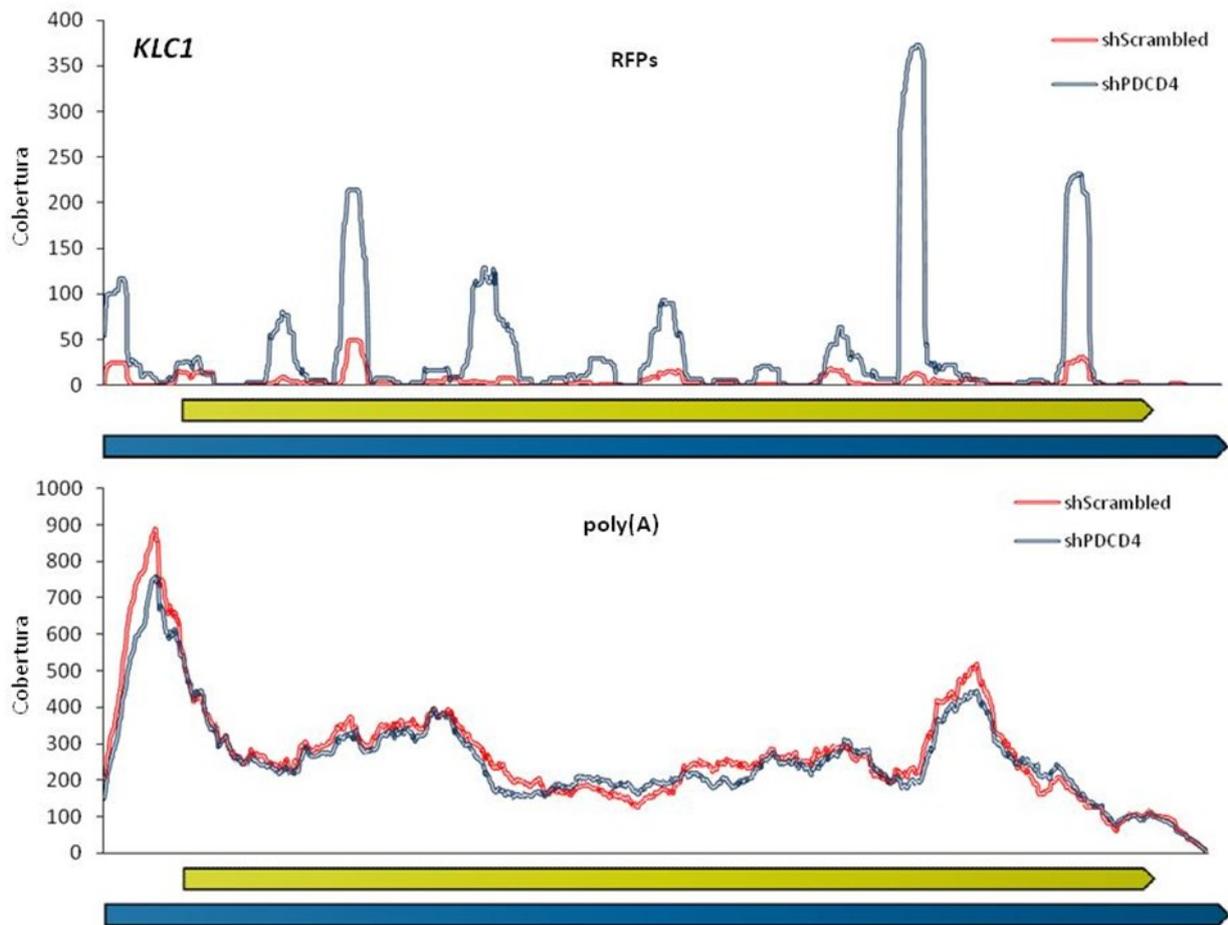


**Figura Suplementaria 5. Distribución de los valores de eficiencia traduccional para las dos condiciones biológicas.**

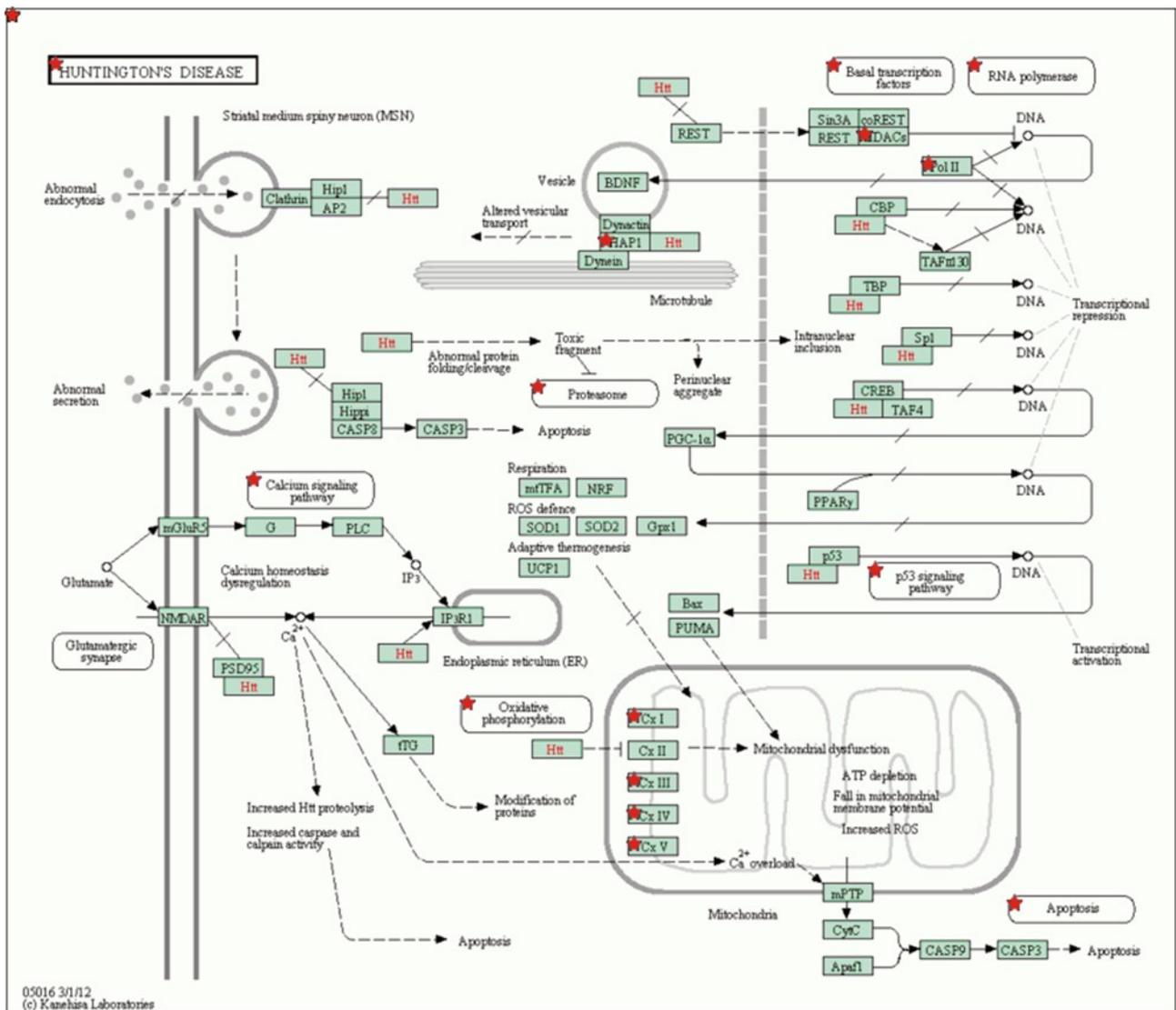
Se muestran los box plots de los valores de eficiencia traduccional para las dos condiciones biológicas estudiadas: shScrambled (izquierda) y shPDCD4 (derecha).



**Figura Suplementaria 6. Mapeos traduccionales y transcripcionales del gen HYOU1 para las dos condiciones biológicas estudiadas. Ídem Figura 31.**

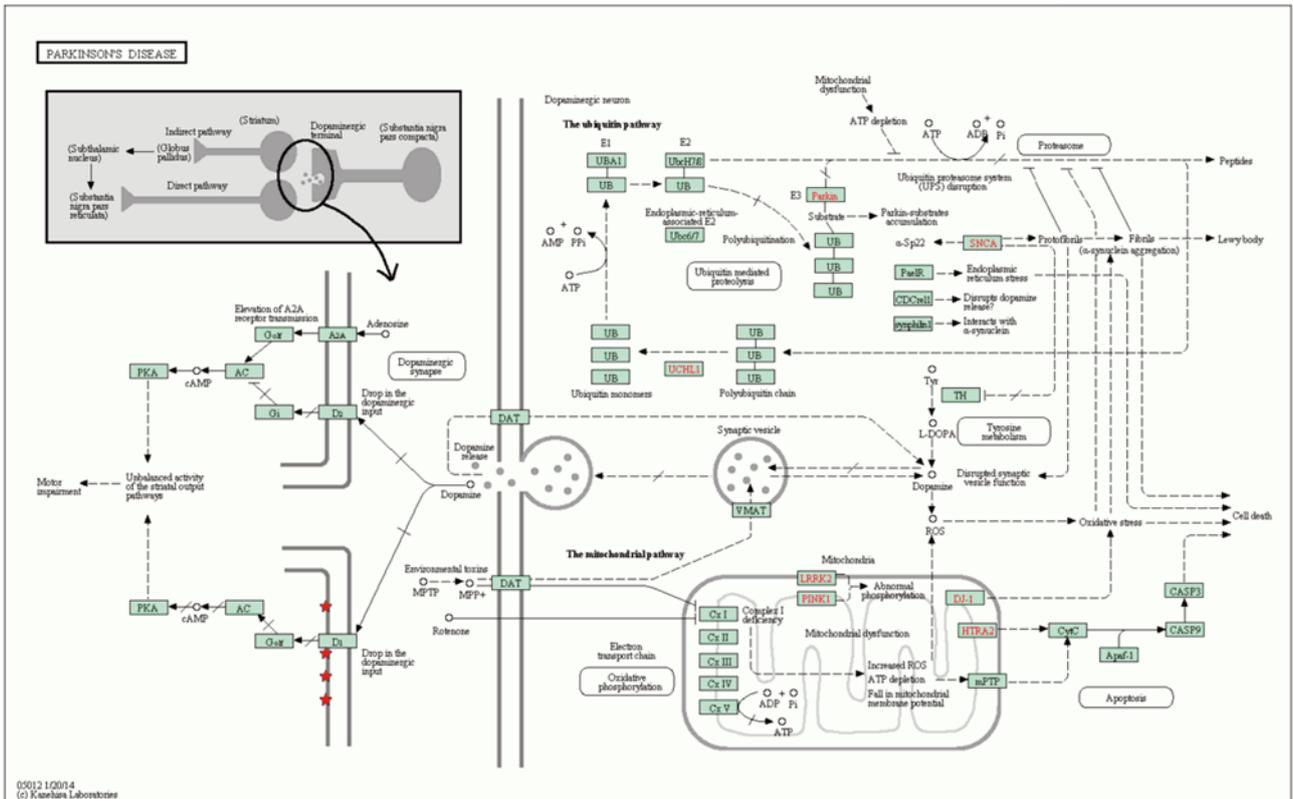


**Figura Suplementaria 7. Mapeos traduccionales y transcripcionales del gen KLC1 para las dos condiciones biológicas estudiadas.**  
Ídem Figura 31.



**Figura Suplementaria 8. Representación esquemática de la vía del mal de Huntington afectada por PDCD4.**

Ídem figura 33, para la vía del mal de Huntington.

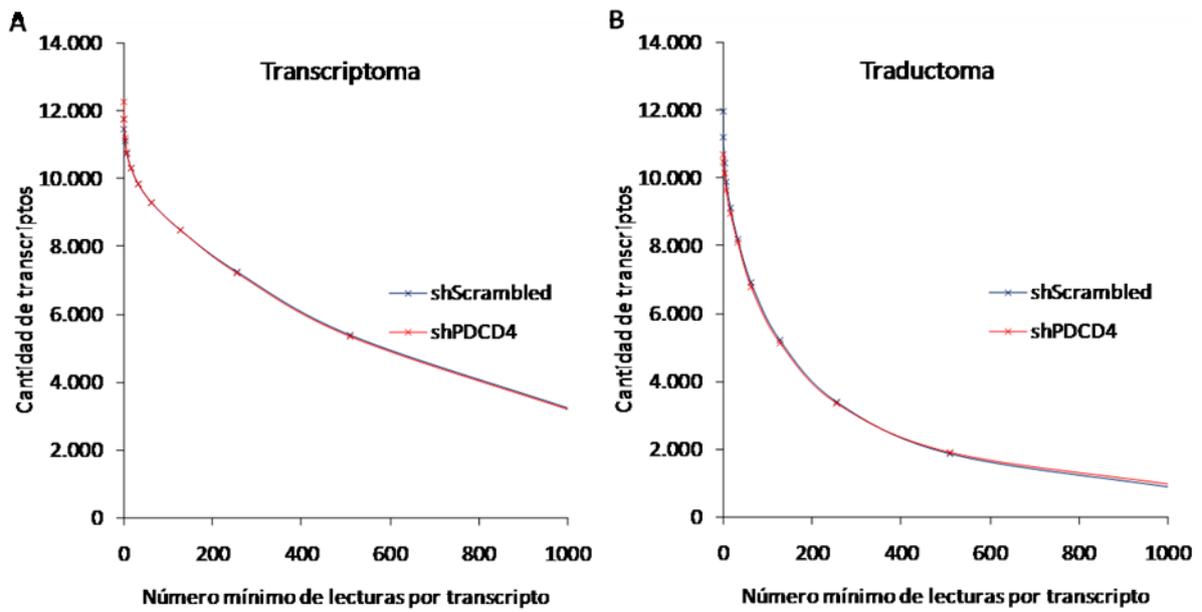


**Figura Suplementaria 9. Representación esquemática de la vía del mal de Parkinson afectada por PDCD4.**  
Ídem figura 33, para la vía del mal de Parkinson.



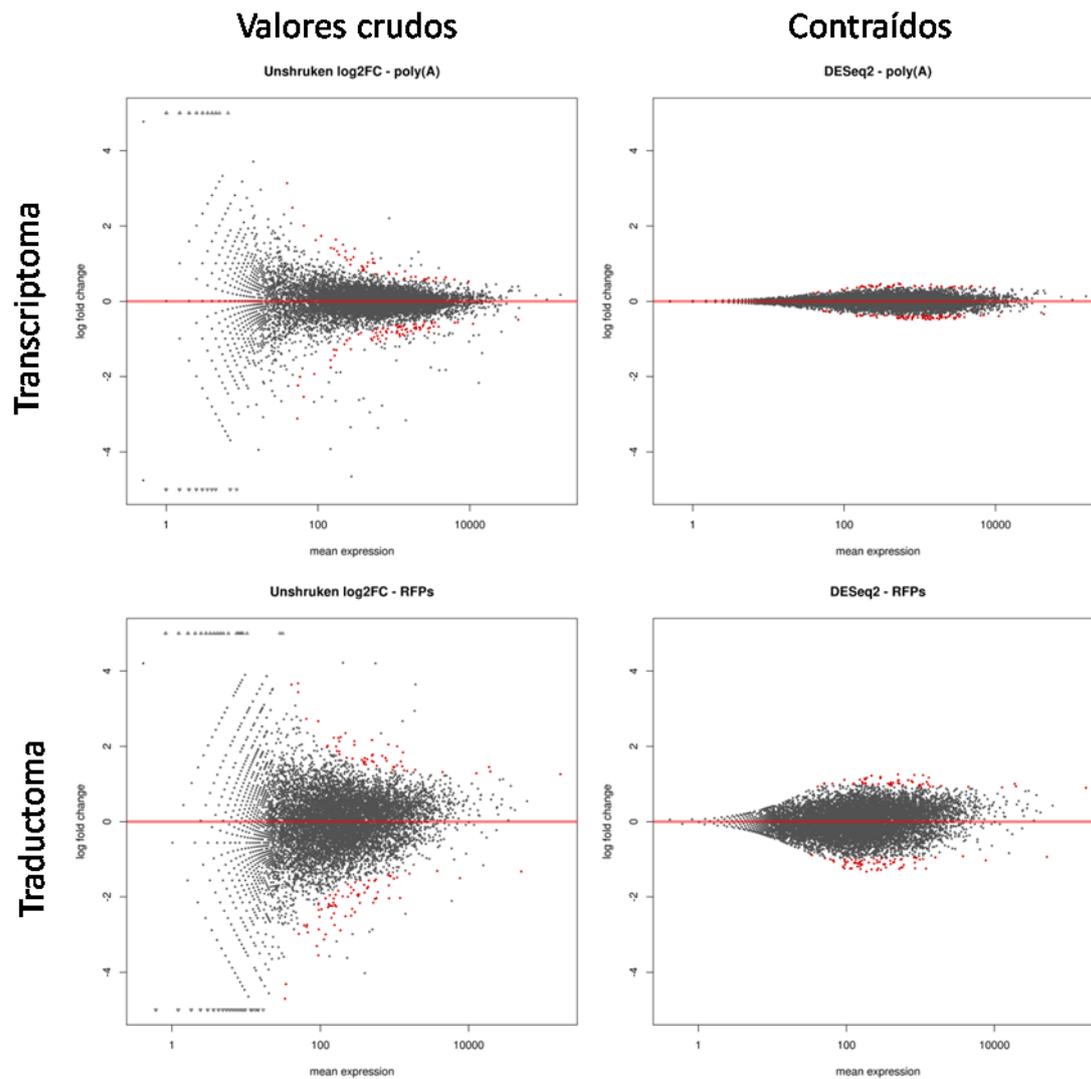
**Figura Suplementaria 10. Representación esquemática de la vía asociada al ribosoma, afectada por PDCD4.**

Ídem figura 33, para la vía asociada al ribosoma.



**Figura Suplementaria 11. Evaluación del nivel de conteo de los transcritos en los transcriptomas y traductomas.**

La figura muestra la cantidad de transcritos en función del conteo de lecturas que presentan, tanto para el compartimento transcripcional **(A)**, como para el traduccional **(B)**; y discriminando entre las dos condiciones biológicas: shScrambled y shPDCD4.

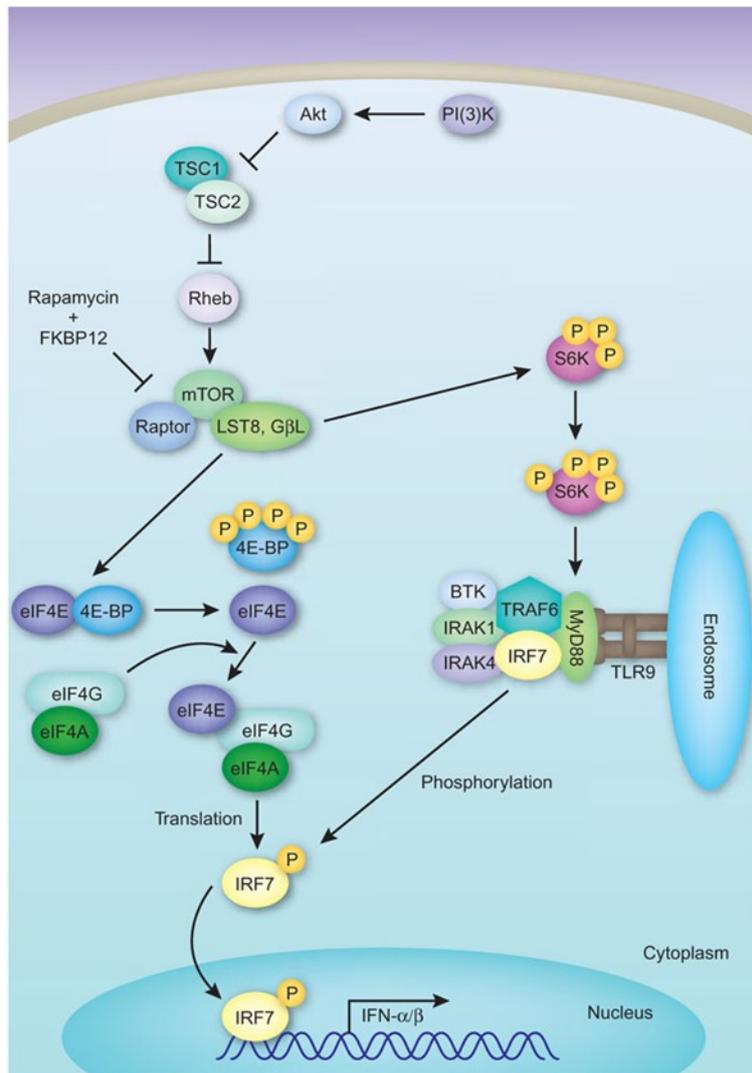


**Figura Suplementaria 12. Efecto de la contracción aplicada por DESeq2 sobre los valores de fold change.**  
 Se muestran los plots M vs A, para cada compartimento (transcriptoma y traductoma), con los valores de fold change crudos (izquierda) y luego de aplicar la contracción de DESeq2 (derecha). En rojo se indican los genes con significancia estadística.

		Transcriptome			Translatome		
E	Replicate	1	2	3	1	2	3
	1	1	0.97	0.97	1	0.96	0.96
	2		1	0.96		1	0.95
	3			1			1

**Figura Suplementaria 13. Valores de correlación de Pearson en réplicas biológicas de transcriptomas y traductomas.**

La figura, adaptada de Smircich *et. al*, *BMC Genomics* (2015) [17], muestra los valores de correlación de Pearson obtenidos al comparar tres réplicas biológicas para los compartimentos transcripcionales y traduccionales.



**Figura Suplementaria 14. Esquema de la activación transcripcional de la respuesta inmune mediada por la activación traduccional de IRF7.**

La figura muestra como la producción de Interferón tipo I y la consecuente activación de la respuesta inmune está regulada por la vía mTOR y el control traduccional ejercido sobre IRF7.

Figura adaptada de Costa-Mattioli & Sonenberg, *Nature* (2008) [143].

**Tabla Suplementaria 1. Evaluación de la expresión de marcadores neuronales de diferenciación.**

Se muestran los valores de expresión transcripcional en RPKM para una serie de marcadores de diferenciación neuronal obtenidos de la literatura. La información respecto a los niveles de expresión a tiempo 0hs fue obtenida de Andreev y O'Connor *et. al Genome Biology (2015)* [100].

En amarillo se resaltan los casos de aumento de expresión: fold change mayor a 1.

Marcador	Nivel de expresión (RPKM)		Fold change
	t = 0hs	t = 72hs	
Brsk1	12,74	33,80	2,65
Dusp6	0,26	65,16	246,80
Map2	10,71	3,28	0,31
Nefh	24,48	12,04	0,49
Nefl	99,82	53,59	0,54
Nefm	92,51	152,41	1,63
Syn1	14,31	17,57	1,23
Syn2	40,29	112,38	2,79
Syn3	1,01	1,21	1,19
Tubb3	103,67	121,02	1,17

**Tabla Suplementaria 2. Datos de conteos, fold change, p-valor y eficiencia traduccional para tres transcritos posibles blancos traduccionales de PDCD4.**

En la tabla se muestra la información de conteos, fold change (FC), p-valor y fold change en la eficiencia traduccional (FC Ef Traduccional), para tres transcritos presentes en la lista de 480 posibles blancos traduccionales de PDCD4, construida según el criterio de eficiencia traduccional.

	Transcriptoma		log FC Transcr.	p-valor	Traductoma		log FC Traducc.	p-valor	FC Ef Traduccional
	shScrambled	shPDCD4			shScrambled	shPDCD4			
<i>FAU</i>	1.486,39	1.756,43	0,2408	0,3347	20,64	384,58	4,2195	0,3416	15,77
<i>HYOU1</i>	2.694,64	2.741,47	0,0249	0,9104	429,87	3.305,55	2,9429	0,2948	7,56
<i>KLC1</i>	2.176,25	2.074,41	-0,0691	0,7624	321,8	1.332,43	2,0498	0,0118	4,34

**Tabla Suplementaria 3. Datos de conteos, fold change, p-valor y eficiencia traduccional para el top30 de los 49 ARNm comunes a los tres criterios de selección de posibles blancos traduccionales de PDCD4.**

En la tabla se muestra la información de conteos en ambas condiciones biológicas (shScram y shPDCD4), fold change (FC), p-valor, valores de eficiencia traduccional en cada caso y el correspondiente fold change (FC Ef. Trad), para el top30 de los 49 transcritos comunes a los tres criterios de selección de posibles blancos traduccionales de PDCD4 (ver Materiales y Métodos y Figura 29).

GenID	Transcriptoma				Traductoma				Ef trad shScram	Ef trad shPDCD4	FC Ef trad
	Reads shScram	Reads shPDCD4	log2 FC	pvalue	Reads shScram	Reads shPDCD4	log2 FC	pvalue			
<i>RGD1304624</i>	67.8	52.2	-0.38	6.07E-01	7.3	93.1	3.67	3.29E-02	0.11	1.78	16.60
<i>Psm3l</i>	539.3	416.3	-0.37	2.67E-01	17.0	112.8	2.73	4.20E-02	0.03	0.27	8.60
<i>Uqcr11</i>	104.7	61.2	-0.77	2.50E-01	65.6	311.3	2.25	2.14E-02	0.63	5.09	8.12
<i>Mgst3</i>	73.8	122.4	0.73	2.43E-01	6.1	75.8	3.64	4.64E-02	0.08	0.62	7.52
<i>LOC100909510</i>	668.9	336.0	-0.99	1.89E-02	77.7	283.3	1.87	4.17E-02	0.12	0.84	7.26
<i>Ppm1b</i>	38.9	70.2	0.85	2.94E-01	8.5	92.2	3.44	3.67E-02	0.22	1.31	6.01
<i>Hypk</i>	1225.2	1059.3	-0.21	4.22E-01	433.5	1736.8	2.00	1.19E-02	0.35	1.64	4.63
<i>Rnh1</i>	1222.2	1094.4	-0.16	5.35E-01	65.6	261.9	2.00	3.64E-02	0.05	0.24	4.46
<i>Hnrnpa3</i>	2278.9	2266.0	-0.01	9.71E-01	106.9	470.2	2.14	1.78E-02	0.05	0.21	4.43
<i>Klc1</i>	2176.3	2074.4	-0.07	7.62E-01	321.8	1332.4	2.05	1.18E-02	0.15	0.64	4.34
<i>Usp9x</i>	450.6	338.0	-0.41	2.48E-01	188.2	606.1	1.69	3.40E-02	0.42	1.79	4.29
<i>Lcn2</i>	618.1	681.1	0.14	6.31E-01	53.4	250.4	2.23	2.73E-02	0.09	0.37	4.25
<i>Uqcr11</i>	1126.5	1202.7	0.09	7.09E-01	66.8	293.2	2.13	2.67E-02	0.06	0.24	4.11
<i>Gps1</i>	1509.3	1730.4	0.20	4.22E-01	61.9	289.1	2.22	2.38E-02	0.04	0.17	4.07
<i>Tmsb4x</i>	693.9	592.8	-0.23	4.46E-01	81.4	280.8	1.79	4.77E-02	0.12	0.47	4.04
<i>Sept7</i>	410.7	464.4	0.18	5.90E-01	180.9	812.8	2.17	1.18E-02	0.44	1.75	3.97
<i>Rps27a</i>	387.8	501.6	0.37	2.79E-01	71.6	365.6	2.35	1.58E-02	0.18	0.73	3.95
<i>Add3</i>	385.8	399.2	0.05	8.83E-01	49.8	201.8	2.02	4.54E-02	0.13	0.51	3.92
<i>Maged2</i>	1146.5	1257.9	0.13	5.98E-01	112.9	463.6	2.04	2.13E-02	0.10	0.37	3.74
<i>Mcsm</i>	658.0	614.9	-0.10	7.38E-01	227.1	767.5	1.76	2.64E-02	0.35	1.25	3.62
<i>Hap1</i>	554.3	563.7	0.02	9.35E-01	71.6	262.7	1.87	4.39E-02	0.13	0.47	3.61
<i>Pomp</i>	1365.8	1280.0	-0.09	7.05E-01	313.3	1052.4	1.75	2.35E-02	0.23	0.82	3.58
<i>Ndufs8</i>	580.2	568.8	-0.03	9.23E-01	229.5	788.9	1.78	2.48E-02	0.40	1.39	3.51
<i>Edf1</i>	2412.5	2154.7	-0.16	4.82E-01	384.9	1181.7	1.62	2.96E-02	0.16	0.55	3.44
<i>Sf3b6</i>	452.6	427.3	-0.08	7.98E-01	106.9	346.7	1.70	4.72E-02	0.24	0.81	3.44
<i>Tmem59l</i>	789.6	739.3	-0.09	7.33E-01	129.9	414.2	1.67	4.37E-02	0.16	0.56	3.40
<i>Myl6</i>	2153.3	2351.3	0.13	5.81E-01	568.3	2033.2	1.84	1.60E-02	0.26	0.86	3.28
<i>Rarg</i>	540.3	654.0	0.28	3.71E-01	49.8	196.0	1.98	4.95E-02	0.09	0.30	3.25
<i>Cox5b</i>	3412.4	3498.8	0.04	8.67E-01	358.2	1157.9	1.69	2.55E-02	0.10	0.33	3.15
<i>Atp5i</i>	515.4	544.7	0.08	7.95E-01	206.4	652.2	1.66	3.46E-02	0.40	1.20	2.99

**Tabla Suplementaria 4. Resultado del *Functional Annotation Clustering* en los estudios de ontología realizados mediante DAVID.**

La tabla muestra los primeros 40 clúster funcionales que se muestran para la lista de 480 posibles blancos traducionales de PDCD4. Para cada clúster se muestra el score de enriquecimiento, el nombre del término o función biológica y su procedencia (base de datos), el número de genes de nuestra lista pertenecientes a dicha vía o función, el porcentaje que dicho número representa, el valor de enriquecimiento como fold change y los valores de significancia estadística: p-valor y FDR.

Category	Term	Count	%	Fold Enrichment	Pvalue	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 5.526538540295922					
GOTERM_CC_FAT	GO:0005739~mitochondrion	77	18.60	2.32	1.069E-12	1.471E-09
KEGG_PATHWAY	mo00190:Oxidative phosphorylation	23	5.56	5.98	1.447E-11	1.671E-08
KEGG_PATHWAY	mo05016:Huntington's disease	22	5.31	4.12	4.743E-08	5.477E-05
KEGG_PATHWAY	mo05012:Parkinson's disease	19	4.59	4.76	5.650E-08	6.524E-05
KEGG_PATHWAY	mo05010:Alzheimer's disease	22	5.31	3.98	8.951E-08	1.034E-04
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 2.4684777473555135					
GOTERM_MF_FAT	GO:0015078~hydrogen ion transmembrane transporter activity	11	2.66	5.42	3.285E-05	4.799E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0015077~monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	11	2.66	5.14	5.203E-05	7.602E-02
GOTERM_CC_FAT	GO:0005746~mitochondrial respiratory chain	7	1.69	8.24	1.648E-04	2.265E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0004129~cytochrome-c oxidase activity	4	0.97	7.55	1.511E-02	1.996E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0016675~oxidoreductase activity, acting on heme group of donors	4	0.97	7.55	1.511E-02	1.996E+01
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 1.8333241206016728					
GOTERM_CC_FAT	GO:0005746~mitochondrial respiratory chain	7	1.69	8.24	1.648E-04	2.265E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005747~mitochondrial respiratory chain complex I	3	0.72	7.06	6.555E-02	6.067E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0045271~respiratory chain complex I	3	0.72	7.06	6.555E-02	6.067E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0030964~NADH dehydrogenase complex	3	0.72	7.06	6.555E-02	6.067E+01
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 1.7911656233294277					
GOTERM_MF_FAT	GO:0015078~hydrogen ion transmembrane transporter activity	11	2.66	5.42	3.285E-05	4.799E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0006119~oxidative phosphorylation	10	2.42	5.98	3.985E-05	6.785E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0015077~monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	11	2.66	5.14	5.203E-05	7.602E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0022890~inorganic cation transmembrane transporter activity	12	2.90	3.86	2.777E-04	4.051E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0015986~ATP synthesis coupled proton transport	7	1.69	6.46	6.770E-04	1.147E+00
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 1.6180646277815118					
KEGG_PATHWAY	mo00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	7	1.69	5.80	1.113E-03	1.278E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0006044~N-acetylglucosamine metabolic process	3	0.72	7.49	5.929E-02	6.469E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006041~glucosamine metabolic process	3	0.72	7.49	5.929E-02	6.469E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006040~amino sugar metabolic process	3	0.72	6.06	8.616E-02	7.845E+01

Annotation Cluster 6		Enrichment Score: 1.5501638729590805					
GOTERM_CC_FAT	GO:0044445~cytosolic part	11	2.66	3.80	6.066E-04	8.316E-01	
SP_PIR_KEYWORDS	ribosomal protein	11	2.66	2.85	5.139E-03	6.710E+00	
GOTERM_CC_FAT	GO:0033279~ribosomal subunit	8	1.93	3.63	6.293E-03	8.321E+00	
SP_PIR_KEYWORDS	ribosome	8	1.93	3.53	7.143E-03	9.212E+00	
GOTERM_CC_FAT	GO:0015935~small ribosomal subunit	6	1.45	4.71	8.449E-03	1.102E+01	
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	11	2.66	2.55	1.095E-02	1.379E+01	
Annotation Cluster 7		Enrichment Score: 1.5290510986592243					
GOTERM_BP_FAT	GO:0051340~regulation of ligase activity	8	1.93	5.07	9.548E-04	1.614E+00	
GOTERM_BP_FAT	GO:0031145~anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	7	1.69	5.50	1.596E-03	2.684E+00	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051436~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	7	1.69	5.50	1.596E-03	2.684E+00	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051444~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity	7	1.69	5.40	1.757E-03	2.950E+00	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051352~negative regulation of ligase activity	7	1.69	5.40	1.757E-03	2.950E+00	
GOTERM_BP_FAT	GO:0051439~regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	7	1.69	5.03	2.525E-03	4.215E+00	
GOTERM_CC_FAT	GO:0000502~proteasome complex	7	1.69	4.88	2.888E-03	3.903E+00	
Annotation Cluster 8		Enrichment Score: 1.5116681235827292					
UP_SEQ_FEATURE	domain:Thioredoxin	5	1.21	8.09	2.834E-03	4.135E+00	
INTERPRO	IPR017936:Thioredoxin-like	5	1.21	6.26	7.617E-03	1.073E+01	
INTERPRO	IPR017937:Thioredoxin, conserved site	4	0.97	7.51	1.492E-02	2.000E+01	
Annotation Cluster 9		Enrichment Score: 1.472391448595543					
GOTERM_MF_FAT	GO:0016651~oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH	6	1.45	4.77	8.159E-03	1.128E+01	
GOTERM_MF_FAT	GO:0003954~NADH dehydrogenase activity	4	0.97	8.24	1.188E-02	1.602E+01	
GOTERM_MF_FAT	GO:0008137~NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	3	0.72	6.80	7.057E-02	6.568E+01	
Annotation Cluster 10		Enrichment Score: 1.4545607941106313					
GOTERM_BP_FAT	GO:0016192~vesicle-mediated transport	20	4.83	1.94	7.528E-03	1.208E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0006897~endocytosis	9	2.17	2.48	2.889E-02	3.931E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0010324~membrane invagination	9	2.17	2.48	2.889E-02	3.931E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0016044~membrane organization	10	2.42	1.46	2.418E-01	9.910E+01	
Annotation Cluster 11		Enrichment Score: 1.4370685121741351					
GOTERM_BP_FAT	GO:0043524~negative regulation of neuron apoptosis	6	1.45	4.39	1.146E-02	1.783E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0043067~regulation of programmed cell death	26	6.28	1.61	1.933E-02	2.829E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0010941~regulation of cell death	26	6.28	1.60	2.026E-02	2.943E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0042981~regulation of apoptosis	25	6.04	1.57	2.908E-02	3.951E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0060548~negative regulation of cell death	15	3.62	1.88	2.949E-02	3.994E+01	
GOTERM_BP_FAT	GO:0043523~regulation of neuron apoptosis	7	1.69	2.75	4.174E-02	5.162E+01	
Annotation Cluster 12		Enrichment Score: 1.432717868762695					
GOTERM_CC_FAT	GO:0005624~membrane fraction	29	7.00	1.53	2.401E-02	2.843E+01	
GOTERM_CC_FAT	GO:0005626~insoluble fraction	30	7.25	1.50	2.740E-02	3.177E+01	
GOTERM_CC_FAT	GO:0000267~cell fraction	34	8.21	1.32	7.652E-02	6.657E+01	
Annotation Cluster 13		Enrichment Score: 1.3973869612612304					
GOTERM_MF_FAT	GO:0042802~identical protein binding	25	6.04	1.93	2.603E-03	3.737E+00	
GOTERM_MF_FAT	GO:0042803~protein homodimerization activity	12	2.90	1.71	9.267E-02	7.586E+01	
GOTERM_MF_FAT	GO:0046983~protein dimerization activity	15	3.62	1.29	2.664E-01	9.892E+01	

Annotation Cluster 14		Enrichment Score: 1.3787566826578794				
GOTERM_BP_FAT	GO:0010833~telomere maintenance via telomere lengthening	3	0.72	18.18	1.068E-02	1.671E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0000723~telomere maintenance	4	0.97	7.38	1.604E-02	2.407E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0032200~telomere organization	4	0.97	7.07	1.802E-02	2.663E+01
Annotation Cluster 15		Enrichment Score: 1.3741948566876292				
GOTERM_BP_FAT	GO:0006888~ER to Golgi vesicle-mediated transport	4	0.97	5.66	3.261E-02	4.315E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0048193~Golgi vesicle transport	6	1.45	3.03	4.751E-02	5.636E+01
SP_PIR_KEYWORDS	er-golgi transport	5	1.21	3.60	4.866E-02	4.896E+01
Annotation Cluster 16		Enrichment Score: 1.3271672646836388				
INTERPRO	IPR001023:Heat shock protein Hsp70	3	0.72	8.45	4.708E-02	5.112E+01
INTERPRO	IPR018181:Heat shock protein 70, conserved site	3	0.72	8.45	4.708E-02	5.112E+01
INTERPRO	IPR013126:Heat shock protein 70	3	0.72	8.45	4.708E-02	5.112E+01
Annotation Cluster 17		Enrichment Score: 1.3208172195929424				
GOTERM_CC_FAT	GO:0033279~ribosomal subunit	8	1.93	3.63	6.293E-03	8.321E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0005761~mitochondrial ribosome	3	0.72	4.71	1.316E-01	8.566E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0000313~organellar ribosome	3	0.72	4.71	1.316E-01	8.566E+01
Annotation Cluster 18		Enrichment Score: 1.2794756684619437				
GOTERM_MF_FAT	GO:0019205~nucleobase, nucleoside, nucleotide kinase activity	5	1.21	6.47	6.997E-03	9.753E+00
KEGG_PATHWAY	rn00240:Pyrimidine metabolism	7	1.69	2.71	4.283E-02	3.968E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006221~pyrimidine nucleotide biosynthetic process	3	0.72	5.79	9.336E-02	8.116E+01
Annotation Cluster 19		Enrichment Score: 1.2105933492665448				
GOTERM_CC_FAT	GO:0043228~non-membrane-bounded organelle	61	14.73	1.26	3.806E-02	4.138E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0043232~intracellular non-membrane-bounded organelle	61	14.73	1.26	3.806E-02	4.138E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005856~cytoskeleton	31	7.49	1.24	1.612E-01	9.110E+01
Annotation Cluster 20		Enrichment Score: 1.1959480290524134				
GOTERM_BP_FAT	GO:0031668~cellular response to extracellular stimulus	6	1.45	3.92	1.812E-02	2.676E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0031669~cellular response to nutrient levels	5	1.21	4.82	1.936E-02	2.833E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0009267~cellular response to starvation	3	0.72	4.11	1.643E-01	9.530E+01
Annotation Cluster 21		Enrichment Score: 1.159583171066371				
SP_PIR_KEYWORDS	Chaperone	8	1.93	3.08	1.465E-02	1.805E+01
SMART	SM00271:DnaJ	4	0.97	5.81	2.984E-02	2.855E+01
INTERPRO	IPR018253:Heat shock protein DnaJ, conserved site	4	0.97	4.66	5.275E-02	5.527E+01
Annotation Cluster 22		Enrichment Score: 1.122122278641762				
GOTERM_CC_FAT	GO:0044432~endoplasmic reticulum part	15	3.62	2.16	9.891E-03	1.279E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005789~endoplasmic reticulum membrane	11	2.66	1.98	5.126E-02	5.153E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0042175~nuclear envelope-endoplasmic reticulum network	11	2.66	1.87	7.075E-02	6.357E+01
Annotation Cluster 23		Enrichment Score: 1.0820855399433111				
GOTERM_BP_FAT	GO:0007268~synaptic transmission	14	3.38	2.71	2.003E-03	3.357E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0019226~transmission of nerve impulse	15	3.62	2.25	7.042E-03	1.134E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0044456~synapse part	15	3.62	2.18	9.051E-03	1.176E+01

Annotation Cluster 24	Enrichment Score: 1.0802320334700137					
KEGG_PATHWAY	rn004142:Lysosome	8	1.93	2.43	4.440E-02	4.081E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005770~late endosome	5	1.21	3.55	5.105E-02	5.138E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005764~lysosome	9	2.17	2.09	6.579E-02	6.081E+01
Annotation Cluster 25	Enrichment Score: 1.0719994248423275					
GOTERM_CC_FAT	GO:0043233~organelle lumen	44	10.63	1.36	3.013E-02	3.437E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0031974~membrane-enclosed lumen	45	10.87	1.35	3.033E-02	3.455E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0070013~intracellular organelle lumen	42	10.14	1.34	3.987E-02	4.288E+01
Annotation Cluster 26	Enrichment Score: 1.0683123524079818					
GOTERM_BP_FAT	GO:0006397~mRNA processing	11	2.66	2.22	2.664E-02	3.686E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0008380~RNA splicing	9	2.17	2.13	6.046E-02	6.543E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0016071~mRNA metabolic process	11	2.66	1.92	6.157E-02	6.612E+01
Annotation Cluster 27	Enrichment Score: 1.0555137546709596					
GOTERM_BP_FAT	GO:0051186~cofactor metabolic process	11	2.66	2.31	2.101E-02	3.034E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006732~coenzyme metabolic process	8	1.93	2.12	8.320E-02	7.723E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051188~cofactor biosynthetic process	5	1.21	2.28	1.750E-01	9.622E+01
Annotation Cluster 28	Enrichment Score: 1.0476640161682405					
GOTERM_MF_FAT	GO:0008484~sulfuric ester hydrolase activity	3	0.72	8.50	4.718E-02	5.065E+01
INTERPRO	IPR000917:Sulfatase	3	0.72	7.24	6.247E-02	6.162E+01
INTERPRO	IPR017849:Alkaline phosphatase-like, alpha/beta/alpha	3	0.72	4.61	1.363E-01	8.863E+01
Annotation Cluster 29	Enrichment Score: 1.0463879526300859					
GOTERM_BP_FAT	GO:0007584~response to nutrient	11	2.66	2.27	2.368E-02	3.351E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0033189~response to vitamin A	5	1.21	3.17	7.239E-02	7.219E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0032526~response to retinoic acid	4	0.97	3.09	1.387E-01	9.213E+01
Annotation Cluster 30	Enrichment Score: 1.0197602752125194					
GOTERM_BP_FAT	GO:0006259~DNA metabolic process	16	3.86	1.93	1.911E-02	2.801E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0033554~cellular response to stress	17	4.11	1.65	5.197E-02	5.971E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006281~DNA repair	9	2.17	2.08	6.864E-02	7.021E+01
Annotation Cluster 31	Enrichment Score: 1.0157203974289184					
INTERPRO	IPR016040:NAD(P)-binding domain	11	2.66	3.64	8.306E-04	1.226E+00
UP_SEQ_FEATURE	binding site:NAD	4	0.97	3.32	1.168E-01	8.425E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0051287~NAD or NADH binding	5	1.21	2.52	1.363E-01	8.825E+01
Annotation Cluster 32	Enrichment Score: 0.9918219693626551					
GOTERM_BP_FAT	GO:0051453~regulation of intracellular pH	3	0.72	10.61	3.106E-02	4.158E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0030641~regulation of cellular pH	3	0.72	7.96	5.312E-02	6.053E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0030004~cellular monovalent inorganic cation homeostasis	3	0.72	5.09	1.159E-01	8.773E+01
Annotation Cluster 33	Enrichment Score: 0.9808871005808312					
GOTERM_BP_FAT	GO:0045931~positive regulation of mitotic cell cycle	3	0.72	9.79	3.615E-02	4.659E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0007346~regulation of mitotic cell cycle	6	1.45	2.47	9.502E-02	8.174E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045787~positive regulation of cell cycle	4	0.97	2.93	1.552E-01	9.435E+01
Annotation Cluster 34	Enrichment Score: 0.9335998831690829					
GOTERM_BP_FAT	GO:0006915~apoptosis	15	3.62	1.73	5.224E-02	5.990E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0012501~programmed cell death	15	3.62	1.69	5.965E-02	6.492E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0008219~cell death	15	3.62	1.54	1.081E-01	8.575E+01

Annotation Cluster 35		Enrichment Score: 0.8816689919615368				
GOTERM_CC_FAT	GO:0008021~synaptic vesicle	7	1.69	3.34	1.801E-02	2.213E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0007269~neurotransmitter secretion	5	1.21	4.08	3.342E-02	4.395E+01
GOTERM_CC_FAT	GO:0030136~clathrin-coated vesicle	8	1.93	2.43	4.626E-02	4.789E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0001505~regulation of neurotransmitter levels	6	1.45	3.03	4.751E-02	5.636E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006836~neurotransmitter transport	6	1.45	2.55	8.632E-02	7.851E+01
Annotation Cluster 36		Enrichment Score: 0.8751581852120246				
GOTERM_BP_FAT	GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	21	5.07	1.55	5.246E-02	6.006E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051291~protein heterooligomerization	6	1.45	2.93	5.380E-02	6.101E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0065003~macromolecular complex assembly	19	4.59	1.48	9.047E-02	8.011E+01
Annotation Cluster 37		Enrichment Score: 0.8602793793522004				
GOTERM_BP_FAT	GO:0030071~regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	3	0.72	14.14	1.775E-02	2.628E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0007346~regulation of mitotic cell cycle	6	1.45	2.47	9.502E-02	8.174E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051783~regulation of nuclear division	3	0.72	3.86	1.812E-01	9.668E+01
Annotation Cluster 38		Enrichment Score: 0.855487572165247				
GOTERM_BP_FAT	GO:0001912~positive regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	4	0.97	7.07	1.802E-02	2.663E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0031343~positive regulation of cell killing	4	0.97	6.06	2.723E-02	3.751E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0001916~positive regulation of T cell mediated cytotoxicity	3	0.72	10.61	3.106E-02	4.158E+01
Annotation Cluster 39		Enrichment Score: 0.8515050108746461				
GOTERM_BP_FAT	GO:0019218~regulation of steroid metabolic process	4	0.97	4.47	5.918E-02	6.462E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0050810~regulation of steroid biosynthetic process	3	0.72	4.55	1.397E-01	9.228E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0019216~regulation of lipid metabolic process	6	1.45	2.14	1.483E-01	9.351E+01
Annotation Cluster 40		Enrichment Score: 0.8506601599543012				
UP_SEQ_FEATURE	binding site:NADP	3	0.72	5.43	1.033E-01	8.027E+01
SP_PIR_KEYWORDS	nadp	6	1.45	2.11	1.526E-01	8.928E+01
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:NADP	4	0.97	2.73	1.779E-01	9.458E+01

## **X    ANEXO**

A continuación se adjunta el manuscrito publicado en el marco de la presente tesis, referido en [17].

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*

Pablo Smircich<sup>2,3</sup>, Guillermo Eastman<sup>1</sup>, Saloe Bispo<sup>4</sup>, María Ana Duhagon<sup>2,3</sup>, Eloise P Guerra-Slombo<sup>4</sup>, Beatriz Garat<sup>2</sup>, Samuel Goldenberg<sup>4</sup>, David J Munroe<sup>5</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>4</sup>, Fabiola Holetz<sup>4\*</sup> and Jose R Sotelo-Silveira<sup>1,6\*</sup>

## Abstract

**Background:** Due to the absence of transcription initiation regulation of protein coding genes transcribed by RNA polymerase II, posttranscriptional regulation is responsible for the majority of gene expression changes in trypanosomatids. Therefore, cataloging the abundance of mRNAs (transcriptome) and the level of their translation (translatome) is a key step to understand control of gene expression in these organisms.

**Results:** Here we assess the extent of regulation of the transcriptome and the translatome in the Chagas disease causing agent, *Trypanosoma cruzi*, in both the non-infective (epimastigote) and infective (metacyclic trypomastigote) insect's life stages using RNA-seq and ribosome profiling. The observed steady state transcript levels support constitutive transcription and maturation implying the existence of distinctive posttranscriptional regulatory mechanisms controlling gene expression levels at those parasite stages. Meanwhile, the downregulation of a large proportion of the translatome indicates a key role of translation control in differentiation into the infective form. The previously described proteomic data correlate better with the translatomes than with the transcriptomes and translational efficiency analysis shows a wide dynamic range, reinforcing the importance of translatability as a regulatory step. Translation efficiencies for protein families like ribosomal components are diminished while translation of the transialidase virulence factors is upregulated in the quiescent infective metacyclic trypomastigote stage.

**Conclusions:** A large subset of genes is modulated at the translation level in two different stages of *Trypanosoma cruzi* life cycle. Translation upregulation of virulence factors and downregulation of ribosomal proteins indicates different degrees of control operating to prepare the parasite for an infective life form. Taking together our results show that translational regulation, in addition to regulation of steady state level of mRNA, is a major factor playing a role during the parasite differentiation.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Neglected disease, Transcriptome, Ribosome profiling, Translatome, Translation regulation, Ribosomal proteins, Trans-sialidases

\* Correspondence: holetz@fiocruz.br; jsotelosilveira@iibce.edu.uy

<sup>4</sup>Laboratory of Gene Expression Regulation Studies Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba 81350-010, Brazil

<sup>1</sup>Department of Genomics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, Montevideo CP 11600, Uruguay

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

*Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas' disease a serious ailment that affects millions of people in Latin America, against which there is no prevention, vaccine or effective chemotherapeutic agent [1].

*T. cruzi* has a complex life cycle characterized by several developmental forms present in vertebrate and invertebrate hosts. Replicative epimastigote and amastigote forms in arthropod and mammal hosts, respectively, alternate with the infective and non-proliferative metacyclic trypomastigotes in the insect vector and blood-stream trypomastigotes in the infected mammal [2]. The interchange between functionally and morphologically distinct forms implies tight control of gene expression during the life cycle of the parasite [3]. Understanding this comprehensive gene reprogramming, as well as their associated regulatory mechanisms, could contribute greatly to the control of Chagas' disease.

Trypanosomatids probably belong to the earliest diverging branches of the eukaryotic lineage [4,5] and are characterized by their unique set of molecular characteristics. In *T. cruzi*, most genes are transcribed by RNA Polymerase II which generates polycistronic transcripts in a run-through fashion. Although transcription starts at defined locations, no sequence signals defining a classical eukaryotic promoter have been found at those sites [6-9]. In contrast to what occurs in bacterial operons, genes present in the same cistron are not functionally related and mature mRNA is obtained by trans-splicing and polyadenylation [10]. There is little evidence of transcriptional regulation for protein coding genes [11,12], however individual genes belonging to a common polycistronic unit show different expression patterns. In *T. cruzi* this was confirmed using microarrays [13]. Therefore, the control of gene expression has been thought to occur predominantly by posttranscriptional mechanisms [14]. In addition to regulation of mRNA turnover and protein degradation, early studies have recognized translation as an important regulatory step [3]. Single gene analyses have further confirmed this hypothesis [15-17], thus genome-wide translation studies are needed.

Next-generation sequencing (NGS) technologies have permitted not only the accurate determination of mRNA steady state levels but also the genome-wide analysis of processes such as transcription initiation, mRNA maturation, degradation and more recently translation. Specifically, deep sequencing of ribosome protected mRNA fragments, ribosome profiling, has provided a highly accurate measurement of the translation process *in vivo* [18], for a review see Ingolia 2014 [19]. Although NGS derived data for the related trypanosomatid parasite *Trypanosoma brucei* are accumulating [8,20-23], key differences in the biology and pathogenesis with *T. cruzi* clearly drive forward carrying out genome-wide approaches

in this parasite. As reviewed in Kramer 2012 [14], remarkable differences include different life cycles (presenting *T. cruzi* an intracellular stage), vector transmission (salivaria or stercoraria), targeted host tissues (being *T. brucei* restricted to bloodstream), and immune evasion system (presenting *T. brucei* antigenic variation), and even molecular processes (such as absence of RNAi in *T. cruzi*).

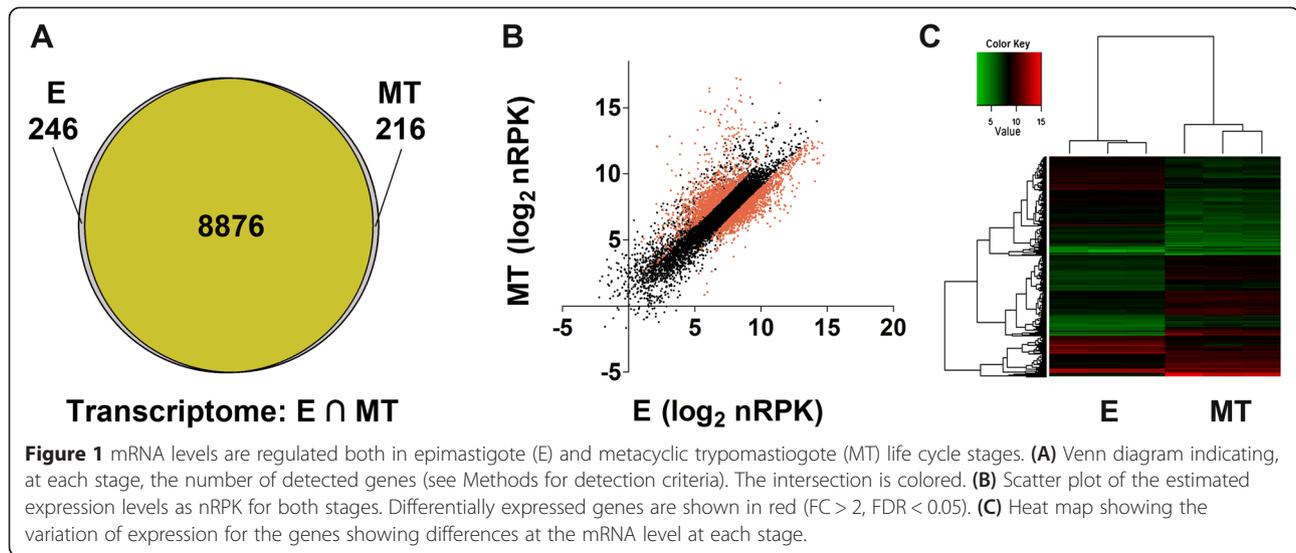
In an effort to contribute to understand gene expression regulation processes occurring during the differentiation from the non-infective epimastigote (E) to the infective metacyclic trypomastigote forms (MT) we comprehensively monitored the steady state transcript abundances and translation profiles using RNA-seq and ribosome profiling. Our results strongly support previous indications of genome-wide constitutive transcription and uncover general pre mRNA maturation. In addition we reveal translation control as a key mechanism generating the gene expression changes that occur in *T. cruzi* differentiation.

## Results and discussion

### mRNA steady state levels support constitutive transcription and posttranscriptional regulation both in *T. cruzi* epimastigotes and metacyclic trypomastigotes

Ribosome profiling approaches require transcriptome determination in order to specifically estimate translational regulation. So, using RNA-seq we measured the steady state transcriptomes for both the epimastigote and metacyclic trypomastigote life cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. The general procedure is shown in the Additional file 1. In brief, we sequenced biological triplicates of polyadenylated RNA from *T. cruzi* epimastigotes and *in vitro* differentiated metacyclic trypomastigotes by standard protocols in the SOLiD platform. In parallel, ribosome footprints, obtained in triplicates by digestion of polysomal fractions that were previously separated through sucrose cushions, were sequenced in the same platform for both stages. After quality filtering, reads from both were mapped to the *T. cruzi* reference genome and read counts per gene were calculated. Normalization was performed to account for sequencing depth and transcript length, resulting in an expression estimate for each gene (normalized reads per kilobase, nRPK, see Methods for further information).

Most of the 10600 annotated transcripts are detected in the mRNA fractions for the E (9122) and MT (9092) stages (using a detection cutoff of 15 normalized counts per gene), including a high number of them (8876,  $\approx 95\%$ ) common to both transcriptomes (Figure 1A). These findings are in agreement with the hypothesis of constitutive transcription [13]. In addition, considering that the sequenced RNA sample is polyadenylated, these results also suggest constitutive RNA maturation. Nonetheless, one quarter (25.9% percent) of the transcripts



detected showed at least a two-fold change in expression levels ( $FDR < 0.05$ ) between the two developmental stages (Figure 1B and C, Additional file 2), supporting that posttranscriptional regulation is a determining factor to achieve the differential mRNA steady state levels.

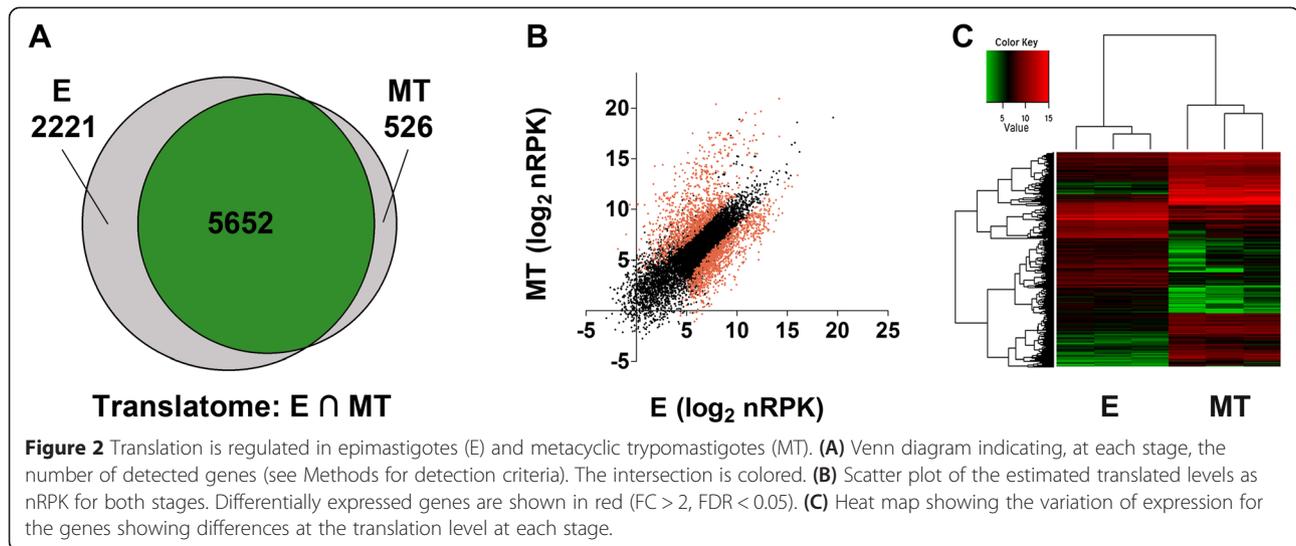
#### Metacyclic trypomastigotes translate fewer proteins than epimastigotes

To proceed to perform translation studies, genome-wide distribution of ribosome footprints (RFPs) mapping was assessed. In contrast to transcriptome derived reads, RFPs aligned mainly to annotated CDS segments while marginally to inter CDS regions (Additional file 3A). In addition, only a few genes lacking detectable transcripts were detected in the RFP fraction (0.9% and 1.4% for E and MT respectively). Furthermore, as ribosome translocation during translation should generate reads which are separated by three nucleotides, a periodicity of the mapping coordinate was expected for RFPs [18,24]. Although periodicity was marginal in MT translome, E RFPs mapped more frequently to the first codon position with the second codon position being the less represented [18,24] (Additional file 3B). As expected, this three-nucleotide periodicity was not observed for the transcriptome data. Similar results for these quality control approaches were obtained by different authors [18,23,24]. Altogether, these observations support that RFPs reads are originated from the translating mRNA population.

A broad picture of translation behavior at E and MT life cycle stages is shown in Figure 2. Although near 95% of the transcripts are common to E and MT (see above), only 67% of translated transcripts are common to both stages according to the same detection criteria used for the transcriptome data (15 normalized read counts per

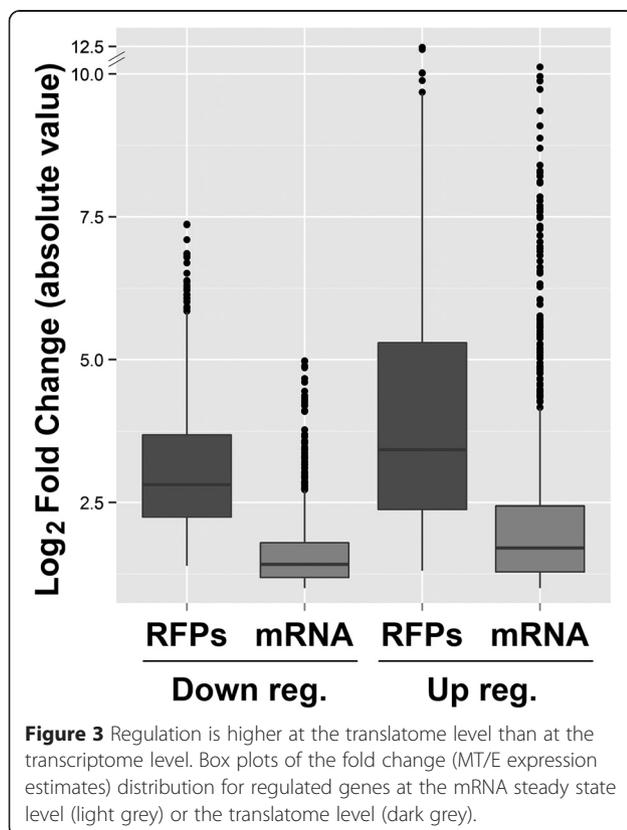
gene). Remarkably, this difference is explained by the absence of 2221 genes in MT translomes (Figure 2A), with 80% of them having a repression fold change higher than 1.5. This finding reveals translation repression as a major regulatory mechanism in the infective form that could explain, at least partially, the proteome reduction previously reported for this stage [25]. Approximately a thousand genes belonging to the later category meet the criteria of  $FC < 0.5$  and  $p\text{-value} < 0.05$ . This indicates that 10% of the annotated genes are significantly downregulated to levels that fall below our detection threshold at the translational level. In addition, the differentially translated genes between E and MT show a wider dispersion of the nRPK values than the one observed for the transcriptome (compare Figure 2B and C to Figure 1B and C, see also Figure 3 and the Additional file 4), reinforcing the relevance of translation control on gene expression regulation. It's worth noting that the E to MT fold changes are higher in the translome than in the transcriptome, resulting in a wider range of protein expression control (Figure 3). Interestingly, transcripts from gene families coding major metacyclic surface markers and proteins involved in the infection process account for almost half of the 526 genes detected only in the polysomes of the infective form (Additional file 5). Additional file 2 summarizes percentage changes corresponding to mRNA abundance and translation regulation. Table 1 shows the most up and downregulated protein coding genes (excluding pseudogenes) in the translome fraction and Additional file 4 shows all the differentially regulated genes at the transcriptome and translome levels.

In summary, the regulation of translation greatly contributes to the expression differences between the metacyclic trypomastigote and epimastigote.



### Translatome expression values are a better proxy of protein levels than the transcriptome ones

Though in both E and MT life cycle stages the transcriptome and the translatome are well correlated (Pearson correlation coefficient  $r = 0.78$  and  $0.66$  respectively, Additional file 6), we considered that translatome data, which represent the levels of translating RNAs, should be a better approximation of protein levels



than transcriptomic data. Therefore, we decided to compare our translatome derived expression estimates to the available ones for quantitative proteomics in *T. cruzi* [26]. Figure 4 shows the correlation of the proteome to the transcriptome and the translatome for the E and MT stages. It can be clearly observed that translatome data are better correlated to protein expression than transcriptome levels. This is especially true for the epimastigote stage where the correlation coefficient between translatome and proteome goes up from a correlation coefficient of 0.41 for the transcriptome to 0.80 for the translatome. While an increase of the correlation for the latter is also observed in metacyclic trypomastigotes, it is not as significant ( $r = 0.31$  and  $0.48$  for transcriptome and translatome to proteome respectively). No bias in the correlations was observed for the subset of the genes with proteome available data when comparing their transcriptome and translatome values ( $r = 0.76$  and  $0.63$  for E and MT respectively, red dots in Additional file 6).

In summary, for the two life cycle stages analyzed, the translatome data are better correlated to proteomic data, reflecting the relevance of translational gene regulation and its contribution to the control of gene expression regulation during trypanosome development.

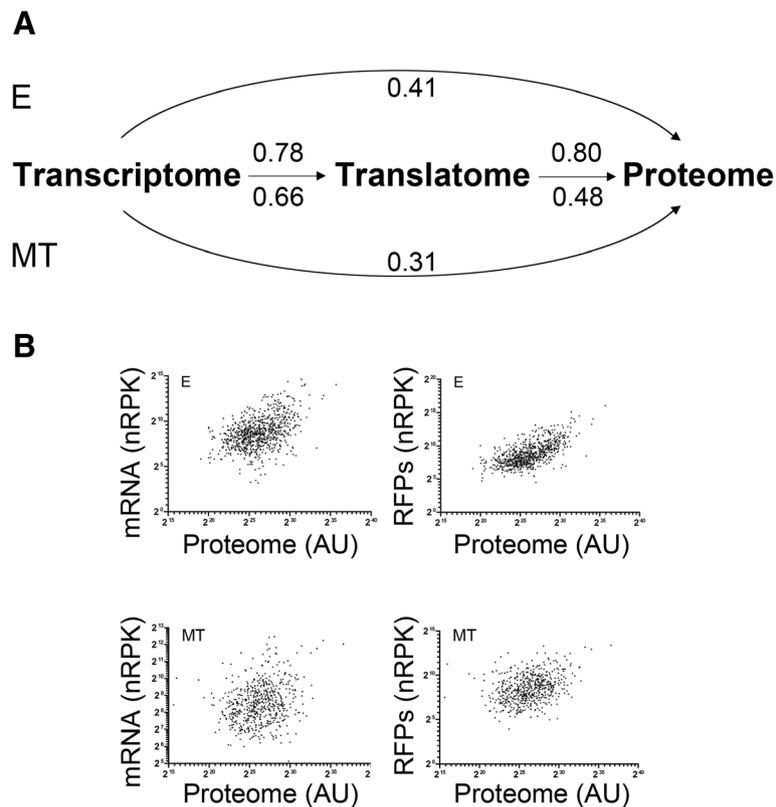
### Translation efficiency varies among the different genes and upon life cycle stages

In an effort to determine the contribution of the steady state transcript levels and the extent of their translation upon differentiation, we calculated the MT relative to E expression levels for each gene both in the transcriptome and the translatome. We found that a high number of CDS exhibit non proportional changes when a  $FC > 2$ ,  $p$ -value  $< 0.05$  is considered (colored genes in Figure 5A).

**Table 1 Top 20 regulated protein coding genes in the RFP fraction**

<b>Upregulated</b>			
<b>Annotation</b>	<b>Feature ID</b>	<b>log2FC(MT/E)</b>	<b>FDR</b>
hypothetical protein	TcCLB.510323.60	11.93	5.55E-37
trans-sialidase putative	TcCLB.435601.10	11.10	3.43E-27
hypothetical protein conserved	TcCLB.506859.230	10.79	1.04E-32
hypothetical protein	TcCLB.509007.50	10.47	2.09E-32
receptor-type adenylate cyclase putative	TcCLB.428999.20	10.43	4.90E-09
trans-sialidase Group II putative	TcCLB.511585.230	10.42	1.04E-32
mucin-associated surface protein MASP putative	TcCLB.507957.320	10.38	1.05E-13
hypothetical protein	TcCLB.509433.10	10.02	3.30E-29
cyclin putative	TcCLB.509455.140	10.01	1.05E-25
DNA polymerase delta subunit 2 putative	TcCLB.509455.70	9.88	1.46E-29
hypothetical protein	TcCLB.507859.46	9.62	2.14E-08
hypothetical protein conserved	TcCLB.511545.170	9.61	1.75E-28
mucin-associated surface protein MASP putative	TcCLB.506599.100	9.58	2.06E-25
engulfment and cell motility domain 2 putative	TcCLB.509599.164	9.55	4.42E-11
hypothetical protein conserved	TcCLB.509769.20	9.26	9.15E-27
trans-sialidase putative	TcCLB.505363.19	9.13	9.80E-20
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase putative	TcCLB.506777.10	9.07	2.26E-06
amino acid permease putative	TcCLB.509167.40	8.94	1.03E-25
protein kinase putative casein kinase I putative	TcCLB.510247.20	8.88	2.78E-23
phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit putative	TcCLB.511709.19	8.86	1.63E-25
<b>Downregulated</b>			
<b>Annotation</b>	<b>Feature ID</b>	<b>log2FC(MT/E)</b>	<b>FDR</b>
40S ribosomal protein S33 putative	TcCLB.506413.30	NA	4.72E-09
hypothetical protein conserved	TcCLB.506659.35	NA	8.80E-06
hypothetical protein conserved	TcCLB.508207.54	NA	4.59E-03
hypothetical protein conserved	TcCLB.509599.120	NA	7.19E-04
hypothetical protein conserved	TcCLB.511527.82	NA	2.25E-02
anti-silencing protein ASF 1 putative	TcCLB.511417.100	NA	2.15E-03
hypothetical protein conserved	TcCLB.510515.120	NA	1.34E-02
hypothetical protein conserved	TcCLB.507611.50	NA	5.81E-03
hypothetical protein conserved	TcCLB.511529.50	NA	1.44E-03
RNA polymerase I	TcCLB.504041.4	NA	5.55E-03
hypothetical protein	TcCLB.504449.40	NA	1.16E-02
hypothetical protein	TcCLB.508277.310	NA	3.51E-02
hypothetical protein conserved	TcCLB.507631.10	NA	4.28E-02
60S ribosomal protein L37a putative	TcCLB.511145.46	-7.37	1.26E-04
kinetoplast-associated protein 3 KAP3	TcCLB.511529.80	-7.36	1.20E-12
nucleoside phosphorylase putative	TcCLB.506865.2	-7.10	2.16E-12
hypothetical protein conserved	TcCLB.511189.84	-6.86	2.50E-05
MP44 putative	TcCLB.506925.390	-6.85	1.55E-04
hypothetical protein conserved	TcCLB.511751.166	-6.83	1.10E-03
hypothetical protein conserved	TcCLB.510289.99	-6.81	1.85E-04

NA: genes with zero counts in the MT stage.

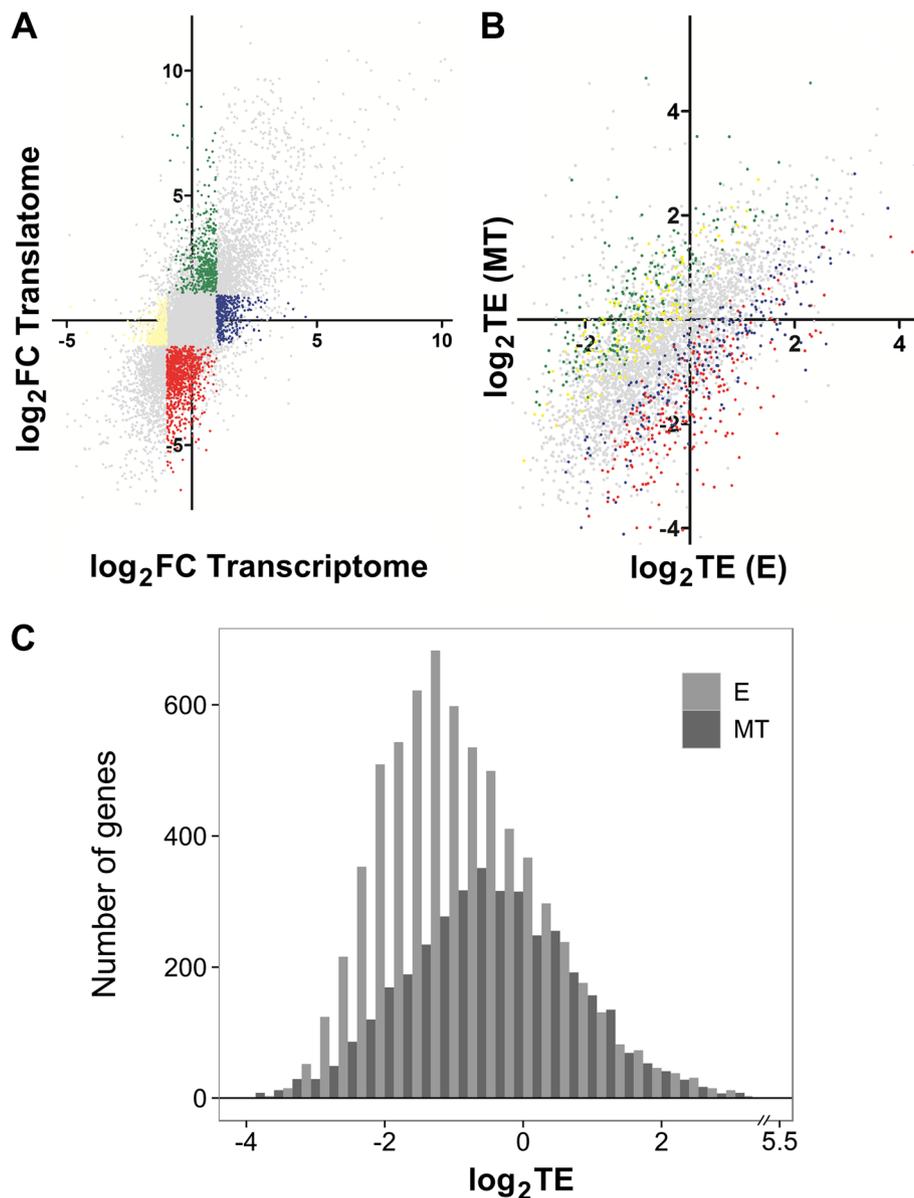


**Figure 4** Translatome is better correlated with the proteome than the transcriptome. Inter sample correlations. **(A)** Pearson correlation coefficients for the different samples are shown. Upper values correspond to the ones observed in the E stage experiments. Lower values are as before for the MT stage. **(B)** Log-log scatter plots of the expression estimates in the E and MT stages. **Upper panel: Left:** Correlation of the proteome to the transcriptome in the E stage. **Right:** Correlation of the proteome to the translatome in the E stage. AU: Arbitrary units. **Lower panel:** Same as above for the MT stage.

Translation efficiency (TE) is defined as the number of footprints per transcript and it gives an idea of the ribosome occupancy per messenger molecule. As previously reported for other organisms including *T. brucei* [18,23,27-29], *T. cruzi* TE is highly variable for the different mRNAs in both life stages (Figure 5B and C), ranging from values close to 0 to values of 40. We found that numerous genes change their TE upon differentiation. Using a two-fold change as a determination of differential expression, 643 genes are regulated exclusively at the level of translation upon differentiation (Figure 5A, green and red dots). These results further support the importance of translation in the regulation of stage-specific gene expression.

In the MT stage, genes coding for members of the trans-sialidase (TS) superfamily are the most overrepresented among the ones with an efficiency FC (MT/E) higher than 2 (Additional file 7A). Actually, when the genes with the 1% highest TE in this stage ( $TE > 7.3$ ) were analyzed for overrepresentation of Gene Ontology terms (GO analysis), only this family showed statistically significant values (Additional file 8, see Methods for

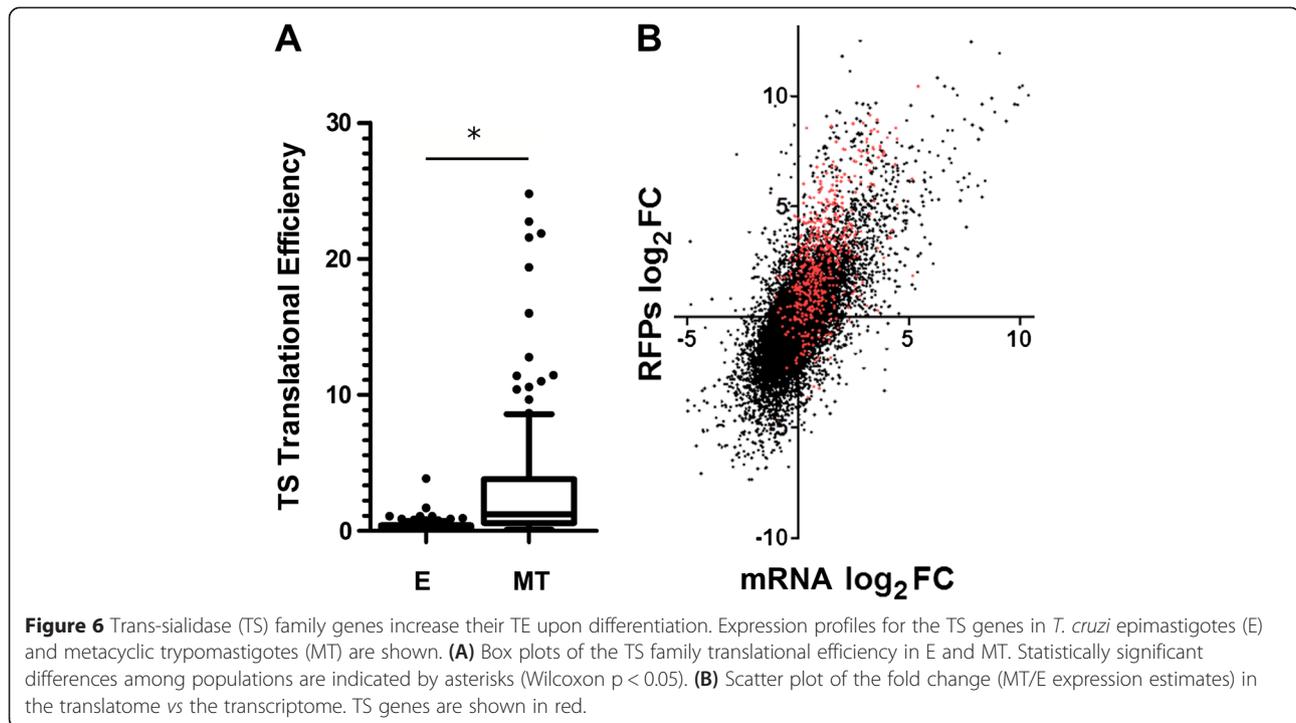
details on the functional annotation procedure). They are also the second most significant among the ones that increase their translation (but not the amount of mRNA, i.e. genes increasing their TE) in the MT stage (green dots in Figure 5 and Additional file 9A). Indeed, the TE of this family in the MT stage is significantly higher than in the E stage (Figure 6A). As can be observed in Figure 6B, the fold change is also positive for the mRNAs of many TS family members. Furthermore, while the translation levels of the TS family is significantly lower in the E stage when compared to the rest of the genes, in the MT stage the behavior is reversed explaining the high difference in TE between the stages (Additional file 10). The other group of genes that is overrepresented among the ones which only increase their translation levels encode for proteases (Additional file 9A). Manual inspection of the involved genes reveals that they mainly encode isoforms of the gp63 surface metalloproteases that have been recognized as important for host-cell infection by trypanosomes [30]. GO analysis of the genes that have both an increased translation and mRNA steady state level in the MT stage, again



**Figure 5** Translation efficiency (TE) varies between the epimastigote (E) and metacyclic trypomastigote (MT) *T. cruzi* stages. **Upper panel: (A)** Scatter plot of the fold change (MT/E expression estimates) in the translome vs the transcriptome. **(B)** Scatter plot of the TE (RFP/Total RNA expression estimates) in the MT vs the E stage for genes detected in all samples. Genes exhibiting non proportional changes ( $FC > 2$ ,  $FDR < 0.05$ ) are colored. **Lower panel: (C)** TE histograms for epimastigotes (light grey) and metacyclic trypomastigotes (dark grey). Median efficiency values are 0.51 and 0.69 respectively.

show enrichment in TS family members (Additional file 9B). Several specific members of this superfamily have been shown to have key functions during host invasion. One of these well studied proteins is the adhesion molecule gp82 [31]. Our data show that members of this family increases an average of 30 fold its translational efficiency after differentiation to the MT stage (Additional file 11) in accordance with previous reports uncovering polysomal mobilization as a control step of its expression [32]. Other members shown to be

relevant for parasite survival upon infection (as CRP or GP85, see genes TcCLB.511129.40, TcCLB.511911.60 and TcCLB.506455.30 in the Additional file 4), are also overexpressed in MT [33,34]. Interestingly, other genes coding for proteins related to specific cellular processes that have been previously recognized as upregulated during transition to the MT stage at the proteomic level (i.e. proteins related to cytoskeleton and RNA binding proteins) [26] are upregulated in the translome according to our GO term enrichment analysis (Additional file 9B). This further

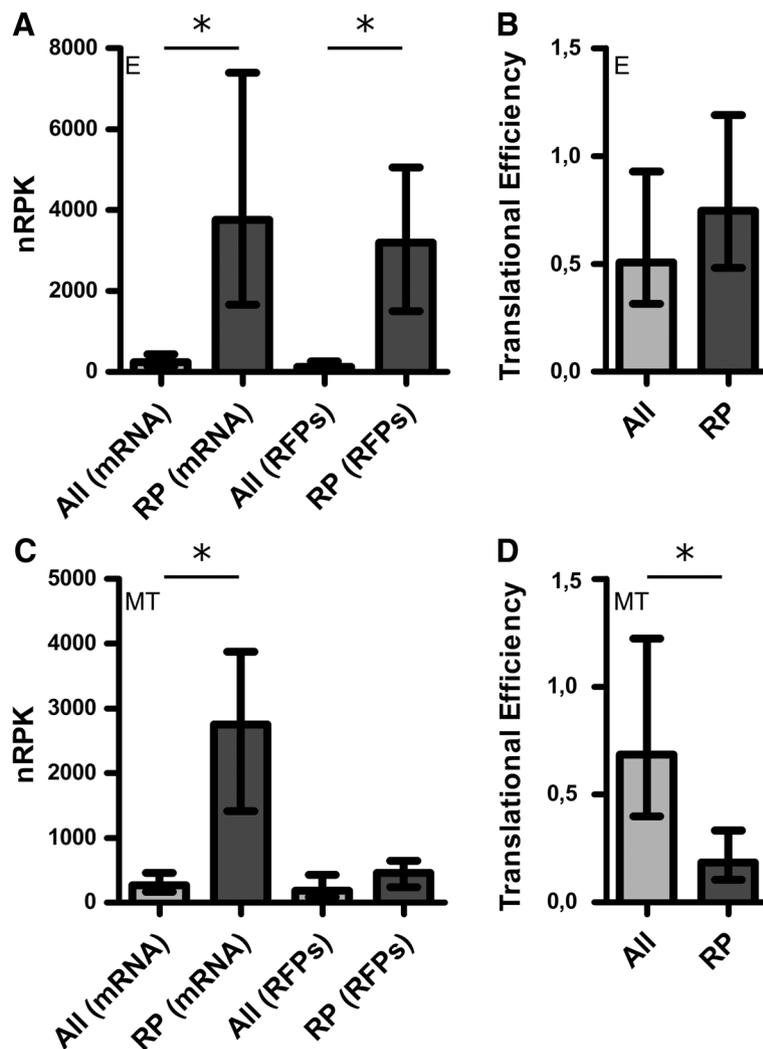


supports the reliability of our approach and the close relationship observed between the translome and the proteome.

On the other hand, in the MT stage, the genes coding for ribosomal proteins (RP) are the most overrepresented among the ones with an efficiency FC (MT/E) lower than 0.5 (Additional file 7B) in accordance with previous proteomic observations [25]. Our data show that this downregulation is mainly derived from the low translation levels of the RP genes in the MT compared to the E stage, since similar levels of steady state mRNA are found in both stages (Figure 7A and C). Furthermore, in the MT stage the TE of this group of genes is significantly lower than the TE for all the genes (RP TE median = 0.19 vs genome TE median = 0.69, Wilcoxon  $p < 0.05$ , Figure 7D). We also found that the gene encoding for RNA polymerase I is downregulated in the MT stage where no RFPs were detected (Additional file 4), suggesting a possible reduction of ribosomal RNA synthesis consistent with the downregulation of ribosomal protein production. Accordingly, GO analysis on the downregulated genes in the MT translome, shows that gene families related to protein synthesis are significantly enriched (Additional file 12). Interestingly, genes coding for enzymes involved in the synthesis of hypusine are also downregulated in MT translome (Additional file 12). This amino acid, which is found in all eukaryotes, is essential for the function of the eIF5A translation factor where it is post translationally synthesized from a lysine residue [35]. The eIF5A factor has been characterized in

other models and, nowadays, it is recognized as a regulator of translation elongation involved in cell cycle progression [36]. Indeed, previous work in *T. cruzi* suggested that the expression levels and post translational modifications of this translation factor controls the cell proliferation rates and protein synthesis [37]. Overexpression of the factor in epimastigotes increases proliferation while in the MT stage the protein levels show a decrease [37]. The eIF5A genes are significantly downregulated in the the MT stage translome (see IDs TcCLB.506925.120 and TcCLB.506925.130 in Additional file 4) which correlates with the observed downregulation of the hypusine addition in the non-replicative stage (Additional file 12). Another cell cycle related protein downregulated in the MT translome stage is the cyclin CYC2 (TcCLB.507089.260) (Additional file 4). All these findings are in agreement with the quiescent characteristic of this stage and the downregulation of the translated proteins (Figure 2A). Further inspection of the identity of the stage specific regulated genes may yield more insights on the biology of the studied process. For example, we noticed the downregulation in the MT of the *T. cruzi* homolog of the Anti-Silencing Function protein (ASF1) (Additional file 4). This protein acts as a nucleosome assembly factor and as such would not be necessary in the non replicative infective stage [38].

Overall, these results highlight the relevance of translation efficiency allowing the rapid changes in gene expression necessary for differentiation.



**Figure 7** Ribosomal proteins (RP) genes decrease their TE upon differentiation. Expression profiles for the RP genes are shown in *T. cruzi* epimastigotes (E) and metacyclic trypomastigotes (MT). **Upper panel: (A)** Bar plot of the E stage transcriptome and translome levels for the RP and for all *T. cruzi* genes. Each bar marks the population median while the whiskers represent the interquartile range. **(B)** Bar plot of the translation efficiency (TE) for the RP and for all *T. cruzi* genes. Statistically significant differences among populations are indicated by asterisks (Wilcoxon  $p < 0.05$ ). **Lower panel: (C)** and **(D)** are the same type of bar plots as A and B respectively, but for the MT stage. Note the decrease in translation efficiency of RP **(D)** as a result of a major decrease in RP translation **(C)**. Y-axis scales in figures A and C are different.

## Conclusions

*Trypanosoma cruzi* has enigmatic gene expression control mechanisms that new *in-masse* approaches are beginning to unravel [13,25,26,39-42]. Where and how the final protein content is regulated is a matter of intense research. It is generally accepted that in the kinetoplastids, regulation is mainly posttranscriptional [12,43], being stability of mRNA and its translatability key steps and target of largely unknown regulation pathways. In the present manuscript, we aimed to characterize at a genome-wide level the steady state transcript levels and the extent of protein translation regulation using RNA-seq and ribosome footprinting in two *T. cruzi* life cycle stages, i.e. epimastigotes and metacyclic trypomastigotes. These two forms occur in the insect vector

and correspond to the replicative, thus proliferating form, and the non-replicative and infective form, respectively.

Although a microarray based relative transcriptome is available for the comparative analysis of expression among the four *T. cruzi* life cycle stages [13], no RNA-seq data from *T. cruzi* have been reported so far. We found that both the E and MT stages transcribe most of the genes encoded in the *T. cruzi* genome (approx. 86.1% and 85.8% respectively), being almost all common to both stages (approx. 98%) (Figure 1 and Additional file 2). Our results not only support the accepted view of constitutive transcription but also show the existence of global mRNA maturation as implied by the detection of almost all the transcripts as poly(A)+ mRNA. However, 30% of the genes

show significant differences in the mRNA steady state levels that, in the context of absence of transcriptional initiation control, can only be accounted by differential mRNA stability. The extensive transcript detection implies that mRNA decay may not be sufficient to achieve precise protein levels pointing out the need of additional regulatory mechanisms.

To investigate the degree of protein synthesis regulation in this parasite we performed ribosome profiling (Figure 2), an approach pioneered by the group of Weissman, that has been used very recently to improve the estimation of genome-wide protein synthesis in several eukaryotes (reviewed in [19], and references therein). In our hands, this technique allowed to determine protein synthesis levels in a proportion of genes that is three times greater than any other proteomic effort published in *T. cruzi* [25,26,42]. Interestingly, much more genes encoded in the *T. cruzi* genome are translated in the epimastigote (approx. 74%) than in the metacyclic trypomastigote (approx. 58%) stage (Figure 2). The translome difference between the two life cycle stages is more pronounced than the one observed for the steady state levels of transcripts (Figure 1). The small translome observed in the MT stage can be mainly explained by specific inhibition of translation of a significant percentage of mRNAs but reduction of assembled ribosomes could also be a contributing factor.

Recent quantitative proteomics in *T. brucei* has shown that the transcriptome and the proteome positively correlate [44]. Our data are in good accordance with this assertion, but protein translation rates derived from ribosome footprints correlate much better with the parasite proteome than transcriptome (Figure 4). When fold change analysis (MT over E) is studied, a wider spectrum of values for the translome than the transcriptome is observed (Figure 3). This suggests that the translation process has broader capabilities for regulation than modification of mRNA steady state levels in this parasite. Although additional posttranslational regulatory steps are certainly operating both in E and MT stages, the low correlation of translome vs proteome observed in MTs (Figure 4), suggests that such processes may be particularly active in this life cycle stage. For instance, regulation of the protein stabilization/degradation or ribosomal stalling during translation (which would produce RFPs but not functional protein product), could explain the lower correlation observed. These issues should be specifically addressed in further studies. The broader regulation that can be achieved with the observed translational regulation may be especially appropriate to generate rapid responses to the changing environment, from the vector's gut to the mammalian host, affecting the infective MT stage.

In agreement with the recently described data for the closely related parasite *T. brucei* [23], in the present study we have observed large differences in translation

efficiency among transcripts in the same life cycle stage and between the same transcript in the two life cycle stages (Figure 5). Thus, the regulation of translation efficiency constitutes a means to rapidly adjust the yield of specific protein products from the available mRNA steady state levels. We have focused on the conspicuous changes of translation efficiency of members of the trans-sialidases family (Figure 6). This large gene family of virulence factors, responsible for transferring sialyl residues from the host, are membrane proteins with an active role in infectivity and therefore, a high number of the family members are expressed in the MT stage [25,45,46]. On the other hand, the genes coding for ribosomal proteins also caught our attention because of the striking low TE exhibited in the MT stage (Figure 7). This family of proteins has been comprehensively studied in *T. cruzi* using data mining and mass spectrometry of purified epimastigote ribosomes [47]. This finding is consistent with the reduction in ribosome protein content previously reported for this non-replicative life cycle stage [25,26]. Thus, these gene families which encode principal actors defining major distinctive characteristics of the MT (a more quiescent stage mainly specialized in host cell invasion) undergo prominent changes of TE in the transition from E to MT. These results further support translational efficiency control as a key mean to achieve stage-specific gene expression regulation.

Interestingly, pseudogenes are detected in the transcriptome and the translome of both *T. cruzi* stages. This is unlikely to be caused by misplacement of the reads coming from the parental gene, as the observation also holds when only single match reads are considered. Not only these sequences are detected but some of them are differentially purified both in the poly(A)<sup>+</sup> mRNA and the RFP fractions of both stages (Additional file 4). Pseudogene transcription is nowadays widely accepted [48], and it has been demonstrated that these transcripts can be functional, in many cases controlling the expression of their parental gene [48]. More intriguingly, our data also shows evidence of pseudogene transcripts in the polysomal fractions. The potential of pseudogene derived transcripts to be translated has been poorly studied in the literature so far. There are some reports in other organisms showing that the short peptides resulting from this process exist and can produce phenotypic outcomes [49,50]. The existence of pseudogene expression in trypanosomes is an interesting finding, placing the analysis of their functional role as an issue that should be addressed in further studies.

In conclusion, the data here presented, generated from the non infective epimastigote and infective metacyclic trypomastigote *T. cruzi* life cycle stages, provide a comprehensive picture of the mRNA steady state level and their translation capability at both life cycle stages. Our

results not only show that the mechanisms establishing mRNA steady state and translation levels are likely acting synergistically, but also point out to translation efficiency as an important intra- and inter-stage posttranscriptional regulatory program, remarkably active in the control of virulence factor expression in the insect infective forms.

## Methods

### Parasites

Epimastigotes of *T. cruzi* Dm28c strain [51] were cultured at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% bovine fetal serum. The culture was initiated by adding  $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and the exponentially growing epimastigotes with less than 0.1% of metacyclic cells were obtained from three-day culture (density of  $3 \times 10^7$  epimastigotes  $\text{mL}^{-1}$ ). Three biological replicates with  $2.5 \times 10^9$  epimastigotes each were used. Metacyclic trypomastigotes were obtained as previously described [51,52]. Briefly, epimastigotes in the late exponential growth phase from five-day culture (density of  $5\text{--}6 \times 10^7$  parasites  $\text{mL}^{-1}$ ) were harvested by centrifugation at  $7000 \times g$  for 5 min at 25°C and subjected to nutritional stress for 2 h at 28°C in TAU medium (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM phosphate buffer pH 6.0) at a density of  $5 \times 10^8$  parasites  $\text{mL}^{-1}$ . The epimastigotes were subsequently used to inoculate cell culture flasks containing TAU3AAG (TAU supplemented with 50 mM sodium glutamate, 10 mM L-proline, 2 mM sodium aspartate and 10 mM glucose) at a density of  $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  at 28°C. Metacyclic trypomastigotes were purified by DEAE-51 chromatography from the TAU3AAG culture supernatant after 72 h of incubation. Three biological replicates of  $5 \times 10^9$  parasites each with greater than 99% metacyclic cells were used.

### Library preparation and sequencing

Messenger RNA was purified using poly(A)<sup>+</sup> mRNA selection, and sequenced using standard SOLiD RNA-seq procedures. Ribosome protected footprints were generated through nuclease treatment of cell extract in the presence of cycloheximide. The drug was added to a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and incubated for 10 minutes at 28°C, and was present at this concentration in all downstream steps according Ingolia and cols. with minor modifications [18]. The polysomes were isolated through a sucrose cushion, under conditions previously established to enrich in polysomes [53,54], and the polysome enriched fraction was digested with RNase. Treated RNA was extracted and ribosome-protected fragments (aprox. 30 nt) were separated and purified through FlashPAGE™ electrophoresis as previously described [29,18]. The experiments were

performed in triplicate and the RFPs and poly(A)<sup>+</sup> mRNA fraction was analyzed by deep sequencing on the Life Technologies SOLiD4 equipment (high throughput sequencing facility RPT01G PDTIS/Carlos Chagas Institute - Fiocruz Parana). Fragmented poly(A)<sup>+</sup> mRNA was prepared from the same biological sample used to prepare RFP libraries. Raw sequence data was submitted to SRA [SRA: PRJNA260933].

### Sequence read processing, alignment, normalization and comparative analysis

Read trimming was performed using CLC Genomics Workbench 6.5 (CLC) with Q phred score larger than 13. A range between 25 and 40 nt was selected for the footprints lengths, while 18 to 50 nt was set for the transcriptome reads (see Additional file 13A for trimming statistics). Reads passing trimming criteria were analyzed using standard RNA-Seq protocols implemented in CLC. *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-Like annotated transcripts V5.0 was used as reference ("http://tritrypdb.org/"). Alignment settings for color space reads were the following: maximum number of mismatches: 2; minimum length fraction: 0.9; minimum similarity fraction: 0.8 and maximum number of hits for a read: 10 (see Additional file 13A for mapping statistics). For further analysis read counts were used as input in the DESeq package implemented in the R statistical environment [55]. Using this package, the six transcriptome samples (three replicates for each stage) were normalized against each other to account for the differences in sequencing depth; the same strategy was carried out independently for the six transcriptome samples. After normalization, replicate variability was assessed (Additional file 13B). The normalized read counts were divided by transcript length to obtain an expression estimate (nRPK). Differential expression across stages was assessed with the DESeq package, setting a fold change  $> 2$  and a FDR  $< 0.05$  to define differential genes. Genes were considered to be detected if a minimum of 15 DESeq normalized counts were mapped in each replicate. Similar to [18], a inter replica variation index (IRI) for each gene was calculated (standard deviation divided by the sum of the mapped reads in the replicates) and a cutoff value of 0.2 was set as gene inclusion criteria for the rest of the presented analysis (Additional file 9C). Heatmaps were constructed with the heatmap.2 R package using default parameters for distance and clustering calculations.

Independent experimental verification of the expression levels obtained in our transcriptome and transcriptome experiments was performed for a set of differentially expressed *T. cruzi* genes. Specific primers were designed for genes: 40S ribosomal protein TcRPS12

TcCLB.508551.20 (forward 5'TGCGAAGACGAGGAGT ACAA3', reverse 5'GCCACACACGAGCACTTAAA3'), TcS25 TcCLB.503907.10 (forward 5'AAAAGGGTCGGC TTCATCTT3', reverse 5'CCGTCATCACCCCTTCTTGT T3'), and trans-sialidase TcGP82 TcCLB.510307.230 (forward 5'AGAGAGAGTGAGCGGCAGAG3', reverse 5'TGGAGTACCTCCACCTTTCG3'). RT-PCR was carried out from ribosome-free, monosomal and polysomal fractions extracted from both epimastigotes and metacyclic trypanomastigotes of the Dm20c strain.

Sucrose density gradient of epimastigotes and metacyclic trypanomastigotes extracts were prepared as previously described [53,54] and RNA was extracted for each fraction. PCR products were analyzed in 2% TBE-agarose gels and band density was calculated using the ImageJ software (Additional file 14).

Quantitative proteomic data were obtained from a label free MS-based approach [26].

### Functional annotation of gene lists

To categorize gene lists into overrepresented functional related groups, DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, version 6.7) functional annotation clustering tool was used [56]. Groups with an "enrichment score" (ES) > 1.3, (defined as the minus logarithm of the geometric median of p values) were considered significant [57].

### Availability of supporting data

The data sets supporting the results of this article are available in the Sequence Read Archive repository, Project ID: PRJNA260933.

### Additional files

**Additional file 1:** Diagram showing the main steps of the experimental design and data analysis.

**Additional file 2:** Number of genes present in *T. cruzi* transcriptome and translatoome and their inter stage variation.

**Additional file 3:** Ribosome footprints originate from translation activity. (A) Mapping characteristics of the reads obtained in the transcriptome (upper panel) and in the translatoome studies (lower panel). A fragment of chromosome 12 (from approx. 395,000 to 400,000bp) is shown. CDSs in the region are represented as green arrows. (B) Mapping periodicity in *T. cruzi* epimastigotes. Bars represent the percentage of the reads that have their 5' end mapping to each reading frame (see Materials and Methods). Translatoome (dark grey) and transcriptome (light grey) mapping periodicity are shown.

**Additional file 4:** Differentially expressed genes in the transcriptome and translatoome fractions.

**Additional file 5:** Lists of genes detected only in the MT stage translatoome.

**Additional file 6:** Transcriptome-translatoome correlations. Log-log scatter plot of the estimated expression levels as nRPK. The subset of genes detected in the proteomic studies are shown in red. (A) E: epimastigotes. Pearson correlations of 0.78 and 0.76 were calculated for all genes and for the proteome detected genes respectively. (B) MT: metacyclic

trypanomastigote. Pearson correlations of 0.66 and 0.63 were calculated for all genes and for the proteome detected genes respectively.

**Additional file 7:** DAVID functional annotation clustering result for genes having a FC > 2 (A) and a FC < 0.5 (B) in their TE after differentiation.

**Additional file 8:** DAVID functional annotation clustering result for the genes with the highest translational efficiency in *T. cruzi* metacyclic trypanomastigotes (MT).

**Additional file 9:** DAVID functional annotation clustering result for the genes increasing their translation after *T. cruzi* epimastigote to metacyclic trypanomastigote differentiation.

**Additional file 10:** Trans-sialidase (TS) family gene expression profile in *T. cruzi* epimastigotes (E) and metacyclic trypanomastigotes (MT). Comparison of translational efficiency for the TS family genes with the rest of the genes for the E (A) and MT (B) stages. Y-axis scales in figures A and B are different.

**Additional file 11:** Expression analysis in epimastigotes and metacyclic trypanomastigotes stages for the trans-sialidase gp82 coding genes.

**Additional file 12:** DAVID functional annotation clustering result for the genes decreasing their translation after *T. cruzi* epimastigote to metacyclic trypanomastigote differentiation.

**Additional file 13:** Data filtering and assessment of replicates consistency. (A) Trimming and mapping statistics for all the replicates of the transcriptome (mRNA) and translatoome (RFPs) data. (B) Left panel: Heatmap of the distances for the different samples and replicates. Middle panel: 2D plot of the 2 first components of the principal component analysis for the different samples. Right panel: Table showing the Pearson correlation coefficients for the biological replicates. (C) Reproducibility across different mapping densities. Genes were binned by the number of mapped reads (50 reads per window). A boxplot for the distribution of the reproducibility index ( $IRI = \sigma / \sum TGR$ ) was constructed for each bin and ordered by the number of mapped reads per gene (TGR, total gene reads) for the four samples studied.

**Additional file 14:** Independent experimental verification of gene expression levels. (A) Upper panel: result of RT-PCR experiments for ribosome-free mRNA (lane 1), monosomal (lane 2) and polysomal fractions (lane 3) for the selected genes. Lower panel: Polysome profiles obtained by sucrose gradients separation for each stage. The image indicates the span of the 3 fractions analyzed using horizontal lines. (B) Table showing the fold change in translation efficiency (metacyclic trypanomastigote divided by epimastigote values) as assessed by both the above RT-PCR experiments (column 3) and by ribosome profiling (column 4). Translation efficiency for the RT-PCR experiments was calculated by first quantifying band density (ImageJ) and then dividing the value obtained in the polysome fraction by the average value obtained in free mRNA and monosome fractions.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

Wrote the manuscript: PS, GE, MD, BG, BD, FH, JRSS. Conceived the idea: MD, DM, SG, BD, JRSS. Performed wet lab experiments: SB, FH, BD, EPGS, JRSS. Performed data analysis: PS, GE, JRSS. Interpretation of results: PS, GE, SB, MD, BG, SG, DM, BD, FH, JRSS. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We acknowledge Dr. Najib El-Sayed for his useful comments. This work received financial support from: CNPq. Fiocruz-PAPES. Fundação Araucária. Programa de Desenvolvimento de las Ciencias Básicas. Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Comisión Sectorial de Investigación Científica. Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Genomics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, Montevideo CP 11600, Uruguay. <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Interactions, School of Sciences, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Department of Genetics. School of Medicine,

Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <sup>4</sup>Laboratory of Gene Expression Regulation Studies Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ, Curitiba 81350-010, Brazil. <sup>5</sup>Cancer Research Technology Program, Leidos Biomedical Research, Inc., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD 21702, USA. <sup>6</sup>Department of Cell and Molecular Biology, School of Sciences, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

Received: 25 October 2014 Accepted: 22 April 2015

Published online: 09 June 2015

## References

- WHO. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;905:i-vi, 1–109, back cover.
- de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*. 1984;86:197–283.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, et al. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett*. 1985;180(2):265–70.
- Walker G, Dorrell RG, Schlacht A, Dacks JB. Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. *Parasitology*. 2011;138(13):1638–63.
- Cavalier-Smith T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett*. 2010;6(3):342–5.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003;11(5):1291–9.
- Worthey EA, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, et al. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(14):4201–10.
- Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, Tschudi C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS Pathog*. 2010;6(9), e1001090.
- Smircich P, Forteza D, El-Sayed NM, Garat B. Genomic analysis of sequence-dependent DNA curvature in *Leishmania*. *PLoS One*. 2013;8(4), e63068.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;309(5733):409–15.
- Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*. 2002;21(8):1881–8.
- Clayton C. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS Pathog*. 2013;9(11), e1003680.
- Minning TA, Weatherly DB, Atwood 3rd J, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2009;10:370.
- Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;181(2):61–72.
- Avila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva MV, Krieger MA, Nakamura CV, de Souza W, et al. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;117(2):169–77.
- Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta SF, Avila AR, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol*. 2001;99(1):7–16.
- Nardelli SC, Avila AR, Freund A, Motta MC, Manhaes L, de Jesus TC, et al. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell*. 2007;6(2):337–45.
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. Genome-wide analysis of in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. 2009;324(5924):218–23.
- Ingolia NT. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet*. 2014;15(3):205–13.
- Nilsson D, Gunasekera K, Mani J, Osteras M, Farinelli L, Baerlocher L, et al. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*. 2010;6(8), e1001037.
- Siegel TN, Hekstra DR, Wang X, Dewell S, Cross GA. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(15):4946–4957.
- Manful T, Fadda A, Clayton C. The role of the 5'-3' exoribonuclease XRNA in transcriptome-wide mRNA degradation. *RNA*. 2011;17(11):2039–47.
- Vasquez JJ, Hon CC, Vanselow JT, Schlosser A, Siegel TN. Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different *Trypanosoma brucei* life cycle stages. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(6):3623–3637.
- Michel AM, Choudhury KR, Firth AE, Ingolia NT, Atkins JF, Baranov PV. Observation of dually decoded regions of the human genome using ribosome profiling data. *Genome Res*. 2012;22(11):2219–29.
- Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 2005;309(5733):473–6.
- de Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo Rde C, Probst CM, Goldenberg S, et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics*. 2012;12(17):2694–703.
- Ingolia NT. Genome-wide translational profiling by ribosome footprinting. *Methods Enzymol*. 2010;470:119–42.
- Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*. 2012;7(8):1534–50.
- Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*. 2011;147(4):789–802.
- Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sanchez DO. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun*. 2003;71(10):5739–49.
- Manque PM, Neira I, Atayde VD, Cordero E, Ferreira AT, da Silveira JF, et al. Cell adhesion and Ca<sup>2+</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. *Infect Immun*. 2003;71(3):1561–5.
- Bayer-Santos E, Gentil LG, Cordero EM, Correa PR, da Silveira JF. Regulatory elements in the 3' untranslated region of the GP82 glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Acta Trop*. 2012;123(3):230–3.
- De Pablos LM, Osuna A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun*. 2012;80(7):2258–64.
- Alves MJ, Colli W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem*. 2008;47:58–69.
- Rossi D, Kuroshu R, Zanelli CF, Valentini SR. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2014;5(2):209–22.
- Kang HA, Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1994;269(6):3934–40.
- Chung J, Rocha AA, Tonelli RR, Castilho BA, Schenkman S. Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells. *Biochem J*. 2013;451(2):257–67.
- Pascoalino B, Dindar G, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Janzen CJ, Schenkman S. Characterization of two different Asf1 histone chaperones with distinct cellular localizations and functions in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(5):2906–18.
- Avila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Goes V, Fragoso SP, Krieger MA, et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res*. 2003;2(1):159–68.
- Baptista CS, Vencio RZ, Abdala S, Valadares MP, Martins C, de Braganca Pereira CA, et al. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;138(2):183–94.
- Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 2004;4(4):1052–9.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom*. 2007;42(11):1422–32.
- De Gaudenzi JG, Noe G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem*. 2011;51:31–46.
- Urbaniak MD, Guther ML, Ferguson MA. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS One*. 2012;7(5), e36619.
- Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic

- profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*. 2011;6(10), e25914.
46. Jager AV, Muia RP, Campetella O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;283(2):182–8.
  47. Ayub MJ, Atwood J, Nuccio A, Tarleton R, Levin MJ. Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(1):30–4.
  48. Johnsson P, Morris KV, Grander D. Pseudogenes: a novel source of trans-acting antisense RNAs. *Methods Mol Biol*. 2014;1167:213–26.
  49. Kandouz M, Bier A, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth. *Oncogene*. 2004;23(27):4763–70.
  50. Ucciferri N, Rocchiccioli S. Proteomics techniques for the detection of translated pseudogenes. *Methods Mol Biol*. 2014;1167:187–95.
  51. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3):315–27.
  52. Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*. 1988;106(4):1349–58.
  53. Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA, Goldenberg S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(4):1062–7.
  54. Alves LR, Avila AR, Correa A, Holetz FB, Mansur FC, Manque PA, et al. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 2010;452(2):72–8.
  55. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
  56. Dennis Jr G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol*. 2003;4(5):3.
  57. Huang D, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

