



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

*Entendiendo el mecanismo por el cual la
proteína CCDC28B, asociada al síndrome de
Bardet-Biedl, regula las ciliias*

MSc. Rossina Novas

Orientador: Dr. José Luis Badano

Lab. Genética Molecular Humana, Institut Pasteur Montevideo

Tribunal:

Dra. Silvia Chifflet

Dra. Maria Eugenia Francia

Dr. Andrés Kamaid

Marzo de 2019

**Para Alfredo y Jesús
por bajar a tierra este trabajo**

“Knowledge rests not upon truth alone, but upon error also.”
— Carl Gustav Jung

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado de un trabajo que no hice sola, hay puesta en ella manos, cabeza y corazón de muchas personas, quiero agradecerles a todas ellas.

Tengo que comenzar agradeciéndole a José, mi orientador durante todos estos años. Hace 10 años me abrió las puertas de su laboratorio para realizar mi tesis de grado y, gracias a su generosidad, conocí y experimenté el mundo de la investigación científica en sus múltiples facetas. Mi agradecimiento es infinito, no solo por las posibilidades que me diste, sino por tu confianza en mí y tu calidad humana.

Todos quienes hemos transitado el camino de realizar un doctorado conocemos de sus altos y bajos (el experimento que no sale, la emoción de conseguir el resultado esperado seguido de la frustración de no poder repetirlo, etc) y lo que hace la diferencia en la forma de vivir este desafío es quienes te rodean. Por eso quiero extender mi agradecimiento en primer lugar al resto de mis compañeros de GMH: Male, Florencia, Belen, Victoria, Paola, Matí, y a las nuevas incorporaciones Lucía, Flor y Maru. Muchas gracias por su apoyo, por darme ánimo, por todo el tiempo que dedicaron a ayudarme, las charlas y los mates que hicieron más fácil este camino. En segundo lugar a todas aquellas personas del instituto, que desde sus diferentes lugares, me han enseñado y acompañado a lo largo de estos años, son muchos para nombrarlos.

También les quiero agradecer, a los incondicionales de siempre, mi familia y amigas, que sin entender mucho lo que hago, me escuchan, alientan y celebran mis logros.

Por último y muy especialmente, a quienes con su paciencia infinita y amor, son los pilares que sostienen todo, mis padres. Gracias por creer en mí, ojalá se sientan orgullosos.

ÍNDICE

RESUMEN	6
CAPÍTULO I	8
INTRODUCCIÓN	8
1.1 Cilia primaria: estructura básica y mantenimiento	9
1.2 Rol biológico de las cilia primarias	16
1.3 Regulación del largo de las cilia	22
1.4 El esqueleto de actina en la regulación de las cilia	24
1.5 Ciliopatías	27
1.6 Síndrome de Bardet-Biedl	30
1.7 Las proteínas BBS y su función	31
1.8 Genes modificadores	39
1.9 CCDC28B: un modificador secundario del síndrome de Bardet-Biedl	40
OBJETIVO GENERAL	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
CAPÍTULO II	57
MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1 Reactivos y protocolos de trabajo con bacterias	58
2.1.1 Medios de cultivo para bacterias	58
2.1.2 Preparación de antibióticos	58
2.1.3 Transformación de bacterias	58
2.1.4 Extracción de ADN plasmídico de cultivos bacterianos	59
2.2 Composición y preparación de soluciones generales utilizadas	59
2.3 Protocolos generales	60
2.3.1 Extracción de ARN de células de mamífero	60
2.3.2 Preparación de ADN copia (ADNc)	61
2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	61
2.3.4 Purificación de productos de PCR	62
2.3.5 Electroforesis en geles de Agarosa	62
2.3.6 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	62
2.3.7 Clonado en vectores de expresión	63

2.3.8	Introducción de ADN plasmídico en células de mamífero para la sobre-expresión de genes	64
2.3.9	Disminución de la expresión de genes en células de mamífero	64
2.3.10	Extracción de proteínas de cultivos celulares	65
2.3.11	Cuantificación de proteínas	65
2.3.12	SDS-PAGE	66
2.3.13	Transferencia de proteínas a membrana	66
2.3.14	Western Blot	66
2.3.15	Co-inmunoprecipitaciones	71
2.3.16	Fraccionamiento subcelular	71
2.3.17	Inmunofluorescencia	71
2.3.18	Microscopía confocal	72
2.3.19	Medida del largo de cilias	72
2.3.20	Análisis de intensidad de tubulina acetilada	73
2.3.21	Microscopía electrónica	73
2.4	Cultivos celulares	74
2.4.1	Líneas celulares utilizadas y condiciones de cultivo	74
2.4.2	Congelado de células	74
2.5	Generación de línea celular CRISPR/Cas9 CCDC28B	75
2.6	Pez cebra como organismo modelo	85
2.6.1	Morfolinos utilizados	86
2.6.2	Edición genómica en pez cebra: CRISPR/Cas9	86
2.6.3	Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra	87
2.6.4	Extracción de proteínas de embriones de pez cebra	87
2.6.5	Inmunofluorescencia <i>in toto</i>	88
2.7	Análisis estadísticos	88
2.8	Análisis transcriptómico ARN sec	89
CAPÍTULO III		90
ESTUDIO DE LA RELACIÓN FUNCIONAL CCDC28B-SIN1-CILIA		90
	Determinación del estado de activación de diferentes MAPKs en mutantes de CCDC28B y SIN1	91
CAPÍTULO IV		107

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CCDC28B Y COMPONENTES DE LA KINESINA 1	107
4.1 CCDC28B interactúa con el motor molecular kinesina 1	108
4.2 Evaluación del efecto del Knockdown de KLC1 y KIF5B en el número y largo de las cilias	112
4.3 Análisis de la localización subcelular de KLC1 y KIF5B en hTERT-RPE.....	119
4.4 Evaluación de la forma y estabilidad de las cilias mutantes para la kinesina 1.....	125
CAPÍTULO V	129
RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE CCDC28B Y COMPONENTES DE LA KINESINA 1	129
5.1 Kinesina 1 y CCDC28B operan en una vía común para regular las cilias	130
5.2 La kinesina 1 regula la distribución subcelular de CCDC28B.....	137
5.3 La delección de una señal NLS predicha afecta la función de ccdc28b de pez cebra	142
CAPÍTULO VI	159
EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN CCDC28B-ACTINA-CILIA	159
El defecto de las cilias en nuestros mutantes de interés se correlaciona con cambios en el esqueleto de actina.....	160
CAPÍTULO VII	170
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	170
7.1 Relación entre CCDC28B, la vía de las MAPK, citoesqueleto y cilia.....	171
7.2 Relación de CCDC28B con kinesina 1 en la regulación de las cilias.....	175
CONCLUSIONES	181
CAPITULO VIII	187
A FUTURO: DATOS PRELIMINARES	187
8.1 Análisis del vínculo CCDC28B-ERK-ACTINA-CILIA	188
8.2 Evaluación del estado de activación de las Rho GTPasas RhoA, Cdc42 y Rac1 en mutantes de CCDC28B.....	199
8.3 Análisis transcriptómico de células depletadas de CCDC28B	209
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	215

RESUMEN

CCDC28B es una proteína asociada al síndrome de Bardet-Biedl que previamente nuestro laboratorio demostró juega un rol en la regulación del largo de las cilias: la depleción de CCDC28B resulta en cilias cortas tanto en células como en pez cebra. Un estudio adicional a su vez mostró que al menos parte de éste rol lo cumple a través de su interacción con SIN1, un componente del complejo mTORC2. Sin embargo todavía no se conoce en profundidad la función de CCDC28B en el marco de su interacción con SIN1 así como otras funciones que CCDC28B pueda tener en el contexto de las cilias. El objetivo general de esta tesis fue continuar con la caracterización funcional de CCDC28B apuntando a entender el mecanismo por el cual esta proteína regula las cilias y los datos obtenidos en el transcurso de esta tesis han aportado información novedosa en distintos aspectos de la función de esta proteína. En primer lugar hemos demostrado que CCDC28B interactúa tanto con la cadena liviana de la kinesina 1 (KLC1) como con la cadena pesada (KIF5B). Notablemente, hallamos que la depleción de ambos componentes de la kinesina 1 resulta en cilias anormalmente largas, fenotipo opuesto al de inhibir la actividad de CCDC28B. A su vez, y a través de ensayos de interacción genética, demostramos que la kinesina 1 regula el largo de las cilias en forma dependiente de CCDC28B. Mostramos que la kinesina 1 regula la distribución subcelular de CCDC28B, inesperadamente, inhibiendo su acumulación nuclear. Más aún, nuestros resultados utilizando el modelo de pez cebra indican que el ingreso al núcleo de CCDC28B sería importante para su función. En ensayos de rescate del fenotipo ciliar, generado por la depleción de *ccdc28b* en embriones de pez cebra, pudimos determinar que un mutante de *ccdc28b* con capacidad disminuída de ingresar al núcleo se comportó como un mutante con función nula. En suma, nuestros resultados indican que los componentes de la kinesina 1 tienen un efecto inhibitorio sobre el rol de CCDC28B en cilia, posiblemente a través de regular su distribución sub-celular. Por otro lado, encontramos que la depleción de CCDC28B y de KLC1/KIF5B resulta en fenotipos de actina opuestos que se correlacionan con el defecto observado en el largo de las cilias, y en el caso de CCDC28B revertir estos cambios fue suficiente para rescatar el fenotipo ciliar. Estos datos sugieren por lo tanto que el remodelado del citoesqueleto de actina sería un efector en el mecanismo por el cual CCDC28B regula el largo de las cilias. A su vez en esta tesis nos propusimos determinar si la

relación funcional CCDC28B-SIN1-CILIA se basa en la modulación de la señalización por MAPKs. De manera interesante encontramos que parte del rol de CCDC28B en la cilia es mediado por cambios en la actividad de la vía de las MAPKs ERK1/2, ya que restaurar sus niveles rescata parcialmente el fenotipo ciliar. Queda por determinar si cambios en esta vía de señalización están causalmente relacionados con los cambios en el citoesqueleto de actina antes mencionados.

En resumen los resultados de esta tesis nos han permitido ganar información acerca del mecanismo por el cual CCDC28B regula el largo de cilia y hemos hallado un rol no reportado previamente de la kinesina 1 en este proceso.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Cilia primaria: estructura básica y mantenimiento

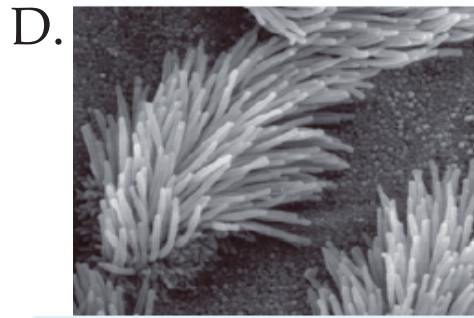
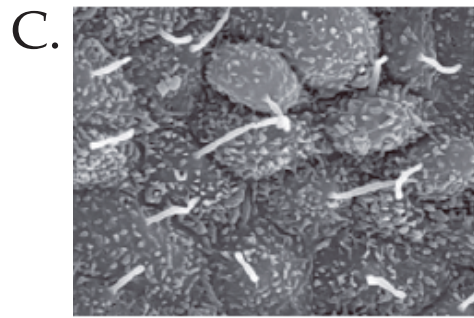
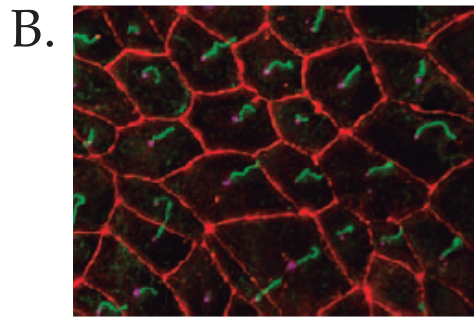
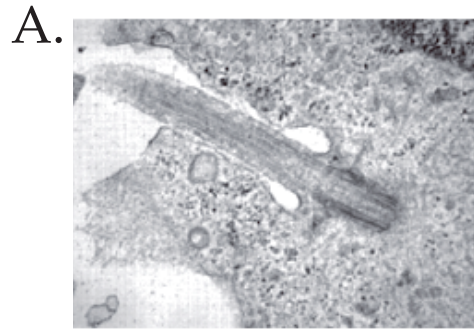
La cilia primaria es un organelo presente en la mayoría de los organismos eucariotas, con excepción de plantas y hongos, que se encuentra conservado en la evolución de los vertebrados donde está presente en casi todos los tipos celulares. Son estructuras complejas, post-mitóticas, que están presentes en células que se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo celular, y son reabsorbidas una vez que la célula comienza a ciclar (1).

Como una antena única, la cilia primaria se proyecta de la superficie de la célula (**Figura 1A-C**), y está formada por un esqueleto, llamado **axonema (Figura 1E)**, compuesto por arreglos de 9 dobletes de microtúbulos que se extienden a partir de uno de los centriolos modificados del centrosoma: el centriolo madre que se transforma en el **cuerpo basal** cuando las células salen del ciclo celular (**Figura 1E**). La transformación del centriolo madre en el cuerpo basal viene acompañada de la formación de dos tipos de apéndices o proyecciones proteicas laterales. En el extremo proximal se forman los apéndices subdistales y pies basales, cuya función es promover el anclaje y la nucleación de los microtúbulos. En el extremo distal se forman los apéndices distales, los cuales originarán las llamadas fibras de transición que están implicadas en el anclaje del cuerpo basal a la membrana plasmática (2–4) (**Figura 1E**). El arreglo de microtúbulos que presentan las cilia primarias se denomina “9+0” y lo diferencia de las cilia móviles (presentes en las células multiciliadas del tracto respiratorio, del epéndimo ventricular y del aparato reproductor por ejemplo; **Figura 1D**) que presentan una configuración “9+2” por la presencia adicional de un par de microtúbulos central. Este tipo de cilia también presenta estructuras accesorias que están involucradas en la capacidad de generar movimiento, como son los brazos internos y externos formados por la proteína dineína. Las cilia primarias generalmente carecen de estas estructuras y por eso son inmóviles (**Figura 1F-G**). Existen excepciones en esta clasificación basada en la estructura del axonema. Por ejemplo, las células del nodo embrionario de los mamíferos presentan cilia móviles con un patrón “9+0” y el quinocilio maduro de las células ciliadas del oído interno es una estructura inmóvil que sin embargo presenta un axonema “9+2”.

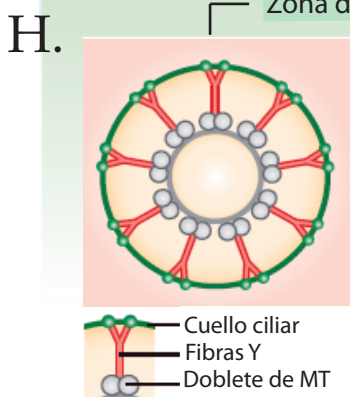
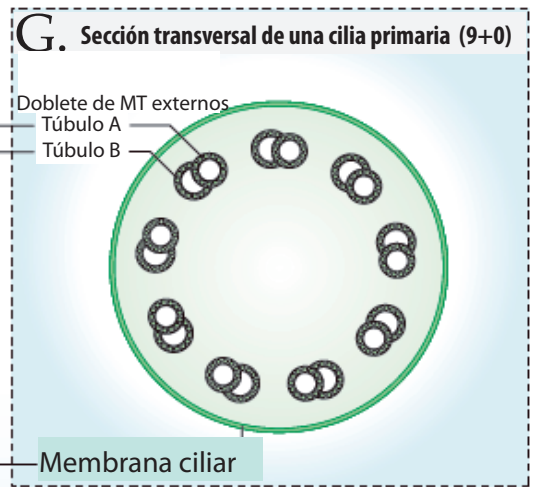
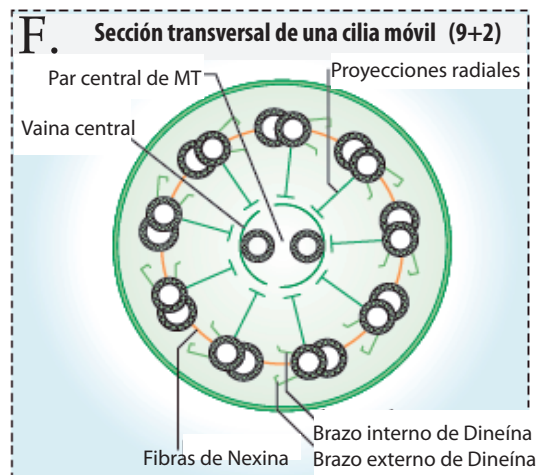
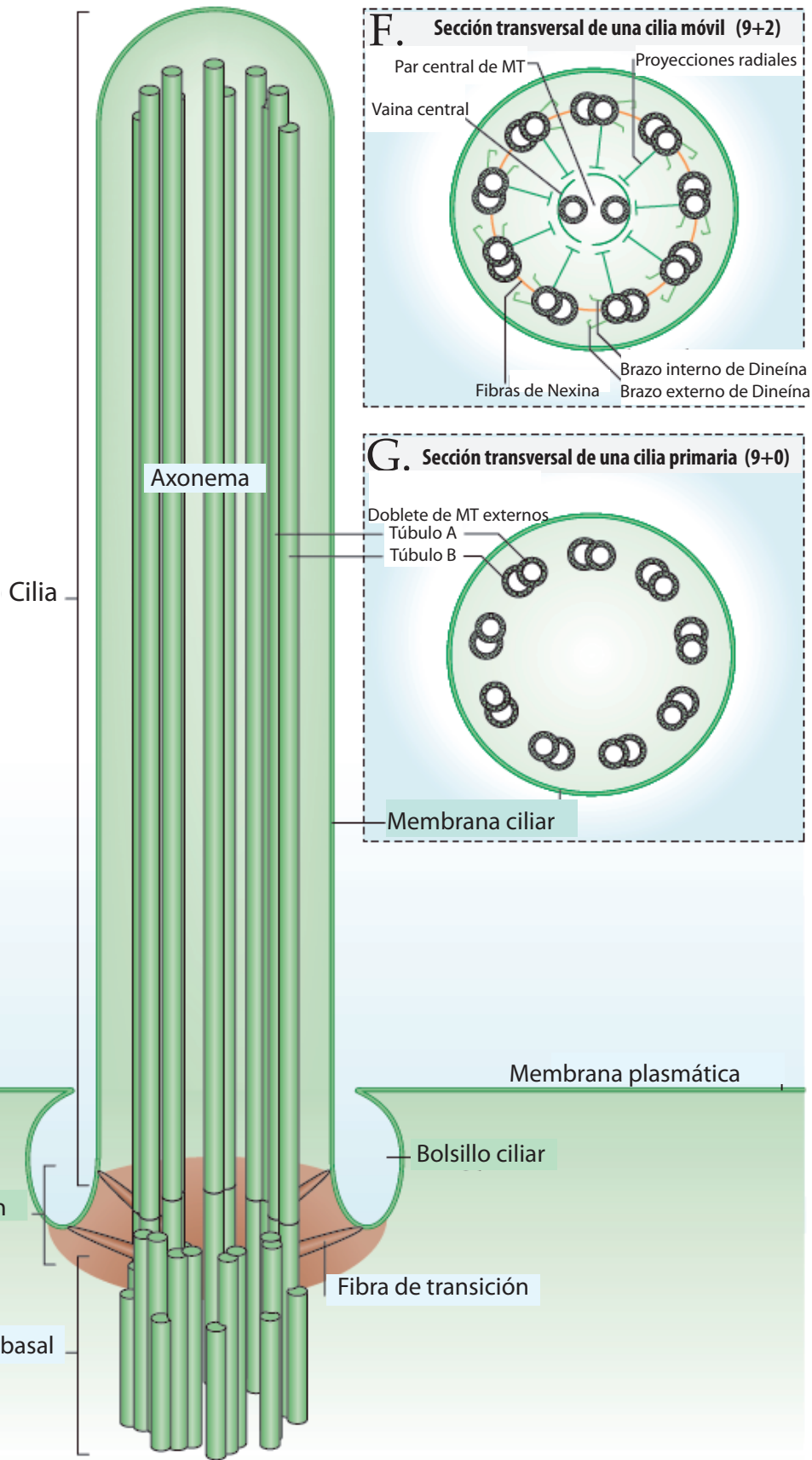
El axonema se encuentra recubierto por una bicapa lipídica continua con la membrana plasmática pero que presenta un contenido de lípidos y proteínas enriquecido en receptores y canales iónicos específicos. El límite entre la membrana plasmática y la ciliar

queda definido por las **fibras de transición** que forman una estructura fibrosa en forma de hélice de 9 palas que se anclan a la membrana plasmática (**Figura 1E, H**). Esta región particular en la base de las ciliias se denomina **zona de transición** y funciona como una barrera de difusión y puerta selectiva que regula la entrada y salida de proteínas solubles y de membrana del compartimiento ciliar (3,4). Por lo tanto, la zona de transición es la encargada de mantener la especificidad de la membrana ciliar y el contenido único de la cilia. Sus componentes estructurales básicos incluyen las llamadas **fibras-Y** y el **cuello ciliar**. **Las fibras-Y** están ubicadas inmediatamente distales a las fibras de transición, y conectan los dobletes de microtúbulos periféricos del axonema con la membrana ciliar, mientras que el **cuello ciliar** es un arreglo circunferencial de proteínas en forma de espiral que se observa en la membrana ciliar donde terminan las fibras Y (5) (**Figura 1H**).

Figura 1 | Arquitectura de la cilia. **A.** Microscopía electrónica de transmisión de una cilia primaria en un cultivo de células pigmentarias de retina (RPE1) **B.** Inmunofluorescencia de las cilia primarias (en verde) de un cultivo de células IMCD3 (en rojo las uniones célula-célula). **C y D.** Microscopía electrónica de barrido de células nodales de ratón y móviles de tráquea de ratón respectivamente. **E.** Diagrama esquemático de una cilia primaria. **F y G.** Diagrama de una sección transversal de una típica cilia móvil y una cilia primaria respectivamente. **H.** Diagrama de una sección transversal de la zona de transición donde se muestran las fibras Y que organizan o forman el cuello ciliar presente en la membrana ciliar que se muestran como cuentas. MT: microtúbulos. Modificado de Ishikawa y Marshall 2011 (6) y diagrama en **H** de Reiter et al., 2012 (4).



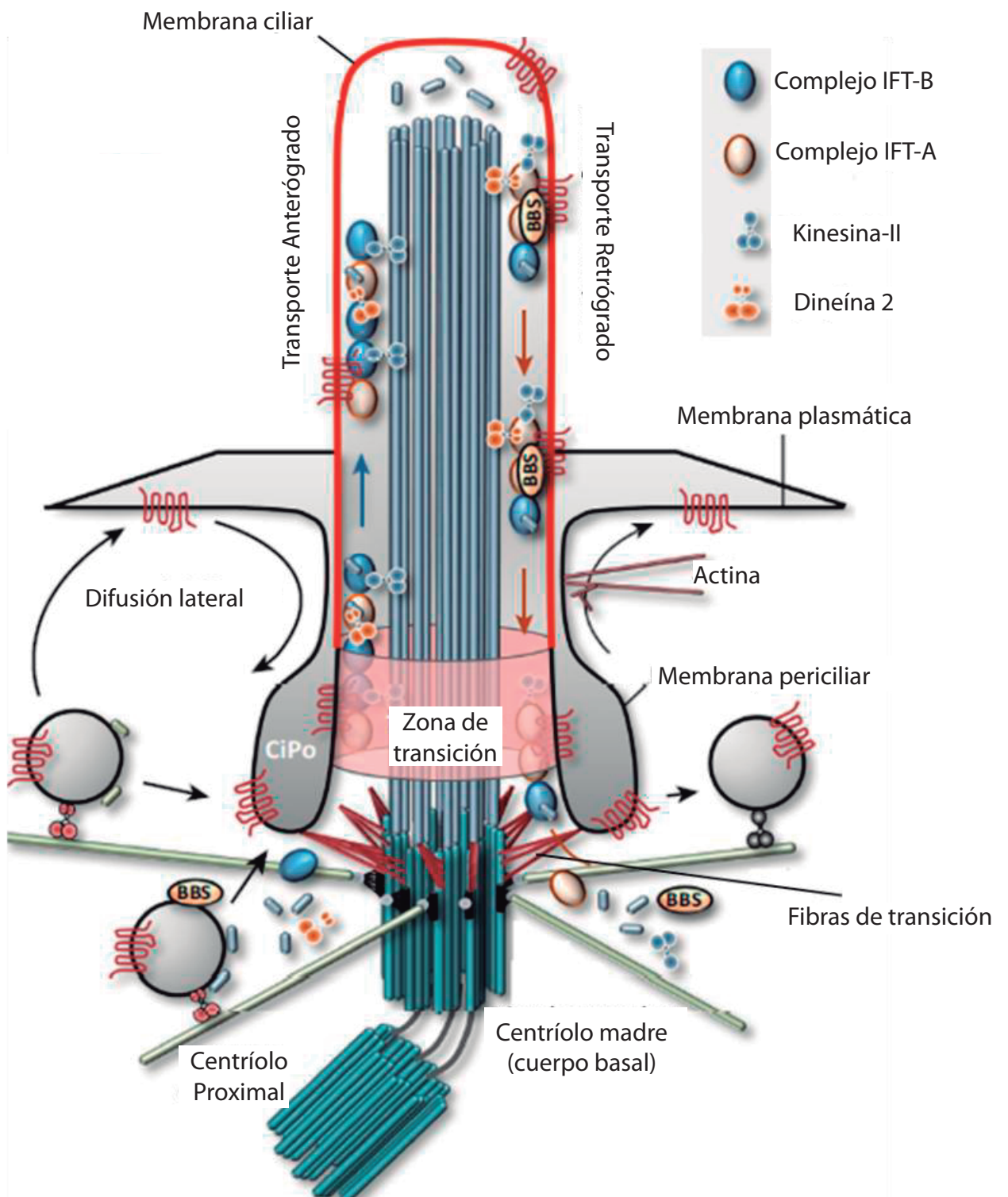
E.



Todas las proteínas necesarias para la formación, mantenimiento y función de la cilia son sintetizadas en el cuerpo celular y por tanto deben ser transportadas hacia el organelo. Podemos distinguir dos grandes etapas en el transporte de moléculas a la cilia que involucran distintos mecanismos. En primer lugar existen mecanismos encargados del transporte de moléculas a la base de las cilia. Posteriormente, la cilia posee una maquinaria especializada en el transporte dentro del organelo desde la base hacia el extremo distal y viceversa. Para el primer paso, distintos componentes de las cilia llegan al organelo en vesículas derivadas del Golgi o endosomas que son dirigidos hacia la **membrana periciliar** donde son exocitadas (7). La membrana periciliar es una región de la membrana plasmática adyacente a la cilia que se encuentra frecuentemente invaginada en el citoplasma formando una estructura similar a un bolsillo, llamado **bolsillo ciliar**, que tiene actividad endo y exocítica a donde llegan y desde donde se retiran vesículas con componentes ciliares (**Figura 1E; Figura 2**) (8,9). Algunas proteínas de membrana también pueden entrar al compartimento ciliar por transporte lateral o difusión desde la membrana plasmática (10,11) (**Figura 2**). Los mecanismos que regulan el tráfico de vesículas y de proteínas de membrana a la cilia son complejos y todavía no se comprenden en su totalidad.

Dentro de la cilia existe el llamado sistema de transporte intraflagelar (IFT), un proceso bidireccional que utiliza motores y adaptadores para mover complejos moleculares, denominados partículas IFT, hacia dentro (movimiento anterógrado) y fuera (movimiento retrógrado) de la cilia (12). Este proceso se encuentra muy conservado en la evolución, es esencial para el ensamblado, mantenimiento y el correcto funcionamiento de las cilia, y comprende dos grandes complejos multiproteicos, IFT-A e IFT-B, que dirigen el transporte retrógrado y anterógrado respectivamente. Una vez que las partículas de IFT se ensamblan, se mueven sobre los microtúbulos del axonema desde la base hacia la punta de la cilia en un proceso que es mediado por la kinesina II. Cuando el complejo IFT llega a la punta, las moléculas transportadas se liberan para cumplir sus roles específicos vinculados a mantener la estructura y la función ciliar. Luego se activa el sistema de transporte retrógrado mediado por la dineína 2 para llevar las partículas IFT de vuelta a la base de la cilia para su reciclado (13) (**Figura 2**).

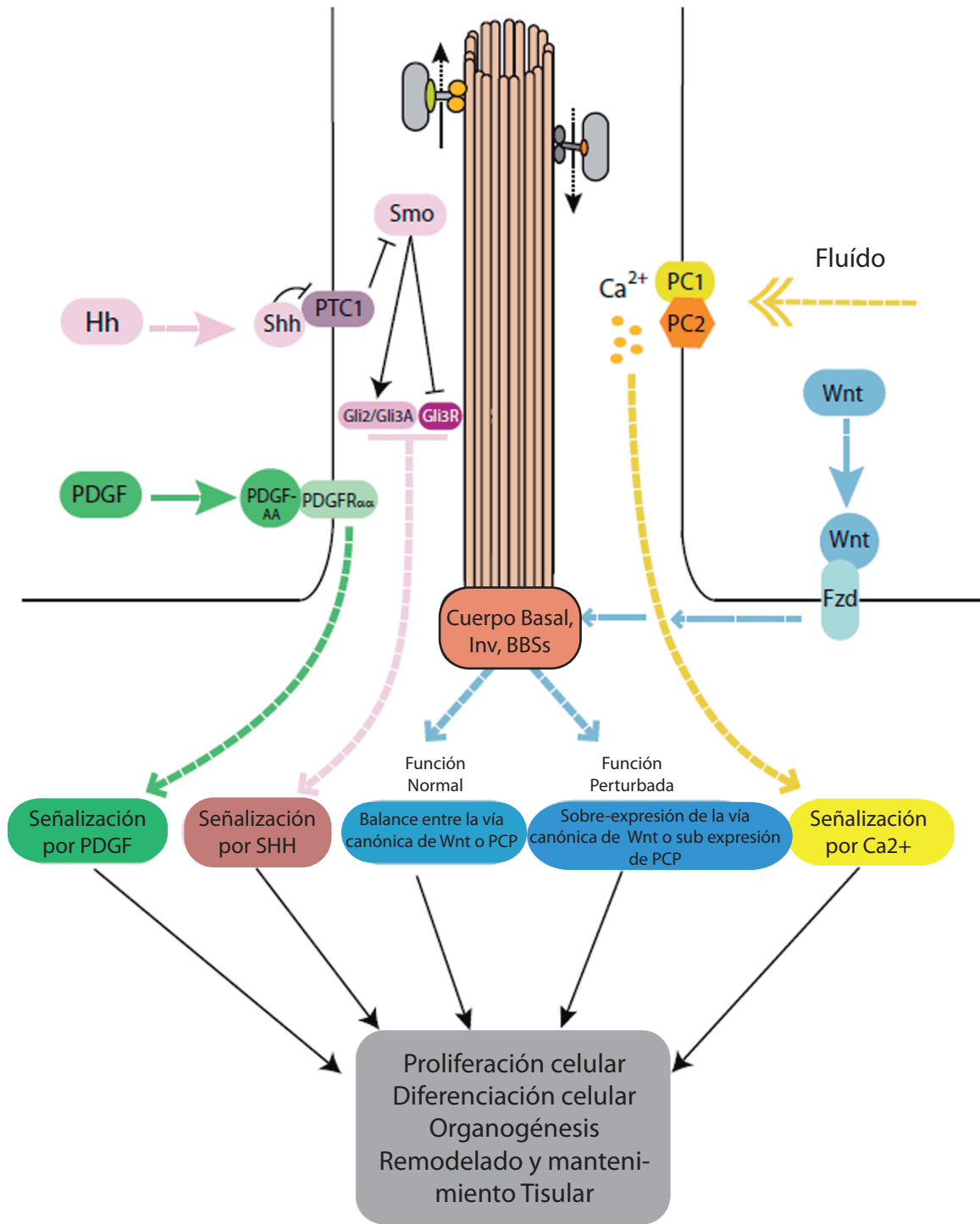
Figura 2| Diagrama ilustrando la estructura de la cilia primaria, el transporte intraflagelar (IFT) y otros procesos de transporte que controlan el ensamblado de la cilia y la llegada de receptores a la membrana ciliar. La extensión, mantenimiento y función de la cilia requieren de la maquinaria de transporte intraflagelar IFT, compuesta por IFT-A, IFT-B, el BBSoma y motores moleculares. IFT se mueve bidireccionalmente a lo largo del axonema de la cilia para transportar cargos hacia dentro y fuera de la cilia. Tomado y modificado de Pedersen et al., 2016 (14).



1.2 Rol biológico de las cilias primarias

Por mucho tiempo las cilias primarias fueron consideradas organelos vestigiales sin ninguna relevancia fisiológica. Sin embargo, hoy se sabe que como la mitocondria, el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico, la cilia primaria funciona como un organelo altamente especializado. Las cilias primarias funcionan como una antena que recibe información del medio extracelular que la rodea y participa en su transducción hacia dentro de la célula. La cilia sensa una gran variedad de señales extracelulares, tanto mecánicas como bioquímicas, que afectan decisiones de las células que tienen que ver con proliferación, polaridad, y diferenciación entre otros. Para esto la membrana ciliar se encuentra enriquecida en receptores específicos, canales iónicos y complejos de señalización (**Figura 3**).

Figura 3| La cilia primaria en la transducción de señales. Representación esquemática del rol de las cilia primarias en la transducción de señales parácrinas y de Ca^{2+} para controlar la homeostasis celular. La localización de PDGFR en la cilia primaria se requiere para una correcta señalización luego de la activación por PDGF-AA (verde). En la señalización por Shh, la unión de Shh a PTC1 lleva a la translocación del receptor fuera de la cilia y esto permite la entrada y acumulación de Smo en el compartimiento ciliar. Esta re-localización se requiere para la correcta señalización por Shh (violeta). La cilia y proteínas del cuerpo basal como inversin/NPHP2 (Inv) y las BBS se requieren para la modulación de la señalización por Wnt influyendo en el balance entre la vía canónica de Wnt y la no-canónica o PCP (celeste). La localización de PC1 y PC2 se requiere para asociar el doblamiento de la cilia ocasionado por fluido con la señalización por Ca^{2+} (amarillo). Tomado de Irigoín et.al., 2011 (1).



Se ha documentado que las cilias primarias pueden actuar como quimiosensores, fotorreceptores, mecanosensores, osmosensores, termosensores, sensores olfatorios y sensores hormonales (15). A continuación brindamos algunos ejemplos de estas funciones.

Un gran avance en la comprensión de la función sensorial de las cilias vino con el descubrimiento de que mutaciones en genes que codifican para componentes principales del transporte intraflagelar eran las responsables de la formación de quistes renales en distintos modelos de enfermedad quística de riñón (16,17). Las células del epitelio renal presentan una cilia primaria que se proyecta hacia el lumen del túbulo renal y algunos trabajos han mostrado que estos organelos controlarían la homeostasis del tejido actuando como **mecanosensores** monitoreando la composición y el caudal de orina en el nefrón. Se ha visto que estas cilias se doblan con el flujo de fluidos causando un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular (18,19). Las proteínas responsables de sensar el fluido y dar una respuesta incluyen una serie de diferentes componentes proteicos dentro de la cilia o en su base, entre ellos los canales iónicos TPR PC-2 y PC-1, proteínas codificadas por los genes mayormente mutados en poliquistosis renal autosómica dominante humana (20,21). Además de la mecanosensación, hoy día se han identificado un gran número de roles sensoriales para las cilias, y esto muchas veces se refleja en cilias que deben especializarse inclusive en términos estructurales. Por ejemplo, los fotorreceptores están formados por un segmento interno y un segmento externo que contiene la maquinaria de transducción visual, que están conectados por un cilio conector. Tanto este último como el segmento externo son una cilia altamente modificada donde la maquinaria de transporte intraflagelar juega un rol crítico para el transporte de proteínas entre segmentos (22). Otro ejemplo son las cilias en las neuronas olfatorias. Estas neuronas bipolares presentan 8 cilias olfatorias inmóviles en el extremo de la dendrita que se elongan hacia el mucus que cubre la superficie del epitelio olfatorio (23). La importancia de la función olfatoria de las cilias se puso en evidencia con la observación de que ratones así como pacientes con mutaciones en genes vinculados a la formación/mantenimiento/función de las cilias usualmente presentan anosmia (24). En este caso el rol de las cilias se conoce en mayor profundidad. La señalización olfatoria comienza cuando los ligandos olfatorios se unen a sus receptores GPCRs olfatorios específicos localizados en la membrana ciliar de las neuronas sensoriales olfatorias. Esto lleva a la activación de la cascada de señalización olfatoria a través de la producción, dentro de la

cilia, del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que resulta en la depolarización de la célula a través de la apertura del canal cerrado de nucleótido cíclico (CNG) también localizado en la cilia (25,26).

Además de su rol en mecanosensación, fotorrecepción y olfato, se ha documentado que las ciliias participan en la transducción de un gran número de vías parácrinas de señalización tales como **Sonic Hedgehog (Shh)**, **Wnt** y **PDGF** (Revisado en (27–29)). Varias de estas vías han adoptado la cilia como plataforma de señalización a lo largo de la evolución. La vía de Hedgehog por ejemplo está conservada en *Drosophila* pero en ese organismo es totalmente independiente de la cilia (30). Una pregunta que se ha planteado por lo tanto es por qué distintas cascadas de señalización usan las ciliias. En este contexto, se cree que la concentración de la maquinaria de transducción de señales en un espacio pequeño y bien definido posiblemente promueva una forma eficiente y rápida para la interacción y modificación de proteínas de señalización en respuesta a una señal.

Para distintas vías se ha podido documentar que distintos componentes están enriquecidos dentro del compartimento ciliar y que se necesita la estructura y maquinaria de la cilia para la correcta señalización. El mecanismo molecular exacto sin embargo no se conoce en todos los casos. Por ejemplo, una vía que opera a través de la cilia es la mediada por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF (del inglés platelet derived growth factor). En fibroblastos y otros tipos celulares (31), la estimulación del receptor PDGFR α (homodímero de PDGFR α que se localiza en la cilia (32)) por el ligando PDGFAA resulta en eventos de autofosforilación que llevan a la activación de AKT y Erk1/2 en la base del organelo (revisado en (33)). Se ha visto que la localización ciliar de PDGFR α es fundamental para un correcto funcionamiento ya que células incapaces de ciliar no pueden activar la vía (32) (34).

En el caso de la vía de Wnt, la relación con la cilia no se conoce en profundidad y hay reportes inclusive contradictorios (35). Un aspecto en el que parecería influir la cilia es en la regulación del balance entre distintas salidas de la vía, que en líneas generales afectan distintos procesos celulares. La vía de Wnt se activa cuando distintas lipoproteínas Wnt secretadas se unen a los receptores transmembrana de superficie de la familia Frizzled. Dependiendo de la proteína Wnt y el receptor, la vía incluye por lo menos cuatro salidas diferentes (36). Las dos salidas de la vía más estudiadas incluyen las llamadas vía canónica y

la no-canónica de polaridad planar celular o PCP (del inglés “planar cell polarity”), en las cuales la proteína Disheveled (Dsh) actúa como un interruptor dependiendo de su localización celular (37). La vía canónica opera a través de β -catenina para controlar principalmente proliferación celular y apoptosis mientras que la vía PCP opera a través de las proteínas VanGogh-Like2 (Vangl2) para controlar cambios en el citoesqueleto, adhesión celular, migración y polaridad del epitelio (38). Vangl2 se localiza en la cilia primaria (38,39) mostrando la conexión entre la cilia y PCP. Además de Vangl2, Inversina también es una proteína de la vía PCP que se localiza en la cilia en vertebrados (40,41). Distintas evidencias muestran que defectos en algunas proteínas ciliares, resultan en un desbalance favoreciendo la activación de la vía canónica en detrimento de la vía PCP. Diferentes proteínas a nivel de cuerpo basal serían importantes en esto y una de ellas sería Inversina, quien promoviendo la degradación de Dsh en el citosol, favorecería la activación de la vía PCP (42). Este defecto en la señalización de la vía PCP ha sido postulado como causante de algunos fenotipos asociados a defectos en las cilias como ser la formación de quistes renales y problemas en el cerrado del tubo neural (43).

Quizás Shh es la vía para la cual se tiene más información en lo que respecta a su relación con las cilias. Esta juega un rol esencial durante el desarrollo embrionario siendo importante para el establecimiento del eje de simetría izquierda-derecha, para el desarrollo de las extremidades, el desarrollo del corazón y la neurogénesis entre otros procesos (44,45). A su vez, en el adulto la señalización por Shh está involucrada en mantener el nicho de células madre y la homeostasis tisular (46,47). Por lo tanto, entender el rol de las cilias en la transducción de esta vía es crítico para comprender las consecuencias de tener afectada la función de estos organelos tanto en modelos animales como humanos. Brevemente, cuando la vía se encuentra inactiva (en ausencia de Shh en el medio extracelular), el receptor de membrana Patched (Ptch) se encuentra localizado en la cilia inhibiendo el ingreso de la proteína smoothed (Smo). La unión de Shh a Ptch provoca la re-localización del complejo hacia fuera de la cilia permitiendo el ingreso de Smo y su transporte hacia el extremo distal de la cilia donde ocurre el procesamiento y activación de los factores de transcripción efectores de la vía, las proteínas Gli: Gli1 y Gli2 son activados mientras que el represor transcripcional Gli3 es inactivado (48). La vía requiere entonces que tanto Smo, así como Sufu (un regulador negativo del procesamiento de las proteínas Gli) y las proteínas Gli, se

localicen en la cilia primaria (49). Por lo tanto la cilia primaria es un compartimiento altamente especializado en organizar y coordinar el procesamiento de las proteínas Gli en la vía de Shh.

1.3 Regulación del largo de las cilia

Además de la presencia/ausencia de las cilia, proceso regulado y coordinado con distintos procesos celulares tales como la división celular (1), múltiples líneas de evidencias muestran que un parámetro sumamente importante para el funcionamiento de las cilia es el largo de estos organelos. Esto queda en evidencia en varias observaciones. En primer lugar, distintas vías y procesos celulares afectan y regulan el largo de las cilia. De manera interesante, el largo de las cilia es relativamente constante para un determinado tipo celular pero a su vez varía significativamente entre distintos tipos de células (puede variar entre 1 y 9 μm (50)). Los cambios en el largo de las cilia pueden afectar muchos procesos. Por ejemplo, una cilia más larga aumenta el esfuerzo de torsión, es decir que cuanto más larga es la cilia, menos fuerza se necesita para doblarla y por ejemplo activar la afluencia de Ca^{2+} . Como fue propuesto por Resnick et al., mientras más larga es la cilia, más sensible se vuelve a cambios en el flujo (51). Por otro lado, cuando cambia el largo de la cilia, consecuentemente cambia la superficie de área de la membrana ciliar. Dado que la composición de la membrana es altamente regulada y contiene distintas poblaciones de receptores, alterar el área de la membrana puede afectar el número de receptores disponibles para señalización. A su vez, afectar el largo de las cilia directamente tiene un impacto en el transporte IFT, que en el caso de cilia alargadas ocasiona que lleve más tiempo recorrerlas (52) y como resultado le llevará más tiempo a las proteínas alcanzar los puntos de señalización localizados en la punta de la cilia (53). Es decir que diferencias en el largo de la cilia podría regular la señalización mediada por las vías que operan a través de ella. Dado esto, no es sorprendente que defectos que resultan tanto en cilia cortas como excesivamente largas hayan sido vinculados con patologías humanas (revisado en detalle en (54,55)).

En líneas generales el largo de las cilia depende del balance entre señales y procesos que contribuyen al ensamblado y aquellos que participan en su reabsorción, y en su mayoría lo hacen afectando la dinámica de los microtúbulos que componen el axonema ciliar. El largo de las cilia puede ser modificado por proteínas estructurales o de señalización, y la

regulación se basa en afectar ya sea la dinámica de microtúbulos directamente como en modular la llegada y salida de componentes necesarios para mantener la estructura. Con respecto a esto último, por ejemplo, en MEFs la pérdida de Tctn1, Tctn2, Tmem67 y Cc2d2, cuatro proteínas de la zona de transición que forman un complejo multimérico, resulta en cilias cortas (56). En hTERT-RPE la depleción de otra de las proteínas de la zona de transición, NPHP-8, resulta en cilias más largas (57) mientras que la proteína del cuerpo basal Nde1 regula negativamente el largo de las cilias (58). La modulación del largo de las cilias por parte de proteínas del cuerpo basal y de la zona de transición podría explicarse por su función en el reclutamiento de proteínas ciliares hacia la base de la cilia. Por otro lado, como mencionábamos, cambios en proteínas que modifican directamente la estructura del axonema también llevan a modificaciones del largo de la cilia. En este sentido, las modificaciones en la producción de tubulina soluble, por ser los bloques que construyen el axonema, produce cambios en el largo de las cilias. Aumentar su producción contribuye al aumento del largo de las cilias, mientras que limitar el suplemento de tubulina, tratando por ejemplo las células con la droga estabilizadora de microtubulos Taxol, lleva a tener cilias más cortas o directamente impedir la ciliogénesis (59,60).

El largo de las cilias también puede ser regulado por modificaciones en la estabilidad del axonema. Por ejemplo dos proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), RP1 y DCD2, regulan positivamente el largo de las cilias (61,62). También modificaciones postraduccionales de la tubulina del axonema, que modifican su estabilidad, son potenciales candidatos para regular el largo de las cilias. En este sentido por ejemplo, se vió que la poliglutamilación y detirosinación de la tubulina del axonema afectan la función motora de la kinesina 2 y de esta forma modifican el largo de la cilia (63,64). Otro ejemplo lo constituye Aurora (AurA), una proteína centrosómica involucrada en el desensamblado de las cilias en asociación con la entrada a mitosis. Luego de la estimulación de la mitosis a través de factores de crecimiento, las proteínas de adhesión focal HEF1 fosforilan y activan AurA en el cuerpo basal de las cilias. AurA activada fosforila y activa la histona deacetilasa HDAC6 promoviendo la reabsorción de la cilia al desacetilar, y por tanto desestabilizar, la tubulina del axonema (65).

La mayoría de las proteínas que afectan el largo de las cilias son proteínas de señalización, especialmente quinasas, pero también fosfatasas y proteínas G. Si bien el

mecanismo por el cual estas proteínas de señalización afectan el largo de las cilias no se conoce en todos los casos, posiblemente muchas de ellas actúen afectando proteínas estructurales como las que mencionábamos anteriormente.

Rol de IFT en la regulación del largo de las cilias

Como ya mencionamos, el transporte IFT es el encargado de mover proteínas hacia dentro y fuera de la cilia y por lo tanto no debe sorprender que el alargamiento del axonema dependa de la integridad y el correcto funcionamiento de este sistema de transporte. De hecho, el proceso de IFT es central en la regulación del largo de las cilias, y puede ser modulado a diferentes niveles: durante la entrada de los complejos IFT y sus precursores dentro de la cilia, regulando la velocidad de IFT, así como controlando la frecuencia de eventos de IFT y la selección de cargos. Por ejemplo, en *C.elegans* se demostró que un miembro de la familia de las MAP quinasas *dyf-5* (una MAP quinasa conservada), regula el largo de las cilias a través de modular IFT. En la cilia de este nemátodo el transporte intraflagelar anterógrado (IFT) es mediado por dos complejos kinesina: kinesina-II y OSM-3 que funcionan juntos en el segmento medio de la cilia, mientras que solo OSM-3 media el transporte en el segmento distal. En animales mutantes de *dyf-5* se vió que la kinesina-II no queda restringida al segmento medio del axonema y OSM-3 se mueve más lento y separada de la kinesina- II y del complejo IFT (66). Esto quiere decir que *dyf-5* actúa como un regulador negativo del largo de las cilias a través de regular el acoplamiento y desacoplamiento de los motores ciliares a las partículas IFT. En varios organismos se ha demostrado que la familia de proteínas RCKs regula negativamente el largo de las cilias presumiblemente también a través de modificar de alguna forma el transporte IFT (61,66–68).

1.4 El esqueleto de actina en la regulación de las cilias

En la última década se ha visto que el esqueleto de actina cumple roles en cada una de las etapas del ciclo de vida de las cilias: tráfico de vesículas a la región pericentriolar para formar la vesícula ciliar en la primera etapa de formación del organelo, migración y anclaje del cuerpo basal en la superficie apical, mantenimiento del largo y función de la cilia, así como en su desensamblado. En suma han ido surgiendo evidencias de que es un actor

importante tanto en la ciliogénesis como en la regulación del largo de las ciliias (revisado en (69)).

En líneas generales, se ha visto que mientras la actina cortical facilitaría la ciliogénesis y la formación de ciliias de largo normal, un exceso de fibras de estrés de actina citoplasmática inhibiría su formación favoreciendo su acortamiento. Es interesante notar que casi todas las vías que regulan ciliogénesis y largo de ciliias pueden afectar la dinámica de actina y la función de diferentes proteínas de unión a actina. Dada su relevancia para esta tesis, a continuación describimos distintos aspectos en la regulación de las ciliias en los que la actina jugaría un rol importante.

Rol de la actina en migración del centrosoma y anclaje a la membrana

La interacción entre el cuerpo basal/centrosoma y la actina es crítica en casi todas las etapas de la ciliogénesis. Tanto en células con cilia primaria como en células multiciliadas, la migración del cuerpo basal hacia la superficie de la célula durante la ciliogénesis y su anclaje a la membrana plasmática es dependiente de la contracción de la actina y de las proteínas motoras de unión a actina (70,71).

Además de ser un centro organizador de microtúbulos, un trabajo reciente demostró que el centrosoma también actúa como un centro organizador de F-actina, en un proceso dependiente de Arp2/3 (72), lo que explica la presencia de numerosas proteínas de unión a actina en el centrosoma.

Rol de la actina en la formación y mantenimiento de la cilia

En líneas generales se ha visto que la depolimerización de actina promueve el ensamblado y la elongación de la cilia mientras que la polimerización y la formación de fibras de estrés se asocian con el desensamblado o la inhibición de la ciliogénesis (73–75). Por ejemplo, el tratamiento con la droga citocalasina D que depolimeriza la actina fibrilar (F-actina), induce la formación de las ciliias y su elongación en condiciones donde normalmente se promueve el desensamblado de las ciliias como por ejemplo ante una estimulación con suero en células en cultivo (73,76).

A pesar de que la relación directa entre la actina y la cilia no se conoce en profundidad, muchas proteínas asociadas a la actina y moléculas de señalización que

regulan o son reguladas por la actina, cumplen un rol en ciliogénesis y en la regulación del largo de las cilia. Por ejemplo, la sobre-expresión del microARN mir-129-3p estimula la ciliación y el largo de las cilia en células de mamífero a través de regular a la baja, al mismo tiempo, cuatro reguladores de la formación de F-actina: ABLIM1, ABLIM3, TOCA1 and ARP2 (74). Otro ejemplo de esta relación es el de la proteína de unión a actina cortactin (CTTN). CTTN cumple un rol en la formación de lamelipodios, la migración celular y promueve la polimerización de F-actina reclutando la proteína Arp2 a la red de actina cortical (77,78). CTTN es activada por la kinasa Src y es inactivada por acetilación (79,80). HDAC6, que como mencionamos anteriormente es un componente crítico de la cascada de desensamblado de la cilia al desacetilar microtúbulos (81), también desacetila CTTN (activándola) promoviendo por lo tanto su actividad polimerizante de actina para promover la pérdida de la cilia (82).

El citoesqueleto de actina también puede modular a la cilia influyendo en la actividad de factores de transcripción que afectan la expresión de distintos genes con roles en ciliogénesis, como el coactivador transcripcional YAP/TAZ. YAP/TAZ actúa como un regulador negativo de la ciliogénesis al promover la sobreexpresión de los factores de desensamblaje de la cilia Aurora A y Plk1 (83). El esqueleto de actina regula la actividad transcripcional de YAP/TAZ dirigiendo su localización subcelular. El incremento en los niveles de F-actina llevan a una translocación de YAP/TAZ hacia dentro del núcleo promoviendo la expresión de sus genes blanco, mientras que disminuir los niveles de F-actina lleva a la retención de YAP/TAZ en el citoplasma (84)

Rol de la actina en el transporte de proteínas de membrana desde y hacia la cilia

Como mencionábamos anteriormente, si bien el rol preciso de la actina en la regulación de las cilia no se comprende por completo, el modelo prevalente es que la actina polimerizada inhibe el tráfico de vesículas hacia las cilia en crecimiento (73,83,85). El tratamiento con dosis bajas de citocalasina D acorta y fragmenta las fibras de estrés pero estabiliza y potencia la formación dependiente de Arp2 de una red de filamentos de actina en la región centrosómica. En estas condiciones se vió que se acumula la proteína motora de actina Miosina-Va (Myo-Va) (86) que se requiere para la formación de las cilia (87,88). Esta proteína motora lleva asociada vesículas derivadas del Golgi con contenido ciliar y es

transportada por dineínas utilizando la red de microtúbulos hacia la región centrosómica. Una vez ahí Myo-Va utiliza la red de actina filamentosa para transportar las vesículas preciliares hacia los apéndices distales del centriolo madre (86).

Dadas estas evidencias, queda clara la importancia de comprender en profundidad el vínculo entre el citoesqueleto de actina y la cilia como aspecto fundamental para entender la regulación funcional de estos organelos.

1.5 Ciliopatías

Consistente con su conservación evolutiva, ubicua distribución y participación en diferentes vías de señalización, se ha visto que defectos en la formación, mantenimiento y/o función de las cilia derivan en una amplia variedad de enfermedades humanas que colectivamente se han denominado ciliopatías. Este grupo de patologías comprende desde fenotipos relativamente específicos o restringidos a un determinado órgano o tejido, como por ejemplo la poliquistosis renal, hasta síndromes altamente pleiotrópicos que afectan múltiples órganos y sistemas como lo son los síndromes de Joubert (JS; OMIM 213300), Alström (ALMS; OMIM 203800), Meckel-Gruber (MKS; OMIM 249000) y Bardet-Biedl (BBS; OMIM 209900) (89) (**Tabla 1**).

Tabla 1 | Principales fenotipos observados en ciliopatías.

PKD: enfermedad policística del riñón; **NPHP**: nefronoptosis; **MKKS**: Síndrome de McKusick–Kaufman; **SLSN**: Síndrome de Senior-Loken; **EVC**: Ellis-van Creveld; **JATD**: displasia torácica asfixiante de Jeune; **OFD**: síndrome orofaciodigital; **ALMS**: Síndrome de Almstrom; **JS**: Síndrome de Joubert; **BBS**: Síndrome de Bardet-Biedl; **MKS**: Síndrome de Meckel–Gruber; **CNS**: sistema nervioso central. Adaptado de Cárdenas-Rodríguez et al., 2009 (28).

	PKD	NPHP	MKKS	SLSN	EVC	JATD	OFD	ALMS	JS	BBS	MKS
Malformaciones del CNS					●	●	●	●	●	●	●
Quistes renales	●	●		●		●	●	●	●	●	●
Diabetes								●		●	
Malformaciones gonadales			●		●					●	●
Enfermedades cardíacas			●		●			●		●	●
Disfunción hepática	●	●		●		●	●	●	●	●	●
Retardo mental					●	●	●		●	●	●
Obesidad								●		●	●
Polidactilia					●	●	●		●	●	●
Disfunción pulmonar								●			
Degeneración de la retina						●		●	●	●	●
Defectos en el eje de simetría izq.-der.		●		●		●			●	●	●
Defectos del esqueleto				●		●	●				●

A su vez el grado de severidad de las ciliopatías abarca todo el espectro desde las que resultan en patologías relativamente leves hasta las letales. Con respecto al diagnóstico, dado el solapamiento clínico entre las distintas ciliopatías y debido a la aparición progresiva de ciertas características, muchas veces es difícil hacer un diagnóstico temprano preciso, lo cual tiene importantes implicancias en el tratamiento, seguimiento y asesoramiento del paciente y su familia (90).

1.6 Síndrome de Bardet-Biedl

Una ciliopatía modelo es el síndrome de Bardet-Biedl (BBS por Bardet-Biedl Sndrome) que fue descrito por primera vez a principios de 1920 por el pediatra francés Georges L. Bardet y el patólogo húngaro Arthur Biedl. Es una ciliopatía que se caracteriza fenotípicamente por seis rasgos principales que se consideran “sellos” de la enfermedad por ser los que aparecen con más frecuencia asociados a ella. Estos son: degeneración de retina, obesidad, hipogonadismo, polidactilia, retardo mental y disfunciones renales. A su vez, los pacientes pueden presentar otras patologías, secundarias con respecto a su prevalencia, que incluyen por ejemplo problemas neurológicos, retardo del habla, diabetes mellitus, anomalías dentales, anomalías del corazón, ataxia y anosmia (91,92). Si bien es de los síndromes más pleiotrópicos dentro de las ciliopatías, en el espectro de severidad se encuentra agrupado con los clínicamente moderados (90). Su prevalencia es baja, aunque la frecuencia varía según la población analizada en un rango que va de 1:160.000 en poblaciones del norte de Europa hasta 1:13.500 en algunas poblaciones Arábicas (con alta consanguinidad) (92). En poblaciones caucásicas, en general la incidencia estimada es de 1:100.000.

BBS es una de las ciliopatías genéticamente más heterogénea, con significativa variabilidad inter e intra-familiar (93,94). Al día de hoy se han identificado 21 genes causales de BBS (*BBS1-21*) (93 y referencias incluidas). Si bien en la mayoría de los casos BBS se hereda de forma autosómica recesiva, la evaluación genética de varias familias en las que las variantes encontradas no se ajustaban a este modo de herencia, demostró que en algunos casos el síndrome se hereda como un rasgo oligogénico. En estos casos, mutaciones deletéreas en más de un gen BBS, o inclusive en modificadores secundarios, interactúan para modular la penetrancia y expresividad de la enfermedad. Es interesante destacar que este tipo de herencia generalmente se observa en casos donde la función de las proteínas o los

mecanismos celulares involucrados presentan algún grado de redundancia, fenómeno que como discutiremos más adelante, aplicaría a las proteínas BBS.

1.7 Las proteínas BBS y su función

Las proteínas BBS caracterizadas a la fecha se localizan principalmente en el centrosoma y cuerpo basal de la cilia, participando activamente tanto en la formación y mantenimiento, como en la funcionalidad de estos organelos (96–102). En lo que respecta a la formación y mantenimiento de las cilia, se ha demostrado que un grupo de 8 proteínas BBS (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 y BBIP10) interactúan físicamente y forman un complejo octamérico de 438 KDa denominado **BBSoma** que cumple funciones importantes durante la ciliogénesis al mediar el transporte de moléculas hacia dentro y fuera del organelo. A su vez también se vió que una de las subunidades del BBSoma, BBIP10/BBS18, afecta la polimerización y acetilación de microtúbulos sugiriendo que el BBSoma también podría participar en la formación y mantenimiento de la cilia regulando la composición de la membrana y la dinámica de los microtúbulos del axonema (101).

Rol del BBSoma en el transporte de proteínas dentro de la cilia: relación con IFT

Las proteínas BBS se ha visto que juegan un rol importante en el ensamblado y/o la función de las partículas IFT. Como ya fue mencionado, el transporte anterógrado de IFT en *C. elegans* ocurre por la acción de Kinesin II y OSM-3 y se demostró que tanto *bbs7* como *bbs8* se requieren para coordinar su acción y estabilizar el complejo motor/IFT (103). Las proteínas BBS también participan en el ensamblado y remodelado (desensamblado y re-ensamblado) de los complejos IFT tanto en la base como en la punta de la cilia. El trabajo de Wei, Q. et al. identificó dos sitios conservados de las proteínas DYF-2 (homologo de IFT-A componente IFT144) y BBS1 que mediarían la interacción entre el BBSoma y la maquinaria IFT. En cilia mutantes para estas proteínas, el BBSoma se mantiene funcional en la base de la cilia pero no se puede unir a las partículas IFT en movimiento y se acumula en la base de la cilia. La ausencia del BBSoma en la punta de la cilia impide el reciclado de los complejos IFT (104).

Rol del BBSoma en la entrada y salida de proteínas de la cilia

El BBSoma reconoce y recubre vesículas que contienen proteínas transmembrana destinadas a la cilia (102,105). Interactúa con la GTPase Rab8 vía Rabin8 y Rab8 cumple un rol en el acoplamiento y fusión de vesículas derivadas del Golgi a la base de la cilia, sugiriendo que es crítico para mediar la llegada del BBSoma a la cilia (102,106).

También se ha visto que el BBSoma es capaz de reconocer secuencias de péptidos cortos (llamadas señales de localización ciliar) en proteínas destinadas a la membrana ciliar que de esta forma selecciona para su transporte hacia la cilia. Sin embargo no se han encontrado denominadores comunes en estas secuencias y la interacción directa entre estas señales y el BBSoma solo se ha probado en un número limitado de casos. Las primeras proteínas de membrana ciliar cuyo patrón de localización se vio alterado por el BBSoma fueron Somatostatin Receptor 3 (Sstr3) y Melanocortin concentrating hormone receptor 1 (Mchr1), dos GPCRs que normalmente se localizan en la cilia de las neuronas y cuya localización se pierde cuando se altera la función del BBSoma o ARL6 (105,107,108). El reconocimiento directo y específico del loop intracelular de Sstr3 (que codifica una señal de localización ciliar) por parte del BBSoma apoya su rol directo en mediar la entrada de Sstr3 a la cilia (105,109). La función del BBSoma en la importación de proteínas a la cilia se vio reforzada por descubrimientos similares donde se veía disminución de los niveles de PC1 y Smo en cilias depletadas del BBSoma o Arl6/BBS3 y por la interacción del BBSoma con las colas citoplasmáticas de estas proteínas (109,110).

A su vez se ha visto que el BBSoma se requiere para la salida de la proteína asociada a la membrana phospholipase D (PLD) de la cilia de *Chlamydomonas* indicando el rol del BBSoma en la salida de proteínas de la cilia (111,112). Rol que se vio reforzado por estudios más recientes en células de mamífero que muestran que tanto el BBSoma como Arl6 se requieren para la salida de la cilia del receptor de dopamina 1 (Drd1), Sstr3, Gpr161 y el receptor de la vía de Shh, Patched-1 (113–115). Si bien es posible que el BBSoma medie tanto la entrada como la salida de proteínas a la cilia dependiendo del contexto y la proteína específica, una revisión reciente del tema plantea un modelo que limita la función del BBSoma solo a sacar proteínas de la cilia (116). Se basa en la observación de que GPCRs activas que no pueden ser sacadas de la cilia por el BBSoma, se empaquetan y liberan en vesículas extracelulares desde la punta de la cilia en un proceso llamado ectocitosis

dependiente de señales (117). Por lo que la disminución observada de receptores de señalización en mutantes de proteínas BBS no se puede descartar que se deba a su ectocitosis en lugar de a defectos en su importación. La identificación de la pequeña proteína G IFT27 como BBS19 (118) resultó crítica para entender la regulación de la salida del BBSoma de la cilia. En mutantes de IFT27, el BBSoma, ARL6/BBS3 y LZTFL1/BBS17 se encuentran enriquecidas en la cilia sugiriendo que IFT27 remueve estas proteínas de la cilia y junto con ellas también a Ptch1 y Smo (119). LZTFL1/BBS17 también se vió que regula el tráfico del BBSoma y de Smo (110,113).

Rol del BBSoma en la regulación de vías de señalización mediadas por la cilia

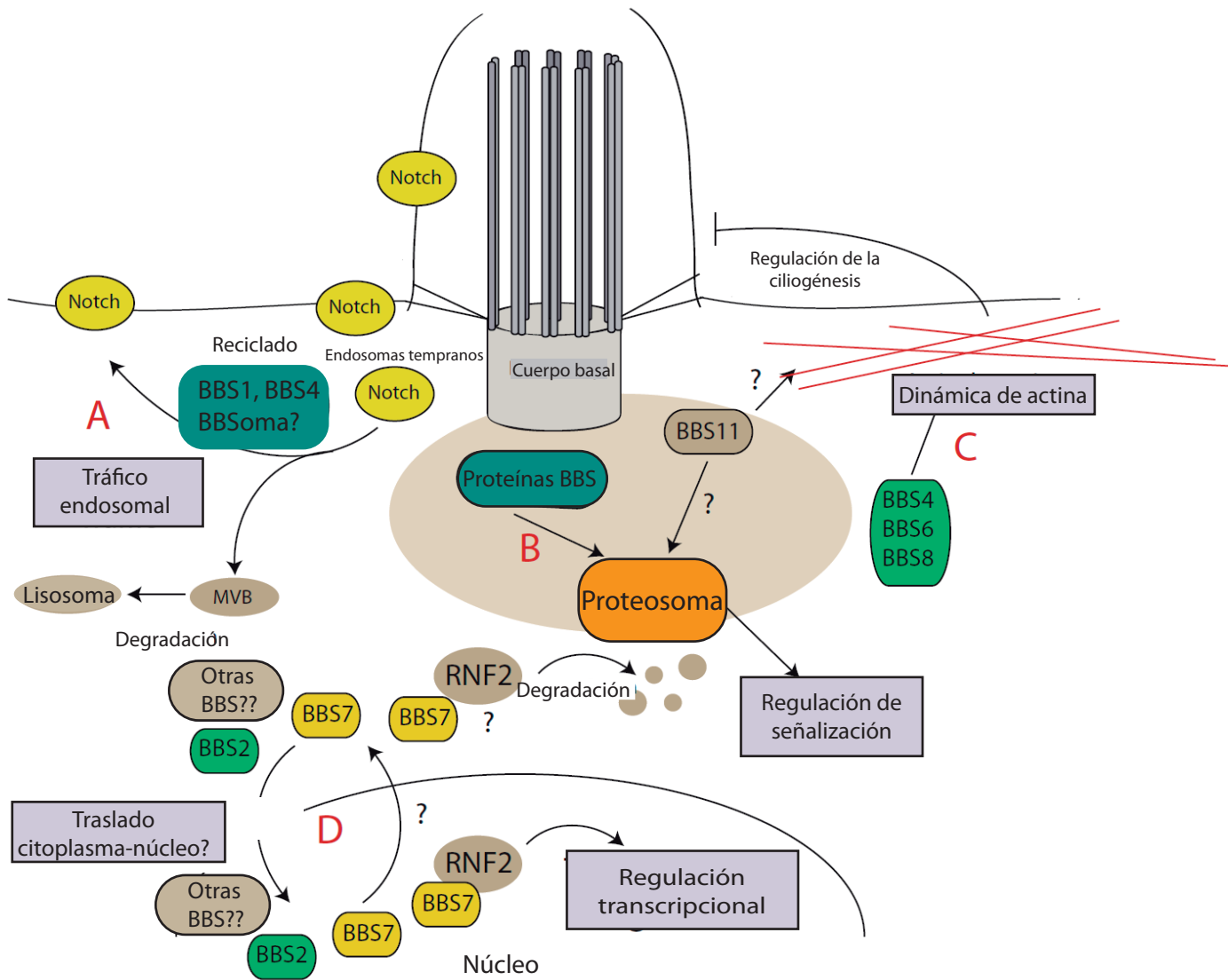
Se ha demostrado que la ausencia de proteínas BBS resulta en problemas durante la transducción de las vías de Shh y de Wnt. Con respecto a la vía de Shh, se ha visto que el BBSoma media la salida de Patched-1 (Ptch1) y de Smoothed (Smo), dos componentes de la vía de Shh. La depleción de proteínas BBS en ratones resulta en la acumulación de Ptch1 y Smo en la cilia y en una disminución de la señalización por esta vía (110,120).

En el caso de la vía de Wnt, la depleción de proteínas BBS resulta en un aumento en la expresión de los genes blanco de la vía canónica dependiente de β -catenina al mismo tiempo que reduce la vía no canónica (PCP) (38,121). Se vió que la supresión de BBS1, BBS4 y BBS6 resulta en la estabilización de β -catenina con el consecuente aumento en la transcripción de uno de los genes blancos de la vía canónica, el factor de células T (T-cell factor, TCF), tanto en el pez cebra como en células ciliadas de mamífero (121). Por otro lado, se vio que mutaciones en genes BBS comparten fenotipos con mutantes que presentan defectos en la vía PCP como la alteración de la migración celular durante la gastrulación en pez cebra y dificultad en el cierre del tubo neural en ratones (38).

El rol de las proteínas BBS en el contexto de las cilias no se limita a los componentes del BBSoma. BBS3/ARL6 por ejemplo no es parte del BBSoma pero es una GTPasa de la familia Ras fundamental para la función del BBSoma ya que media su reclutamiento a la membrana y su entrada a la cilia (105). BBS6, BBS10 y BBS12 forman un complejo de chaperonas junto con la familia de chaperoninas CCT/TRiC que asiste al ensamblado del BBSoma (122). BBS17 y BBS19 como se mencionaba anteriormente colaboran en su salida de la cilia. Si bien el foco principal en el estudio de estas proteínas se ha puesto en su función en

el contexto de la cilia, trabajos de nuestro grupo y otros, ha demostrado que además de su rol en la cilia varias proteínas BBS participan en otras funciones importantes en la fisiología de las células. A continuación se describen algunas de ellas (**Figura 4**).

Figura 4 | Roles extraciliares de las proteínas BBS. Representación esquemática de posibles roles de las proteínas BBS que no están restringidos a la formación y mantenimiento de la cilia. **A.** Algunas de las proteínas BBS participan en la regulación del tráfico endosomal. La depleción de BBS1 y BBS4 afecta el reciclado del receptor Notch a la membrana plasmática. **B.** Varias proteínas BBS interactúan con subunidades del proteosoma y regulan su actividad potencialmente afectando vías de señalización. **C.** Algunas proteínas BBS se ha reportado que afectan la dinámica de actina, que termina regulando ciliogénesis pero también podría estar regulando otros procesos celulares dependientes de actina. **D.** BBS7 y BBS2 (y posiblemente otras BBSs) son capaces de entrar al núcleo e interactuar con el remodelador de la cromatina RNF2 regulando los niveles de esta proteína y así la transcripción de sus genes blanco. Una posibilidad que aún debe ser testada es que las proteínas BBS, como por ejemplo BBS7, regule los niveles de RNF2 al afectar su disponibilidad para ser degradada por el proteosoma. Tomado y adaptado de R. Novas et al., 2015 (123).



Regulación del tráfico intracelular

Varias de las proteínas BBS median el transporte intracelular de vesículas no solo hacia la cilia sino también hacia la membrana plasmática. Un ejemplo es el reciclado endosomal del receptor Notch a la membrana plasmática mediado por BBS1 y BBS4. Notch es un receptor presente tanto en la membrana ciliar como en la plasmática donde cumple roles de señalización a través de su interacción con los ligandos de superficie Delta y Serrate/Jagged (DSL) en sus células vecinas. Cuando Notch se activa, se cliva para producir un dominio intracelular, que se transloca al núcleo para regular la transcripción de sus genes blanco. Por lo tanto, una parte importante de la regulación de esta vía ocurre controlando los niveles de Notch en la membrana a través de regular su llegada y su internalización por la vía endosomal. En este contexto, se vió que la falta de de BBS1 y BBS4, resulta en una hiperactivación de la vía debido a que se reduce el reciclado y el receptor activado se acumula en endosomas tempranos desde donde continúa señalizando. Es decir que hay un defecto en el reciclado del receptor y su vuelta a la membrana. Esto sugiere que las proteínas BBS participan en el transporte desde los endosomas tempranos a la superficie de las células **(Figura 4A)** (124).

Regulación de la actividad del proteosoma

La proteólisis mediada por el proteosoma es importante para mantener los niveles celulares apropiados de proteínas y es también una estrategia utilizada por la célula para regular varias vías de señalización incluyendo Sonic Hedgehog, la vía canónica de Wnt y Notch. El centrosoma y la región pericentriolar se encuentra enriquecida en proteínas del proteosoma y reguladoras (125).

Se observó que algunas de las proteínas BBS (1, 2, 4, 6, 7 y 8) son capaces de interactuar con subunidades del proteosoma y a su vez se ha visto que pueden modular la actividad de ciertas vías a través de regular la actividad del proteosoma. Por ejemplo, niveles disminuídos de BBS1 y BBS4, generan cambios en la composición de las subunidades del proteosoma lo que lleva a la inhibición de su actividad evidenciado por el aumento en los niveles de las proteínas Gli2, Gli3 y Notch que normalmente son procesadas por este complejo (121,125,126).

Regulación de la transcripción génica

Recién mencionábamos que a través de afectar la actividad del proteosoma, en un proceso independiente de la cilia, algunas proteínas BBS son capaces de regular la expresión génica modulando vías de señalización. A su vez, nuestro grupo ha demostrado que varias de las proteínas BBS (BBS1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 10) interactúan con RNF2, un miembro del complejo polycomb remodelador de cromatina. Bajar los niveles de BBS1, BBS2, BBS4 o BBS7 resulta en un aumento en los niveles de RNF2, que al menos para la disminución de BBS4 y BBS7 se traduce en cambios en los niveles de expresión de varios de los genes blanco de RNF2. BBS7 es capaz de entrar al núcleo para interactuar con RNF2 y su translocación activa del citoplasma al núcleo podría estar asociada a su capacidad de regular la degradación de RNF2 mediada por el proteosoma (127).

La capacidad de entrar al núcleo de una proteína BBS no estaría restringida a BBS7. Un estudio reciente muestra que BBS6 también es transportada activamente entre el citoplasma y el núcleo y un mutante que pierde su habilidad de entrar al núcleo sin embargo retiene su función ciliar. BBS6 interactúa con SMARCC1, un componente de la familia de remodeladores de cromatina SWI/SNF, y modula su localización subcelular, lo cual se traduce en cambios en el perfil transcripcional (128). Este trabajo en resumen revela un nuevo rol de una proteína BBS en el transporte núcleo/citoplasma de otra proteína remodeladora de cromatina.

Dinámica del esqueleto de actina

Como mencionábamos anteriormente la dinámica del citoesqueleto de actina altera la formación y el largo de las cilias. Específicamente se vió que la polimerización del esqueleto de actina inhibe la ciliogénesis. En este sentido se observó que BBS4, BBS6 y BBS8 inhiben la polimerización de actina, función que cumplirían a través de modificar la actividad de RhoA (129). El efecto sobre la polimerización de actina puede estar alterando otras actividades celulares dependientes de actina además de la formación de las cilias, como ser la migración celular, extendiendo el alcance funcional de las proteínas BBS por fuera de su función en cilia.

Esta cantidad de funciones extraciliares de las proteínas BBS podría explicar en parte por qué se trata de una de las ciliopatías más pleiotrópicas y también podría ayudar a entender mejor la etiología del síndrome.

1.8 Genes modificadores

Como mencionábamos anteriormente el síndrome de Bardet Biedl es genética y clínicamente heterogéneo con múltiples ejemplos de variabilidad fenotípica inter e intra familiar. Esta variabilidad es explicada, al menos en parte, por su modo de herencia de tipo oligogénica donde mutaciones en más de un gen pueden interactuar afectando la presentación clínica. Estas interacciones pueden darse entre distintos genes causales de BBS: genes que cuando mutados son suficientes para generar la patología. Pero también pueden haber interacciones entre genes BBS y modificadores secundarios: genes que por sí solo no son suficientes para causar la enfermedad pero que de estar mutados pueden afectar su presentación. En el caso de BBS se han identificado ocho genes modificadores. Es interesante destacar que, con excepción de *CCDC28B*, todos los restantes son genes causales de otras ciliopatías. Las causas que determinan si una mutación en un gen determinado resulta en una u otra ciliopatía son varias pero un factor importante es el tipo y severidad de las mutaciones (por una revisión del tema ver (28)). Por ejemplo, mutaciones nulas en los genes *MKS1*, *MKS2* y *MKS3* resultan en la ciliopatía más severa que es el síndrome de Meckel Gruber (130). Sin embargo mutaciones hipomorfas en estos genes se han reportado en combinación con mutaciones en genes BBS. Estos pacientes desarrollan BBS y en algunos casos presentan características raras para BBS pero comunes para MKS (131). Estas observaciones muestran el alto grado de similitud tanto a nivel celular (defectos en las cilias) como a nivel genético entre distintas ciliopatías. Como mencionábamos, *CCDC28B* es el único gen que todavía no ha sido asociado a otras ciliopatías.

1.9 CCDC28B: un modificador secundario del síndrome de Bardet-Biedl

Identificación

Como decíamos, los modelos que explican los fenómenos de oligogenicidad se basan en la existencia de sistemas redundantes en los que distintas proteínas participan de un mismo proceso y pueden, en mayor o menor medida, suplantar la función de otras, haciendo necesaria la co-existencia de mutaciones en varias de ellas para abolir completamente la funcionalidad de un complejo o una vía. Surgió entonces la hipótesis de que genes que codificaran proteínas que co-localizaran con las BBS, interactuaran con ellas o compartieran las mismas vías de señalización, podrían ser buenos candidatos tanto a causar BBS como a contribuir en la modificación fenotípica del síndrome (97). Mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras se identificaron proteínas que pudieran interactuar con una de las proteínas BBS conocidas, BBS4, encontrándose 60 posibles interactores. Debido al rol biológico conocido de las BBS en las cilias, para filtrar y priorizar la lista de interactores, se buscó aquellas que al mismo tiempo formaran parte del proteoma ciliar, una colección enriquecida en proteínas ciliares (132,133). Solo una secuencia se encontró en ambos juegos de datos: Coiled-Coil Domain Containing Protein 28B o *CCDC28B* (**Figura 5A**). Posteriormente se mostró que esta interacción no es restringida a BBS4, sino que también se encontró por co-inmunoprecipitación que CCDC28B interactúa con otras proteínas BBS (**Figura 5B**) (97).

Rol en el desarrollo y la aparición de la enfermedad

Con el objetivo de determinar si *CCDC28B* cumplía un rol en la aparición y/o desarrollo de la enfermedad, se secuenció *CCDC28B* en una colección de pacientes con BBS. De esta manera se detectó una alteración en la penúltima base del exón tres (el gen está compuesto por 6 exones) de *CCDC28B*, que si bien no resulta en un cambio de aminoácido, afecta el splicing normal del gen. Se demostró que la transversión C-T en esta posición (nucleótido 430; C430T) afecta el patrón de splicing, favoreciendo la utilización de un sitio aceptor de splicing críptico y la producción de una isoforma con una delección de cinco bases que resulta en un cambio del marco abierto de lectura y la introducción de un codón de

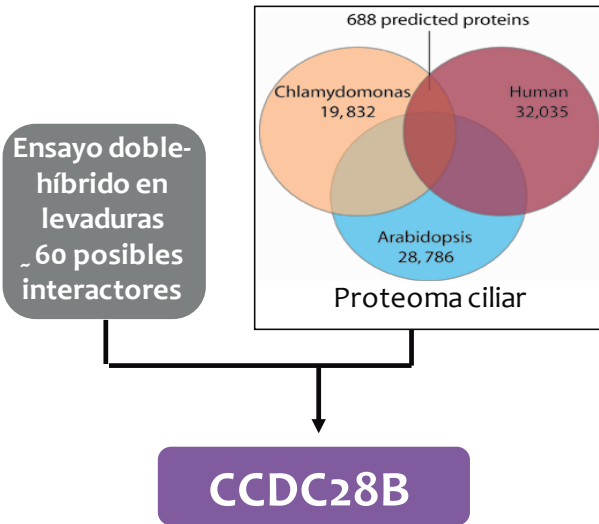
terminación prematuro (**Figura 5C**). Por lo tanto la mutación tiene su efecto a nivel del ARN resultando en una disminución en la cantidad de ARNm de *CCDC28B* disponible.

Sin embargo, el análisis de un grupo de familias afectadas con BBS determinó que esta mutación en *CCDC28B* no era suficiente para desarrollar la patología pero si podía interactuar con mutaciones en otros genes BBS para modular la presentación y severidad del síndrome. Por ejemplo, en algunas familias se observó que solo estaban afectados (diagnosticados con BBS) aquellos individuos que eran homocigotas para una mutación en un gen causal BBS y además eran heterocigotas para esta mutación en *CCDC28B*. En estas mismas familias, tanto los homocigotas para la mutación en el gen *BBS* sin la mutación en *CCDC28B*, así como los heterocigotas para la mutación en *BBS* y *CCDC28B*, no estaban afectados. En otras familias se observó que hermanos homocigotas para la misma mutación en un gen *BBS*, donde uno de ellos portaba además la mutación en *CCDC28B*, este presentaba una patología más severa. En los casos de estas familias mencionadas anteriormente por lo tanto, la reducción en los niveles de *CCDC28B* causado por la mutación C430T se correlacionaba con diferencias en penetrancia y expresividad del síndrome. Por tanto, *CCDC28B* es un ejemplo más de que la oligogenicidad podría explicar, al menos en parte, la alta variabilidad clínica inter y, principalmente, intrafamiliar que presenta el síndrome (97) (**Figura 5D**). En suma, mutaciones en *CCDC28B* no son suficientes para producir la enfermedad, pero en algunas familias sí contribuyen a modificar la severidad con la que se manifiesta cuando se encuentran en un contexto genéticamente sensibilizado por la presencia de mutaciones en otros genes BBS (97).

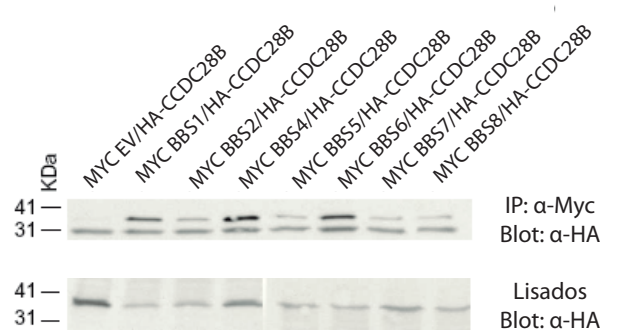
Se identificaron cinco isoformas de *CCDC28B* y aunque su importancia fisiológica aún está por ser determinada, se sabe que todas ellas mantienen la porción del exón tres que se encontró mutada. Las dos isoformas más abundantes son las codificadas por los transcritos NM_024296 y BC_002462, los cuales difieren en el último exón (**Figura 6**).

Figura 5| Identificación de CCDC28B como un modificador secundario del síndrome de Bardet-Biedl. **A.** CCDC28B se identificó luego de filtrar los resultados de un ensayo doble híbrido realizado en levaduras usando BBS4 como carnada, con el proteoma ciliar, una colección enriquecida en proteínas ciliares. **B.** CCDC28B interactúa con las proteínas BBS. HA-CCDC28B inmunoprecipita con todas las proteínas BBS testeadas que fueron expresadas fusionadas al tag Myc. Las IP fueron realizadas con anticuerpo anti-Myc y se detectó a CCDC28B tanto en las IP como en los lisados con un anticuerpo anti-HA. **C.** En pacientes heterocigotas para la mutación C430T aparte del transcripto de CCDC28B salvaje, se produce un transcripto mutado, que contiene una deleción de 5 pb (recuadro naranja) y un codón prematuro de terminación (PTC). El cambio en la posición C430T se muestra en el contexto de un posible sitio de unión para la proteína SR SC35 (de splicing component de 35 kDa) (cuadro violeta, la matriz de secuencia consenso se muestra abajo). **D.** En el pedigree PB029 a y b, la presencia del alelo CCDC28B 430T se segrega con un fenotipo penetrante, ya que el padre que no está afectado es homocigota para la mutación en BBS1 (a) pero salvaje (WT) para CCDC28B (b) Adaptado de Badano et al., 2006 (97).

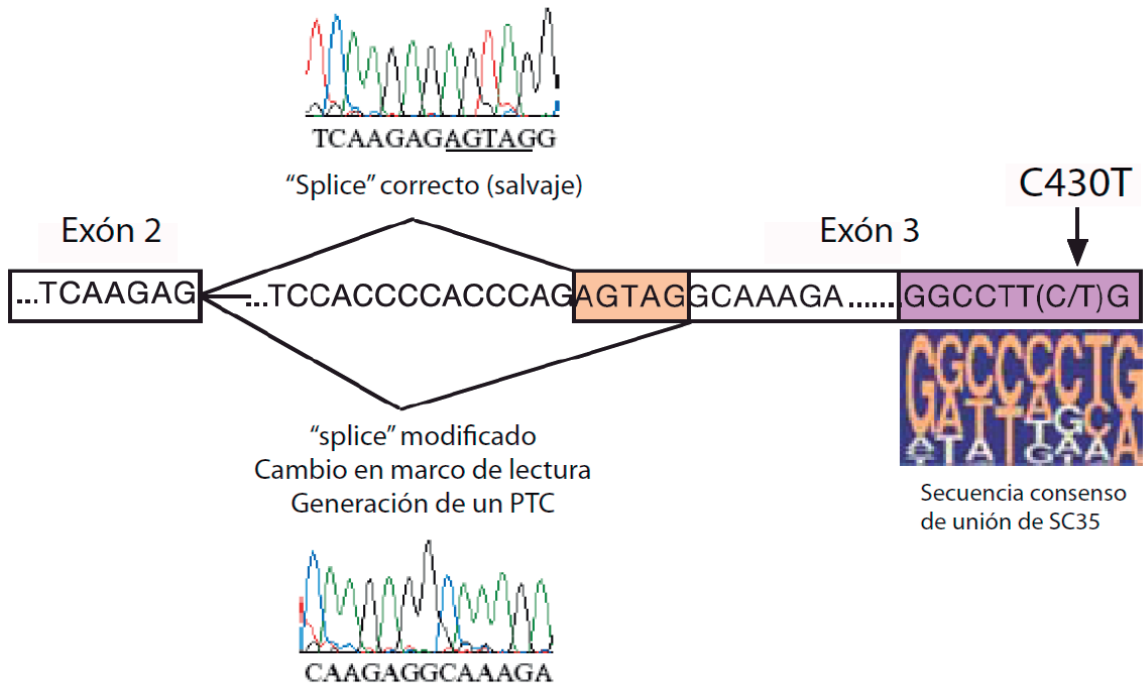
A.



B.



C.



D.

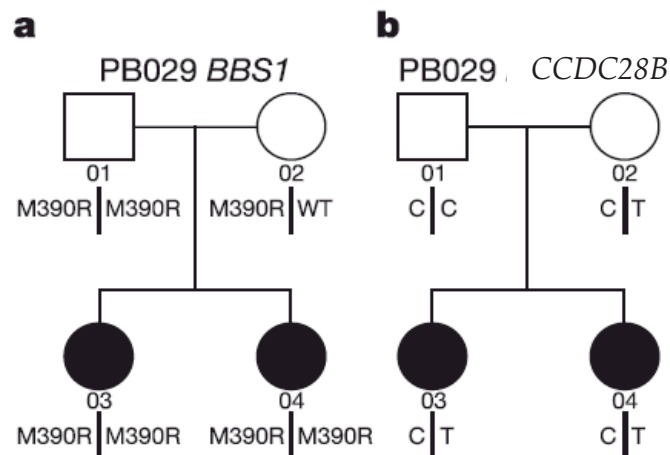
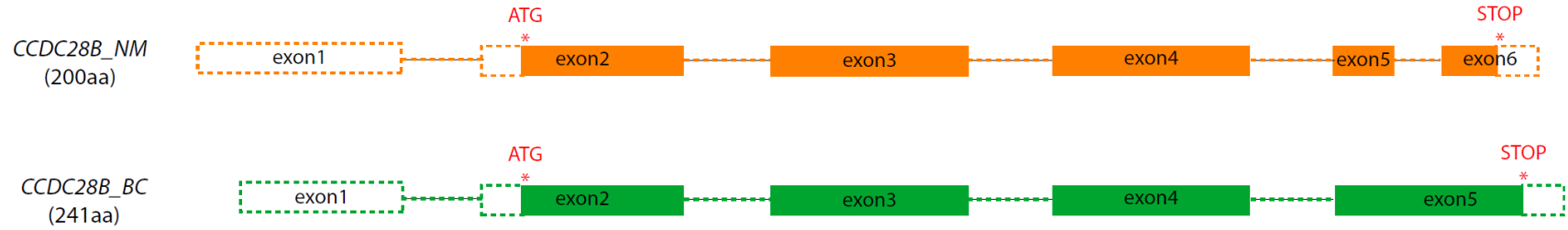


Figura 6| Estructura y transcritos del gen *CCDC28B* en humanos. **A.** Transcritos predichos por el buscador genómico *Ensembl*. Se predicen dos variantes de 200 (NM) y 241 aa (BC). Los otros transcritos (no mostrados) son degradados por el mecanismo “nonsense mediated decay” o no contienen un marco abierto de lectura. **B.** Alineación de las secuencias de las isoformas NM y BC. Se indica el grado de conservación en cada posición y la secuencia consenso. Tomado de la tesis de doctorado de la Dra. Magdaléna Cárdenas.

A.



B.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110																																										
CCDC28B_200aa	MDD	KKKRS	PKPCL	AQPA	QAPGTL	RRVP	VPVPT	SHSG	SLALGL	PHLP	SPKQ	RAKFK	RVGKE	KCR	PVLAG	GGSGS	SAGT	PLQHS	FLTE	VTDV	YEMEG	GLLN	LLNDF	HSG	RQLQ	AFG	KECS	SFEQ	LE																								
CCDC28B_241aa	MDD	KKKRS	PKPCL	AQPA	QAPGTL	RRVP	VPVPT	SHSG	SLALGL	PHLP	SPKQ	RAKFK	RVGKE	KCR	PVLAG	GGSGS	SAGT	PLQHS	FLTE	VTDV	YEMEG	GLLN	LLNDF	HSG	RQLQ	AFG	KECS	SFEQ	LE																								
Conservación	*****																																																				
Consenso	MDDKKKRS PKPCL AQPAQAPGTLRRVPVPVPTSHSGSLALGLPHLPSPKQRAKFKRVGKEKCRPVLAGGGSGSAGTPLQHSFLTEVTDVYEMEGGLLNLLNDFHSGRQLQAFGKECSFEQLE																																																				
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240																																									
CCDC28B_200aa	HVRE	MQEKL	ARLHF	SLDVC	GEEED	DEEED	GVTE	GLPEE	EQKKT	MADR	NLDQL	LSNLE	DL	SN	SIQ	LHLA	ENA	EPEEQ	SAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																							
CCDC28B_241aa	HVRE	MQEKL	ARLHF	SLDVC	GEEED	DEEED	GVTE	GLPEE	EQKKT	MADR	NLDQL	LSNLE	DL	SN	MY	PFQ	GTR	LCVC	VPERS	VSS	S	PAL	QEYS	H	T	N	F	P	T	S	C	S	P	V	R	F	S	H	R	L	P	K	P	R	Y	R	N	L	E	F	P	Q	N
Conservación	*****984867786948458688-----																																																				
Consenso	HVREMQEKLARLHFSLDVCGEEEDDEEEDGVTEGLPEEQKKT MADRNL DQLLSNLEDL SN																																																				

Rol biológico de CCDC28B: su vinculación con las cilias y mTORC2

CCDC28B codifica una proteína de 200 aminoácidos, conservada en los metazoarios ciliados, que no presenta ningún motivo reconocible aparte del dominio coiled-coil que le da el nombre ubicado en la región C- terminal de la proteína (134). Estos dominios están típicamente involucrados en mediar interacciones proteína-proteína (135). La región N-terminal de la proteína se predice como una región desordenada (136). Sin embargo, el análisis *in silico* de su secuencia, utilizando un programa que predice motivos funcionales en proteínas (The Eukaryotic Linear Motif RESOURCE FOR Functional Sites in Proteins) (137), identifica posibles motivos que podrían ser relevantes en su función tanto dentro como fuera de las cilias. Por ejemplo se predice que CCDC28B presenta un motivo de unión a calmodulina, un motivo activador de MAPK y señales de localización y exportación nuclear (NLS por “nuclear localization signals” y NES por “nuclear export signals”, respectivamente) (134).

El trabajo de tesis doctoral de la Dra. Magdalena Cárdenas-Rodríguez en el laboratorio tuvo como objetivo comenzar a diseccionar el rol funcional de esta proteína y particularmente entender su relación con la biología de las cilias. Hoy sabemos que CCDC28B juega un rol en la regulación del largo de las cilias (134) y en la modulación de la vía mTOR, en particular sobre el complejo 2 de la vía, mTORC2 (138).

En cuanto a su rol en cilia, sabemos que la depleción de CCDC28B, tanto en células en cultivo como *in vivo* en pez cebra (*Danio rerio*), resulta en una reducción en el largo de estos organelos. El knockdown de *ccdc28b* en pez cebra resulta en una serie de fenotipos que se asemejan a los vistos para distintos morfantes de genes ciliares y otros mutantes BBS. Por ejemplo, los morfantes *ccdc28b* se caracterizan por defectos en la pigmentación, malformaciones craneo-faciales e hidrocefalia. A su vez, estos embriones presentan defectos en cilias en diferentes tejidos ciliados (134).

Para comenzar a diseccionar el mecanismo por el cual CCDC28B afecta ciliogénesis, se comenzó por la identificación del complejo proteico en el cual participa, una herramienta poderosa para ganar información funcional sobre proteínas. Por este motivo, en el laboratorio hemos realizado dos ensayos de doble híbrido (Cytotrap, Stratagene) en levaduras. En primer lugar, se realizó uno utilizando la isoforma BC_002462 (CCDC28B BC) que codifica la proteína más extensa (242 aa) y luego se utilizó la isoforma NM_024296

(CCDC28B NM) que se traduce en una proteína de 200 aa (97). En el primer ensayo realizado con la isoforma BC_002462 se identificaron cuatro interactores: cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP), Nck-associated protein 5 (NCKAP5), protein tyrosine phosphatase receptor A (PTPRA) y mitogen-activated protein kinase associated protein 1 (MAPKAP1), también llamada SAPK1 interacting protein (SIN1). De particular interés resultó SIN1, miembro de uno de los complejos mTOR (mTORC2).

La vía de mTOR (del inglés “mechanistic or mammalian target of rapamycin”) es un regulador central de la homeostasis celular. Integra señales extra e intracelulares y sirve como centro regulador del metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación celular (139). La vía de mTOR por tanto regula procesos claramente alterados en algunos de los fenotipos que caracterizan BBS así como otras ciliopatías como por ejemplo la formación de quistes renales donde se observa, entre otros defectos, un desbalance entre proliferación y diferenciación. Esta vía está compuesta por dos grandes complejos mutiproteicos, mTORC1 y mTORC2, que tienen una composición distinta y regulan diferentes procesos celulares. mTORC1 fue el primero de ambos complejos en ser caracterizado, y está compuesto por cinco proteínas: mTOR que es la serina/treonina quinasa que nuclea ambos complejos, RAPTOR, mLST8, PRAS40 y DEPTOR. mTORC1 responde e integra señales de disponibilidad de aminoácidos, estrés, oxígeno, energía y factores de crecimiento, para regular la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular promoviendo procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y de lípidos así como limitando procesos catabólicos como la autofagia (por revisiones ver (139,140)). mTORC2 está compuesto por seis proteínas algunas de las cuales son compartidas con mTORC1: mTOR, RICTOR, mSIN1, PROTOR-1, mLST8 y DEPTOR. En comparación con mTORC1, es mucho menos lo que se conoce sobre la vía de mTORC2 pero se ha determinado que juega un rol en supervivencia, proliferación, metabolismo y principalmente en la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular (141). mTORC2 regula muchos de estos procesos celulares a través de la activación de diferentes quinasas de la subfamilia AGC como ser Akt y PKC α . Se demostró por ejemplo que mTORC2 fosforila directamente a AKT en la serina 473 y esta fosforilación es requerida para su completa activación (142). Sumado al rol central de esta vía en la homeostasis celular, varios reportes vinculan la vía de mTOR directamente con las ciliias, aunque los estudios publicados se han centrado principalmente en mTORC1 (143–146)

Además de su función como miembro estructural de mTORC2, SIN1 fue inicialmente identificada en *S. pombe* como un interactor de la quinasa MAP Sty1, un miembro de la vía SAPK (147). El gen ortólogo humano fue clonado en el año 2004 y en mamíferos se la caracterizó como una proteína que interactúa e inhibe a MEKK2, quien activa a diferentes MAPKs (148–151). Por otra parte, también se ha demostrado que SIN1 inhibe la activación de las rutas ERK y JNK a través de la GTPasa Ras (152). En nuestro laboratorio se demostró que CCDC28B interactúa con SIN1, y que esta interacción es relevante tanto en el contexto de la regulación del largo de la cilia como en la modulación de la actividad de mTORC2. Primero se demostró que CCDC28B actúa como un regulador positivo de la vía de mTORC2 facilitando el ensamblado o promoviendo la estabilidad del complejo. Se vio que depletar CCDC28B resulta en una reducción de la actividad de mTORC2 y su sobreexpresión en un aumento en la actividad de éste complejo. Esto se correlaciona con la cantidad de complejo disponible, ya que en ausencia de CCDC28B las interacciones SIN1-RICTOR y SIN1-mTOR se encuentran reducidas, efecto que no se explica por cambios en los niveles totales de SIN1, Rictor o mTOR que no se ven afectados (138).

Luego se mostró que la habilidad de CCDC28B de regular el largo de la cilia depende, al menos en parte, de su interacción con SIN1. Sin embargo, los datos mostraron que el rol de SIN1 en ciliogénesis es independiente de su rol en el contexto de mTORC2. Se mostró primero que los embriones morfantes de *sin1* en pez cebra presentan cilias más cortas mientras que este efecto no se observó depletando *rictor*, otro componente principal de mTORC2. Luego se realizaron ensayos de interacción génica entre *ccdc28b* y *sin1* en pez cebra donde se mostró que estos dos genes interactúan para regular las cilias. Por último, mediante ensayos de rescate se observó que la sobreexpresión de *sin1* es capaz de rescatar, por lo menos parcialmente, el fenotipo ciliar de *ccdc28b* (138).

Si bien todavía no conocemos el mecanismo por el cual SIN1 afecta las cilias, se sabe que regula, al menos indirectamente, diferentes cascadas de señalización de MAPKs (mitogen activated protein kinases), y resulta interesante que las MAPKs han estado implicadas en la regulación de IFT y en ciliogénesis (153). Por tanto, CCDC28B podría regular el largo de la cilia a través de su interacción con SIN1 (o mediando la interacción de SIN1 con otras proteínas) y la consecuente regulación de la señalización por MAPKs. Por otro lado CCDC28B interactúa con varias proteínas BBS que forman parte del BBSoma, un

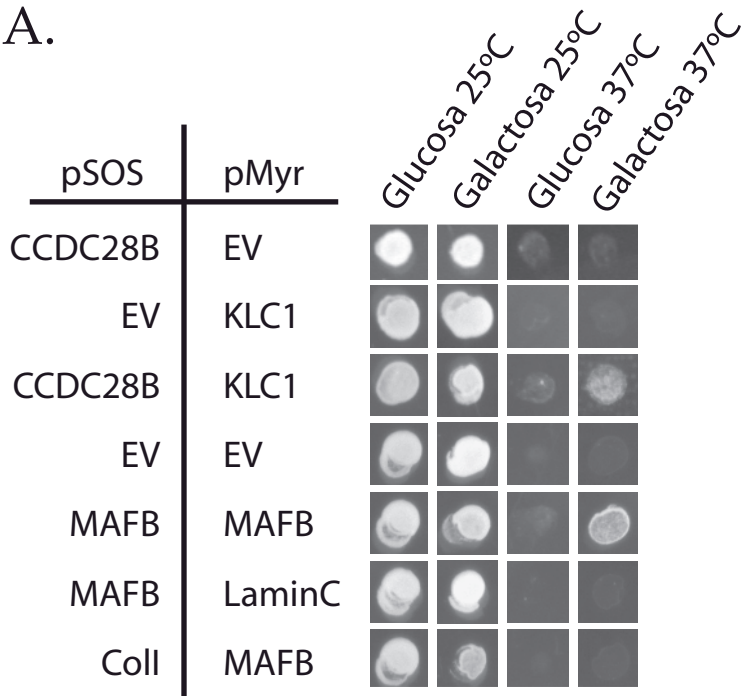
complejo que se sabe participa en ciliogénesis (102). Por lo tanto, otra posibilidad es que CCDC28B afecte la cilia, por lo menos en parte, en forma independiente a SIN1.

Identificación de nuevos interactores

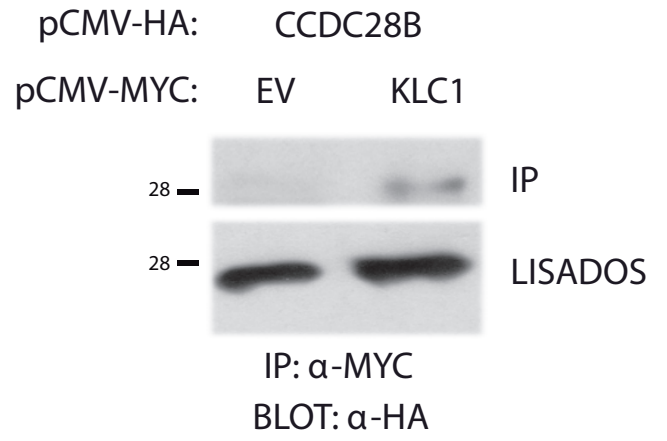
En el marco de mis estudios para la tesina de grado y posteriormente mi maestría nos enfocamos en la identificación y caracterización de nuevos interactores de CCDC28B. En un ensayo de doble híbrido utilizando la isoforma NM de CCDC28B (200 aa; NP_077272.2) identificamos cuatro potenciales interactores: microtubule end binding protein 3 (EB3), kinesin light chain 1 (KLC1), eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (EIF3) y CCR4NOT (CNOT). Nos resultó de particular interés la interacción de CCDC28B con EB3 y KLC1, ya que éstas son proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos y al transporte a través de los mismos. En este contexto, pensamos que este tipo de interacciones podrían brindar información relevante para entender el mecanismo por el cual CCDC28B regula la actividad de SIN1 y potencialmente del BBSoma (que se ha demostrado que interacciona y es transportado utilizando el citoesqueleto de microtúbulos de la célula (99,101)). Por estos motivos en esta tesis centramos nuestros estudios en KLC1 (**Figura 7**).

Figura 7| CCDC28B interactúa con el componente de la kinesina 1, KLC1. **A.** La co-expresión de CCDC28B y KLC1 permite a levaduras de la cepa *cdc25H* crecer a la temperatura no permisiva de 37 °C solo en galactosa que desencadena la expresión de las construcciones con pMyr. Controles: MAFB-MAFB (positivo); MAFB-Lamin C (negativo), ColI-MAFB (negativo), pSOS EV-pMyr EV (negativo) and pSOS CCDC28B-pMyr EV (negativo). **B.** HA-CCDC28B se detecta solamente en los inmunoprecitados con MYC KLC1. Los lisados celulares se muestran como control de la presencia de proteína.

A.



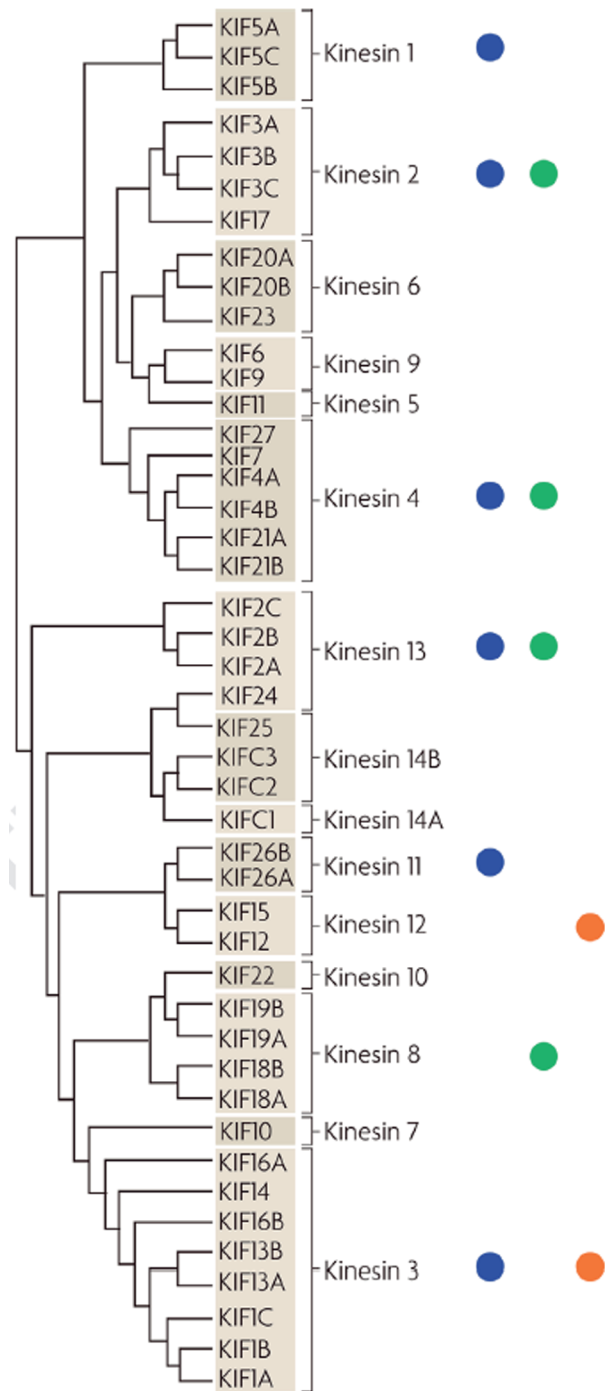
B.



La kinesina 1 y el rol de las kinesinas en cilia

KLC1 es una cadena liviana de la kinesina 1 (la primera descubierta y más abundante de la familia de las kinesinas), un motor molecular que mueve cargas hacia el extremo positivo de los microtúbulos (154). Está compuesta por dos pares de cadenas pesadas (KHCs) que utilizan la hidrólisis de ATP para moverse sobre los microtúbulos, y por dos pares de cadenas livianas (KLCs) que regulan la actividad de las KHC y median su unión a las diferentes proteínas o complejos que son transportados. En vertebrados, ambas subunidades son codificadas por 3 genes diferentes. KLC1, la más estudiada de las cadenas livianas, se expresa de forma ubicua pero se encuentra enriquecida en neuronas y se une por su extremo N-terminal a las KHC y a los cargos a través de su dominio C-terminal (155). Hay muchas variantes de *splicing* de *KLC1*, que presentan su variabilidad en el extremo C-terminal y que le darían a la kinesina su especificidad de carga (156). A su vez, resulta interesante que cadenas livianas de la kinesina 1, incluyendo KLC1, interactúan a través de su dominio HR (Heptad Repeats, región N-terminal con la que se une a las KHC) con los “rootlet filaments” que juegan un rol en el transporte intracelular brindando un soporte para el transporte de proteínas ciliares (157,158). La interacción de KLC con los “rootlet filaments” recluta al sitio las cadenas pesadas de la kinesina 1 pero no microtúbulos y deja libre su dominio TRP de unión a cargo. La kinesina 1 forma parte de una superfamilia de proteínas (KIFs) que está compuesta por 15 familias (159,160) (**Figura 8**).

Figura 8| Filogenia molecular de proteínas de la superfamilia de kinesinas de ratón (KIFs) clasificadas en 15 subfamilias. La función de cada subfamilia en neurociencia, función ciliar y enfermedades metabólicas se indican con un círculo de color según indica la referencia. Tomado de Hirokawa, 2015.



● Neurociencia ● Cilia ● Metabolismo

De manera interesante, se ha demostrado que diferentes motores moleculares cumplen un rol importante en la formación y el mantenimiento del largo de las cilias. Como ya dijimos, la kinesina 2 en mamíferos, y otras kinesinas en otros organismos, es un componente clave en el proceso de IFT anterógrado y por tanto participa activamente en la regulación del largo del organelo. Es interesante que además de la kinesina 2, otras kinesinas también han sido asociadas a la regulación de las cilias, y no particularmente por su rol en el transporte de cargos. Algunas familias de kinesinas participan en otros procesos asociados a los microtúbulos, por ejemplo afectando su dinámica de polimerización tanto dentro del compartimiento ciliar (axonema) como en el cuerpo basal. Por ejemplo, KIF24 y KIF2A, miembros de la familia de kinesinas 13, se localizan en el centrosoma/cuerpo basal y remodelan las cilias a través de la despolimerización de microtúbulos (161,162). A su vez, KIF2A es activada por la proteína reguladora del ciclo celular Polo-like kinase 1 (PLK1) y de esta forma promueve el desensamblado de las cilias en células en proliferación (162). Otras kinesinas se localizan dentro de la cilia promoviendo la depolimerización de microtúbulos del axonema y su depleción resulta en cilias anormalmente largas. Por ejemplo, KIF7 (miembro de la familia de kinesina 4) y KIF19A (miembro de la familia de kinesina 8) organizan compartimientos intra-ciliares y afectan la estabilidad del axonema y los niveles de tubulina a través de la despolimerización de microtúbulos (53,163). A su vez, y dependiendo del contexto y del organismo, se ha demostrado que miembros de la kinesina 13 regulan el largo de las cilias entrando al organelo y afectando los microtúbulos del axonema o controlando la despolimerización de los microtúbulos del citoplasma y de esta forma la disponibilidad de tubulina para el mantenimiento y formación de las cilias (93–96). Un mecanismo distinto es el que se propone para KIF13B, un miembro de la familia de la kinesina 3 que se localiza en el centrosoma y en la cilia en células de mamífero y cuya depleción resulta en cilias largas sin afectar la proporción de células ciliadas (168). KIF13B interactúa y promueve la endocitosis de LPR1 (169) quien regula la expresión del ligando de Wnt, WNT5A. WNT5A es un regulador negativo del largo de cilias cuya expresión se encuentra disminuída en células depletadas de KIF13B (170). Un trabajo muy reciente muestra que sobre-expresando WNT5A purificado se logra rescatar el largo de las cilias en células depletadas de KIF13B,

concluyendo que KIF13B regula negativamente el largo de las cilias, al menos en parte, a través de indirectamente promover la expresión de WNT5A, aunque no pueden descartarse otros mecanismos (168). A su vez, en este mismo trabajo se muestra que KIF13B es un regulador de la composición de la zona de transición donde interactúa con la proteína de la zona de transición Nephrocystin-4 (NPHP4). Esta interacción sería importante para el reclutamiento de KIF13B en la zona de transición y para el establecimiento de un microcompartimiento de membrana enriquecido en caveolin-1 (CAV1), esencial para la señalización por Shh (168). Dado el antecedente de estas otras kinesinas, pensamos que la interacción con la kinesina 1 podría ser relevante para entender el rol de CCDC28B en cilia.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue continuar con la caracterización funcional del modificador secundario de BBS, CCDC28B, para profundizar en el mecanismo por el cual esta proteína regula las cilias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la función de las MAPKs como mediadores de la acción de CCDC28B en cilia.
2. Caracterizar la interacción de CCDC28B-KLC1 para ganar información acerca del mecanismo por el cual CCDC28B podría regular la actividad de sus interactores.
3. Determinar si CCDC28B regula el largo de las cilias, por lo menos en parte, a través del BBSoma.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y protocolos de trabajo con bacterias

2.1.1 Medios de cultivo para bacterias

- **Luria and Bertani broth (LB)**

10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, H₂O ultrapura cantidad suficiente para 1 litro. Autoclavar.

- **LB Agar**

Agregar 1,5% de Agar al medio LB broth. Autoclavar.

- **S.O.C.**

20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa.

2.1.2 Preparación de antibióticos

- Ampicilina 1 g en 10 ml de H₂O
- Cloramfenicol 25 mg en 1 ml de etanol 100%
- Kanamicina 50 mg en 1 ml de H₂O

2.1.3 Transformación de bacterias

Se utilizó el método de choque térmico. Se agregaron de 1-10 ng de ADN a 40 µl de bacterias *E.coli* competentes de la cepa DH5α, se incubó la mezcla en hielo por 30 minutos y luego se realizó a un choque térmico en un baño a 42°C por 45 segundos para permitir el ingreso del ADN a las células. Las bacterias se incubaron en hielo por 2 minutos, se agregaron 900 µl de medio rico SOC y se incubaron por una hora a 37°C con agitación a 200 rpm para estabilizar las células y permitir que aquellas bacterias que incorporaron el plásmido expresen el gen que les confiere resistencia al antibiótico. Finalmente se plaqueó en LB agar conteniendo el antibiótico selectivo y se incubaron las placas a 37°C toda la noche.

2.1.4 Extracción de ADN plasmídico de cultivos bacterianos

El ADN plasmídico fue aislado de cultivos bacterianos utilizando el Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit o el HiPure Plasmid Midiprep kit (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. En estos protocolos se utilizan cultivos overnight de *E.coli* de 5 ml y 25 ml para miniprep y midiprep respectivamente. Las bacterias son sometidas a una lisis alcalina (con un buffer de lisis que contiene NaOH/SDS). El lisado es tratado con un buffer de precipitación (que precipita proteínas, ADN cromosómico y restos celulares) y pasado por una columna que contiene una membrana de sílica (miniprep) o una resina de intercambio aniónico (midiprep) que selectivamente unen ADN plasmídico. Los contaminantes son removidos usando buffers de lavado y por último el ADN es eluído en agua o buffer TE (Tris-EDTA).

2.2. Composición y preparación de soluciones generales utilizadas

- **Tris-borate 10X (TBE) (1L)**
108 g tris base, 55 g ácido bórico, 9,3 g EDTA, H₂O ultrapura hasta llegar a 1 litro.
- **Phosphatase Buffered Saline 1X (PBS)**
8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HP₄ y 0,24 g KH₂PO₄, H₂O ultrapura cantidad suficiente para 1 litro. Ajustar el pH a 7,4 con HCl. Autoclavar.
- **Tris-Glycine-SDS 10X (TGS)**
30,2 g Tris, 94 g Glicina, 5 g SDS, H₂O ultrapura cantidad suficiente para 1 litro.
- **Laemmli buffer 4X**
3 g Tris-HCl (pH 6,8), 40 ml glicerol, 5 g SDS, 5 mg azul de bromofenol, H₂O ultrapura cantidad suficiente para 100 ml. Agregar 10% β-mercaptoetanol antes de usar.
- **Buffer de transferencia**
1X TGS, 20% metanol o etanol

- **1-phenyl 2-thiourea (PTU)**

Para preparar 100 ml de una solución stock 0,3%, se disuelven 0,3 gr de PTU (Sigma-Aldrich #P7629) en 80 ml de H₂O ultrapura y luego se completa al volumen final. Se conserva alicuotado a -20°C. Se utiliza a una concentración de 0,003% disuelta en el agua de los peces desde las 24 horas post fecundación (hpf), con reemplazo diario de la solución.

2.3. Protocolos generales

2.3.1 Extracción de ARN de células de mamífero (cantidades utilizadas para placa de 35 mm)

La extracción de ARN se realizó utilizando Trizol (Total RNA Isolation Reagent de Invitrogen) siguiendo las instrucciones del comerciante. Este protocolo se basa en la solubilidad diferencial de los componentes celulares entre dos fases no miscibles. El Trizol está compuesto por una mezcla de fenol (donde los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidino (agente desnaturizante de proteínas e inhibidor de proteasas) a pH 4,5. Así la integridad del ARN se mantiene durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una etapa de centrifugación permite separar la fase acuosa que contiene el ARN de la fase orgánica (ADN y proteínas). El ARN se recupera mediante una precipitación con isopropanol. Brevemente, el protocolo consta de los siguientes pasos. Las células se incuban 5 min a temperatura ambiente en 1 ml de Trizol ya sea agregado directamente sobre la placa de células adherentes o sobre el pellet de células previamente tripsinizadas. Luego se agregan 200 µl cloroformo, se agita vigorosamente por 15 segundos e incuba unos minutos a temperatura ambiente previo a centrifugar a 12,000 g y 4°C por 15 min. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo agregándole 500 µl de isopropanol, se incuba a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifuga a 12000 g y 4°C por 10 minutos más. Posteriormente se descarta el sobrenadante y el pellet obtenido (conteniendo el ARN) es lavado con 1 ml de etanol 75 %. Se realiza una última centrifugación de 5 minutos a 7500 g y 4°C, luego de la cual se remueve completamente el sobrenadante dejando secar el pellet de ARN a temperatura ambiente. En nuestro caso, los pellets típicamente se resuspendieron en

30 µl H₂O libre de ARNasas y se cuantificó el ARN por espectrofotometría a 260 nm. Las muestras se conservaron a -80°C.

2.3.2 Preparación de ADN copia (ADNc)

El ARN extraído por el método del Trizol se utilizó para obtener ADNc utilizando el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En este protocolo se prepara la mezcla de ARN y cebadores utilizando hasta 5 µg de ARN, 1 µl de 10 Mm dNTP mix, 1 µl de oligo dT y agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato) para inhibir ARNasas, hasta llegar a un volumen de 10 µl. Cada muestra se incubaba a 65°C por 5 minutos y luego se deja 1 minuto en hielo. A continuación se le agregan 9 µl de un mix que contiene 10x RT buffer, 25 Mm MgCl₂, DTT y un inhibidor de ARNasas (RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor) y se incubaba a 42°C por 2 minutos. Luego se agrega la transcriptasa reversa (SuperScript™ II RT) y se incubaba a 42°C por 50 minutos. Se termina la reacción incubando a 70°C por 15 minutos y se deja enfriar en hielo. Por último se centrifuga, se agrega ARNasa H para degradar el ARN molde y se incubaba a 37°C por 20 minutos.

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µl conteniendo ADN molde, 2,5 µl de Buffer 10x (Tris-HCl pH 8,7, KCl, (NH₄)SO₄, y MgCl₂), 0,5 µl de una mezcla de dNTPs a una concentración final de 0,2 mM, 1 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, 0,25 U de Dream Taq polimerasa y H₂O para completar los 25 µl. El programa de amplificación estándar que se utilizó constó de una incubación a 95°C durante 5 min para pre-desnaturalizar el ADN molde, seguido de un ciclado de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, entre 54°C-57°C (dependiendo de los cebadores utilizados) durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un tiempo dependiente del largo del amplicón (aproximadamente 1 min por Kb) de extensión. El número de ciclos utilizado varió según el experimento utilizando 35 para PCR convencional y entre 18-22 ciclos para PCR semi-cuantitativo. La reacción de PCR se terminó con una extensión a 72°C durante 10 minutos y el posterior enfriamiento de las muestras a 4°C.

2.3.4 Purificación de productos de PCR

Para purificar los productos de PCR se utilizó el kit PureLink PCR Purification (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está diseñado para remover cebadores, dNTPs, enzimas, y sales usando un sistema de columna. La membrana de sílica que se encuentra pegada al fondo de la columna adhiere ADN doble hebra y las impurezas son removidas usando un buffer de lavado. El ADN luego es eluído en un buffer de elusión o agua.

2.3.5 Electroforesis en geles de Agarosa

Para la resolución electroforética de ácidos nucleicos se utilizaron geles de Agarosa al 1 % que se hicieron disolviendo la cantidad necesaria de Agarosa en 1x TBE (Tris-EDTA). Se agregaron 4 µl de Bromuro de Etidio por cada 100 ml de gel (a una concentración final de 400 ng/ml). Se mezcló la cantidad deseada de muestra con buffer de carga 10x y se sembraron en el gel junto a un marcador de peso molecular apropiado para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. Se corrieron los geles en 1x TBE a 100 V por el tiempo necesario para alcanzar la separación deseada.

2.3.6 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el PureLink Quick gel extraction kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones provistas. Brevemente, el protocolo consta de los siguientes pasos: se escinde el fragmento de gel conteniendo el ADN y se disuelve usando un buffer de solubilización; el gel disuelto se vuelca en una columna y se centrifuga para unir el ADN a una membrana de sílica que luego se lava con un buffer conteniendo etanol para remover impurezas. El ADN purificado luego es eluído usando un buffer de elusión o agua.

2.3.7 Clonado en vectores de expresión

El clonado en los vectores de expresión se realizó amplificando los marcos abiertos de lectura (ORFs) de los distintos genes a partir de ADNc y por medio de una PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA polimerasa, Stratagene) junto con cebadores que fueron diseñados para incluir la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción que posteriormente fueron utilizadas para generar extremos cohesivos en plásmido destino e inserto. Los productos de PCR se visualizaron en geles de Agarosa y luego se purificaron utilizando el kit PureLink Quick gel extraction kit (Invitrogen). Los productos de PCR y los vectores de destino fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas y luego purificados utilizando el kit PureLink PCR Purification (Invitrogen). Posteriormente se realizó la ligación del vector y el inserto con la enzima T4 DNA ligasa. Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosfato y uno 3'OH en una molécula de ADN de doble cadena (tanto si los extremos son romos como cohesivos). Las reacciones de ligación se incubaron a 4°C durante toda la noche. Las ligaciones fueron transformadas en bacterias *E.coli* competentes (como se detalla más adelante) y se plaqueó en LB agar con antibiótico selectivo. Las colonias fueron crecidas en medio LB líquido para posteriormente aislar el plásmido por medio del PureLink Quick plasmid Miniprep Kit y determinar la presencia del inserto y su integridad por digestión y secuenciación.

Los vectores de expresión utilizados fueron los siguientes:

PLÁSMIDO	USO
pCMV-Myc	Sobre-expresión de genes de interés fusionados al tag Myc en extremo n-terminal. Promotor CMV.
pCMV-HA	Sobre-expresión de genes de interés fusionados al tag HA en extremo n-terminal. Promotor CMV.
pCS2+	Sobre-expresión de genes de interés. Promotor CMV

2.3.8 Introducción de ADN plasmídico en células de mamífero para la sobre-expresión de genes

Realizamos transfección transitoria de plásmidos en células de mamífero utilizando FUGENE® HD (Promega). Este reactivo es una mezcla patentada de lípidos y otros componentes que facilitan la entrada del ADN al espacio intracelular. Para realizar la transfección se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante.

2.3.9 Disminución de la expresión de genes en células de mamífero

Para reducir la expresión de genes se utilizó el sistema de oligos Stealth de ARN de Invitrogen (Stealths RNAi™ siRNA). El sistema se basa en transfectar células con ARN de interferencia pequeños, de aproximadamente 25 nucleótidos, que han sido modificados químicamente para presentar mayor especificidad, aumentar su estabilidad en las condiciones de cultivo y disminuir su toxicidad celular en comparación a los ARN de interferencia convencionales. Los oligos de ARN que se utilizaron fueron sintetizados y adquiridos en Invitrogen y fueron diseñados para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm de distintos genes de interés como se menciona en los resultados. Para introducirlos en las células se realizó la transfección con Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Se utilizaron los siguientes Stealths:

GEN BLANCO (humanos)	SECUENCIA (proporcionada en sentido 5'-3' y complementaria al ARNm del gen blanco)
CCDC28B	UCAGUAAUUCUAUCCAGAAGCUGCA
KLC1	CCUACUGAAUGAUGCCUUGGCUAUU
KIF5A	CCUUCUGGAUGUGACCAAGACAAAU
KIF5B	GAGCAAGUGUAUAAUGACUGUGCAA

KIF5C	CCAACUUGGCUGUUCAUGAAGAUAA
KIF7	ACAUGUGGAUAAACCAGGAACUGAA
MAPKAP1 (SIN1)	ACUGAAGCCAAACUUAUGAAUGGGC

En cada experimento se utilizaron los oligos de ARN control correspondientes de acuerdo al porcentaje GC del ARNi para el gen blanco (Invitrogen, Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Low GC número de cat. 12935200; Hi GC número de cat. 12935400).

2.3.10 Extracción de proteínas de cultivos celulares

Para extraer las proteínas de un cultivo celular crecido sobre placa primero se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X. Luego se colocó la placa sobre hielo y se le agregó Buffer de lisis (150 Mm NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40) en un volumen de 1 ml por placa de 100 mm, incubando por 15 minutos. Las células se desprendieron utilizando un rastrillo y se transfirieron a tubos. Los tubos se incubaron en hielo durante 15 minutos vortexeando cada dos y finalmente se centrifugaron a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (lisado de proteínas) se transfirió a un nuevo tubo y se conservó a -20°C hasta ser utilizado.

2.3.11 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de cuantificación con BCA (Ácido Bicinconínico) que se basa en la formación de un complejo entre proteínas y Cu^{2+} que en condiciones alcalinas reduce el Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ obtenido, forma un complejo con BCA de color azul-púrpura, estimable mediante espectrofotometría, de modo que la cantidad de complejo coloreado será proporcional a la cantidad de Cu^{2+} reducido, y por lo tanto, a la cantidad de proteína presente en el medio. Utilizando el QuantiPro BCA Kit (Sigma-Aldrich) se añadieron 200 μl del colorante (BCA y solución de sulfato de cobre) a 10 μl de cada muestra (estándar de concentración conocida, blanco y la muestra a cuantificar en distintas diluciones), se

incubaron durante 30 minutos a 37°C y se procedió a la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. En cada cuantificación se generó una curva de calibración (concentración en función de la absorbancia a 570 nm) con los datos de la muestra estándar (utilizamos Sero-Albúmina Bovina de concentración conocida), a partir de la cual se calculó la concentración de las muestras problema.

2.3.12 SDS-PAGE

Las proteínas fueron separadas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por su acrónimo en inglés). Previo a la corrida electroforética las muestras se desnaturalizaron (hirviendo la muestra en Laemmli Buffer por 5 minutos), y se centrifugaron brevemente. En cada experimento se cargó la cantidad deseada de muestra en el gel. Dependiendo del tamaño de las proteínas evaluadas en cada caso se utilizaron geles con entre 10 % y 15 % de acrilamida. En cada gel se sembró un marcador de peso molecular preteñido de peso molecular apropiado. Las electroforesis se realizaron a 30 mA por gel en buffer TGS 1x.

2.3.13 Transferencia de proteínas a membrana

Luego de la electroforesis, se equilibraron los geles en buffer de transferencia y se hidrataron las membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, Amersham-GE Healthcare) en metanol antes de montar el aparato de transferencia. El aparato de transferencia consiste en un casete que se ensambla con una esponja, papel absorbente, gel, membrana, papel absorbente y esponja, en este orden. Las transferencias de proteínas se realizaron aplicando un campo eléctrico a través del gel hacia la membrana de 400 mA en buffer de transferencia durante 2 horas a 4°C.

2.3.14 Western Blot

Para el análisis de proteínas por western blot se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con una solución de 5 % de leche en PBS-T (PBS con 0,2 % Tween 20). Se lavaron 3 veces con PBS-T sin leche (5 minutos cada uno con agitación). Luego se incubó el anticuerpo primario correspondiente diluído en PBS-T o PBS-

T con 5% de leche (dependiendo del anticuerpo utilizado) durante 1-4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (nuevamente dependiendo del anticuerpo) con agitación, se lavó 3 veces con PBS-T (10 minutos cada uno con agitación) y a continuación se incubó con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a peróxidasa de rábano por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con PBS-T se procedió a la detección utilizando el sistema de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo scientific) y placas de rayos X. Este es un método no radiactivo basado en la emisión de luz que ocurre durante la oxidación del luminol por la peroxidasa que es capturada en una lámina de rayos X.

Los anticuerpos comerciales utilizados en esta tesis fueron los siguientes:

Monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich #H6908).

Monoclonal anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439)

Monoclonal Anti- α -Tubulina (Sigma-Aldrich #6074)

Monoclonal Anti-GAPDH (Sigma-Aldrich #G8795)

Policlonal Anti-Histone H3 (Cell Signaling #2650)

Monoclonal anti p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling #4695)

Monoclonal anti phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling #4370)

Monoclonal anti p38 MAPK (Cell Signaling #8690)

Monoclonal anti Phospho-p38 MAPK (Cell Signaling #4511)

Anti-Mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich #A9044)

Anti-Rabbit IgG HRP (Sigma-Aldrich #A0545)

Policlonal anti-CCDC28B fabricado por Genzyme usando un péptido contra la proteína humana.

VHH CCDC28B

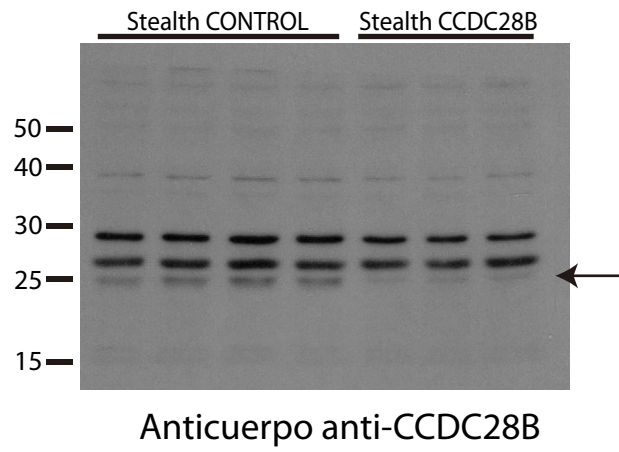
Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos poseen anticuerpos carentes de cadena liviana en los que un único dominio forma el sitio de unión al antígeno. Este dominio, denominado Nanobody o VHH, es uno de los fragmentos de reconocimiento de antígeno más pequeños conocidos en la naturaleza (~15 kDa) y se caracterizan por su alta estabilidad, solubilidad y especificidad. Estas características únicas de los VHHs junto a su facilidad de manipulación mediante biología molecular los convierte en una muy buena

alternativa a los anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpo para numerosas aplicaciones biotecnológicas (171).

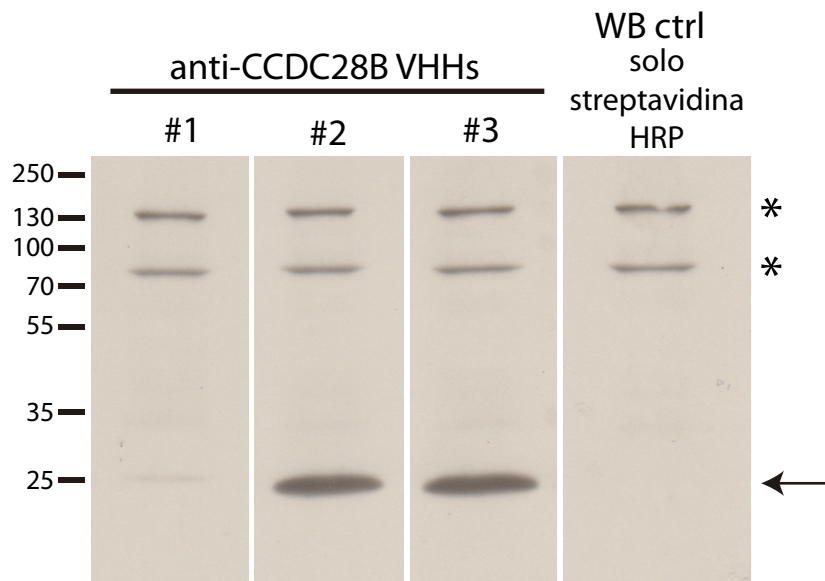
Los VHH contra nuestra proteína de interés CCDC28B fueron generados por el grupo de Gualberto González-Sapienza, Instituto de Higiene, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. La estrategia para la generación del VHH de CCDC28B fue la siguiente. Se inmunizó una llama con CCDC28B producida en forma recombinante (Matías Fabregat) y luego de varias dosis se purificaron las células mononucleares a partir de sangre periférica en donde se encuentran los linfocitos B. A partir de éstas se generó el ADN copia total y se amplificaron los genes de la región variable de las cadenas pesadas del repertorio completo de anticuerpos del animal. Los genes amplificados se clonaron en un vector que permitió su expresión fusionada a una proteína de la cápside del bacteriófago M13 (display) generando así una biblioteca de nanobodies en fagos filamentosos. A partir de esta biblioteca se seleccionaron los VHH para CCDC28B mediante su interacción con el antígeno inmovilizado (panning) y luego se confirmó su reactividad por ELISA y western blot. Para facilitar la inmunodetección e inmunoprecipitación de CCDC28B, se produjo una biotinización *in vivo* de los VHH durante su producción como se describe en (172) (**Figura 9B**).

Figura 9| Anticuerpos de CCDC28B. **A.** Nuestro anticuerpo policlonal de conejo para CCDC28B (producido por Genzyme) reconoce CCDC28B (lo sabemos porque desaparece en la transfección con el stealth de CCDC28B) y también otras bandas no específicas. **B.** Evaluación por western blot de diferentes anticuerpos de dominio único de llama (VHH) para CCDC28B. Los clones #2 y #3 reconocen una banda en lisados de HEK293 donde CCDC28B está sobre-expresado. Streptavidina-HRP solo se usó como control y se detectaron dos bandas inespecíficas de alto peso molecular (*).

A.



B.



2.3.15 Co-inmunoprecipitaciones

Se transfectaron células HEK293 en placas de 10 cm y se privaron de suero fetal bovino por 48 horas luego de la transfección para obtener lisados celulares utilizando buffer CoIP (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma) y 100 mM de Na₃VO₄. Los lisados fueron centrifugados a 1700 g por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron incubados con el anticuerpo apropiado inmovilizado en esferas de sefarosa con proteína A/G (Invitrogen) o con el VHH-biotinilado contra CCDC28B inmovilizado a una resina de Streptavidina-Agarosa (Pierce) durante toda la noche a 4°C y con rotación. Luego de extensivos lavados, se agregó buffer Laemmli's y se hirvieron las muestras para recuperar los inmunoprecipitados previo a su utilización en SDS-PAGE/Western blot.

2.3.16 Fraccionamiento subcelular

Las fracciones nucleares y citoplasmáticas de células hTERT-RPE se prepararon incubando las células en un buffer hipotónico (100 mM Hepes pH 7,9, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA) antes de homogenizarlas mecánicamente y adicionarles buffer T (3% Triton X-100 and 10 mM Hepes pH 7,9). Los núcleos intactos fueron separados de la fracción citoplasmática centrifugando a 800 g por 5 minutos. Se usó buffer RIPA (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Na-deoxycholate and 1% NP-40) para solubilizar las proteínas de la fracción nucleoplásmica.

2.3.17 Inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias se realizaron en células hTERT-RPE sembradas en cubreobjetos de vidrio estériles. El protocolo general que se utilizó fue el siguiente: se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado de las células con PBS 1X previo al fijado con metanol a -20°C o PFA 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizaron dos lavados de 1 minuto cada uno y se permeabilizaron las células con Tritón X100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos con agitación suave. Se realizaron dos lavados con PBS y se bloqueó con 5,5% de suero fetal bovino en PBS durante una hora. Se lavaron las células y se incubaron con los

anticuerpos primarios diluidos en PBS por 1 o 2 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se incubó con los anticuerpos secundarios y el marcador nuclear por una hora protegidos de la luz. Finalmente las muestras se montaron en Prolong Antifade (Invitrogen).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

Monoclonal Anti- γ -Tubulina (Sigma-Aldrich # T6557)

Monoclonal Anti- α -Tubulina acetilada (Sigma-Aldrich #T7451)

Policlonal Anti-ARL13B (ABCAM #ab83879)

Monoclonal Anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439)

Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen #A21206)

Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen #A21202)

Tetramethylrhodamine Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen #T2769)

Tetramethylrhodamine Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen #T2762)

Para visualizar los núcleos se utilizó la molécula intercalante en el ADN:

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen #D1306)

Para visualizar la F-actina se utilizó: Faloidina Tetramethylrhodamine (Sigma #P1951).

2.3.18 Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas en un microscopio Zeiss LSM 800CyAn™ ADP (Beckman Coulter) y Leica TCS-SP5 usando un objetivo 63x aceite 1.4 NA.

2.3.19 Medida del largo de cilias

Para todos los experimentos en donde se analizó el largo de las cilias, las células fueron privadas de suero fetal bovino durante 48 horas previo a realizar la inmunofluorescencia. En la inmunofluorescencia se utilizó un anticuerpo anti-tubulina acetilada y un anti- γ tubulina para visualizar el axonema ciliar y el cuerpo basal respectivamente. Se realizó la adquisición de imágenes en el plano Z por microscopía confocal (Z-stack). Utilizando la herramienta proyección en Z de máxima intensidad de Fiji (173) se realizó la transformación del Z-stack en una sola imagen donde se efectuó la medida del largo de las cilias. Para esto

se utilizó la herramienta “freehand line” para trazar una línea sobre todo el largo de la cilia y luego con el plugin ROI manager se obtuvo la medida del largo de esta línea.

2.3.20 Análisis de intensidad de tubulina acetilada

Para evaluar los niveles de tubulina acetilada, se procesaron semiautomáticamente las imágenes de la proyección de todos los planos en Z (Z-stack) de cada cilia individual en el paquete de procesamiento de imagen FIJI y se analizaron los datos utilizando Python scripts. Para cada cilia, los puntos 3D proximales y distales fueron manualmente definidos usando el canal de la señal generada con el anticuerpo anti-ARL13B (rojo). Basados en estos dos puntos 3D se utilizó el Simple Neurite Tracer (SNT) plugin en FIJI (174), para construir una curva entre ellos usando los parámetros por defecto. Se encontró esta curva en el volumen usando dos búsquedas direccionales basadas en un costo definido por los puntos seleccionados y considerando la distribución de intensidad de las imágenes y una medida de “tubeness” en los puntos. La curva definida en el canal en rojo fue luego validada manualmente en el canal verde (correspondiente a la marcación con el anticuerpo anti-tubulina acetilada) donde eventualmente los puntos finales fueron ajustados y la curva actualizada. Las curvas 3D para cada cilia fueron proyectadas en 2D junto con la transformación del Z-stack en una imagen usando la herramienta proyección en X de máxima intensidad de FIJI. Las curvas 2D se dividieron en 10 segmentos de largo similar y de aproximadamente tres píxeles de ancho que definieron diez regiones de interés en cada cilia.

2.3.21 Microscopía electrónica

Para los experimentos de microscopía electrónica de barrido (SEM) se crecieron células en cubreobjetos de vidrio y se fijaron toda la noche en una mezcla de 4% paraformaldehído y 3,5% glutaraldehído en 0,1 M PBS pH= 7,2 a 4°C. Luego de eso, las células se lavaron en PBS, se deshidrataron mediante soluciones de etanol de concentración creciente y se secaron con CO₂ en un aparato de secado de punto crítico de vacío DPC-1 Denton. Las muestras secadas se fijaron a trozos de aluminio con cinta de carbono y se recubrieron por pulverización con oro en DeskII Denton Vacuum durante 120 segundos. Las muestras se analizaron en vacío

en un Jeol-5900 LV SEM operado a un voltaje de aceleración de 20 kV. Esto fue realizado en colaboración con Magela Rodao, Camila Davison y Gabriela Casanova de la Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

2.4. Cultivos celulares

2.4.1 Líneas celulares utilizadas y condiciones de cultivo

HEK293-FT (Human Embryonic Kidney 293). Línea celular originalmente derivada de células de riñón de embrión humano. Crecidas en DMEM con alta glucosa suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina/streptomycin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Geneticina G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Piruvato de Sodio (1 mM) y Aminoácidos no esenciales (0,1 mM).

hTERT-RPE. Línea celular derivada de células del epitelio pigmentado de retina humana que fueron inmortalizadas utilizando la telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT) crecidas en medio 1:1 DMEM alta glucosa y F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina/streptomycin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 0,01 mg/ml de Higromicina B.

Ambas líneas celulares fueron crecidas a 37°C y 5% CO₂. Para mantener y amplificar las líneas en cultivo se realizaron los pasajes primero haciendo un lavado de la monocapa de células con PBS seguido de una incubación con tripsina durante aproximadamente 5 minutos a 37°C (1 ml de tripsina por placa de 100 cm). La tripsina se inhibió agregando medio con SFB. En cada caso se realizaron luego las diluciones correspondientes para obtener la densidad de células deseada.

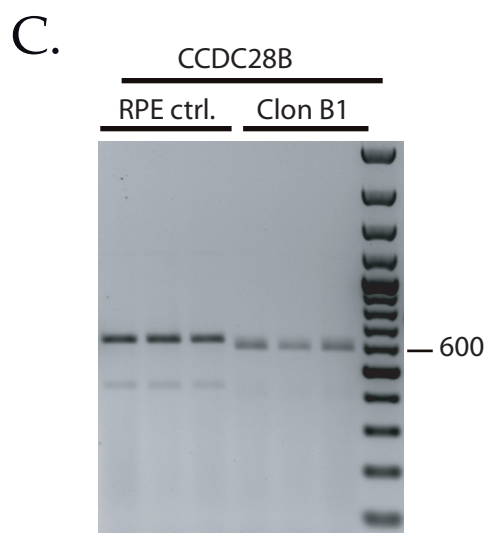
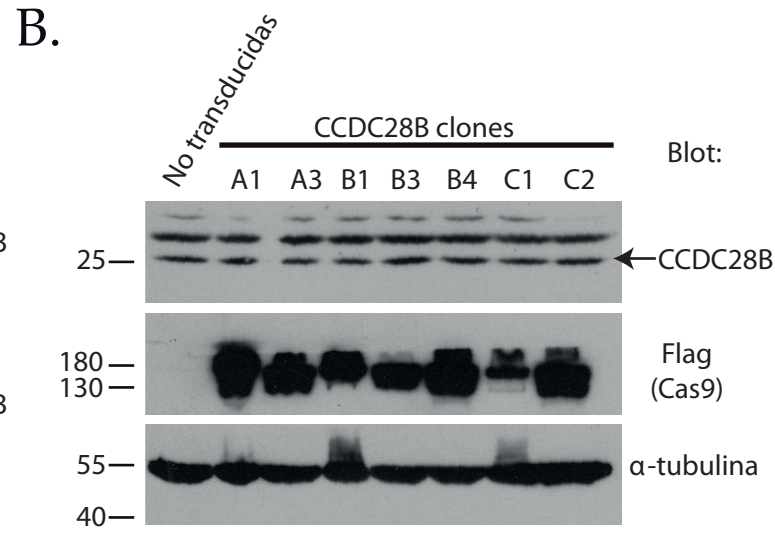
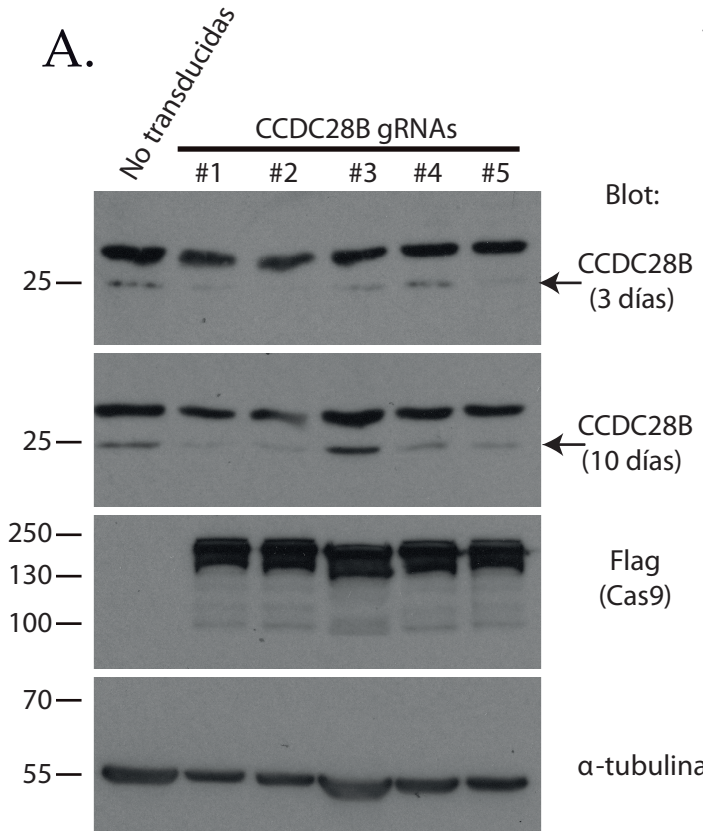
2.4.2 Congelado de células

Se realizó primero un lavado con PBS de la monocapa de células. Las células fueron luego tripsinizadas y resuspendidas en 10 ml de medio completo y transferidas a un tubo de 15 ml. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm, se aspiró el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en medio de congelación (1 ml medio completo con 5 % DMSO). Las células fueron transferidas a criotubos y conservadas en nitrógeno líquido.

2.5. Generación de línea celular CRISPR/Cas9 CCDC28B

Se generaron 5 vectores lentivirales codificando diferentes ARN guías (ARNg) dirigidos a distintas zonas del exón 2 (primer exón codificante) o al exón 3 de *CCDC28B*. El vector utilizado (pLentiCRISPRv2; Addgene plasmid # 52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID: Addgene_52961) permite empaquetar la construcción en partículas lentivirales y también expresa la nucleasa Cas9. Para obtener lentivirus co-transfectamos células Hek293 crecidas en placas de 10 cm con la construcción pLentiCRISPRv2 y los vectores de empaquetamiento pCMV-VSV-G (Addgene #8454) y psPAX2 (Addgene #12260). El sobrenadante conteniendo el virus fue recolectado 48 horas luego de la transfección, centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, filtrado utilizando un filtro de 45 μm y almacenado a -80°C hasta su uso. Estos lentivirus fueron transducidos en células hTERT-RPE cuando éstas se encontraban a un 60% de confluencia en placas de 6 pocillos utilizando el sobrenadante conteniendo el virus diluido a la mitad con medio fresco en presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de Polybrene (Sigma). Se seleccionaron las células transducidas con puromicina (10 $\mu\text{g/ml}$) y se evaluaron los niveles de *CCDC28B* a los 3 y 10 días luego de la transducción. Aunque se observó una bajada en los niveles de *CCDC28B* a día 10 para la mayoría de los ARN guías, en algunos casos pareció haber algo de recuperación de *CCDC28B* cuando se los compara con la bajada a día 3 (**Figura 10A**, ver por ejemplo ARN guía #3). Decidimos entonces establecer clones de CRISPR *CCDC28B* (usando el ARN guía #1, exón 2) por separación de células y deposición de células individuales en placas de 96 pocillos. En un gran número de pocillos las células dejaron de dividirse luego de unos pocos pasajes y por lo tanto no se pudo establecer con ellos una línea estable. Se logró extraer ADN de uno de estos clones y luego de secuenciado pudimos determinar que portaba dos mutaciones que ocasionaban cambios en el marco abierto de lectura debido a la inserción de 2 y 1 base respectivamente. En ambos alelos estos cambios causaban la introducción de codones de terminación prematuros por lo que se trataba de un knockout completo. En los casos en los que los clones sí crecieron, evaluamos los niveles de *CCDC28B* por western blot y en todos los casos pudimos detectar la proteína (**Figura 10B**).

Figura 10 | Generación por CRISPR/CAS9 de una línea hTERT-RPE knockout para CCDC28B. **A.** Análisis por western blot de células hTERT-RPE transducidas con pLentiCRISPRv2 dirigido a CCDC28B. 5 ARNg diferentes fueron testeados. En la mayoría de los casos, se observa la bajada en los niveles de CCDC28B a los 10 días luego de la transducción pero en algunos casos los niveles de la proteína empiezan a recuperarse comparado con el día 3. La expresión de la CAS fusionada al tag Flag se observa con un anticuerpo anti Flag. Tubulina fue utilizado como control de carga para el blot del día 10. **B.** Los clones obtenidos después de la clasificación y deposición de células individuales en placa de 96 pocillos fueron analizados por western blot con anticuerpos anti-CCDC28B, anti-Flag y anti-tubulina. En todos los casos, CCDC28B se siguió detectando. Las membranas fueron cortadas en 3 como se indica para su incubación con los distintos anticuerpos. **C.** RT-PCR semicuantitativa mostrando la amplificación del marco abierto de lectura de CCDC28B de células hTERT-RPE control y de células del clon B1.

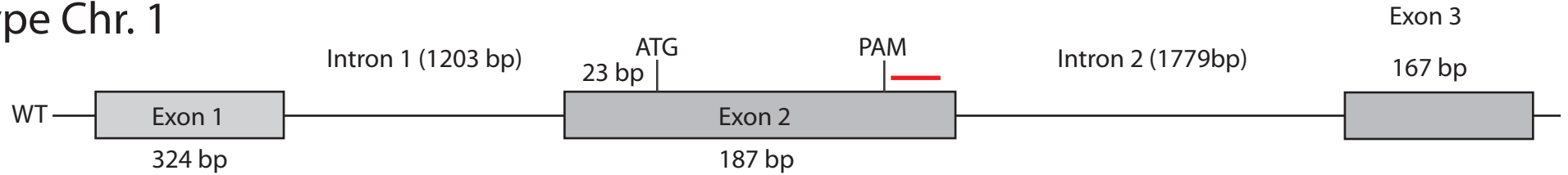


Estos resultados en conjunto nos sugirieron que la ausencia completa de *CCDC28B* podría inhibir la proliferación celular, al menos en células hTERT-RPE. A pesar de detectar la proteína, los clones que fueron analizados presentaron una reducción marcada en el largo de las cilias y en la proporción de células con cilia. Por lo tanto continuamos con la caracterización de las líneas y determinamos la mutación genética en algunos de estos clones. Tres de ellos presentaban un alelo con una inserción de 1 o 2 pares de bases que llevaban a un cambio en el marco abierto de lectura y la introducción de un codón de terminación prematuro. En los tres casos el segundo alelo podía codificar para *CCDC28B* aunque con pérdida o ganancia de algunos residuos.

El Clon B1 resultó particularmente interesante dado que presenta una inserción de 2 pares de bases en uno de los alelos y una deleción de 220 pares de bases en el segundo alelo eliminando los últimos 93 nucleótidos del exón 2 (31 residuos, del 25 al 55) y las primeras 127 bases del intrón 2 (c.72_164 + 127Del; **Figura 11**). A pesar de este genotipo, por western blot detectamos *CCDC28B* con un peso molecular similar al de la proteína salvaje y con niveles de expresión comparables al de los controles (**Figura 10B**), en lugar de un 50% de expresión de *CCDC28B* de menor peso molecular como hubiera sido lo esperable. Analizamos *CCDC28B* a nivel de ARNm, por secuenciación y RT-PCR semi cuantitativa a partir de ADN copia. Determinamos que la deleción de 220 pares de base desencadena la utilización de un sitio de splicing alternativo críptico que resulta en la retención de 60 pares de bases de intrón 2 a continuación del remanente de exón 2. Este ARNm alternativo se predice que codifique para una proteína que si bien pierde 31 residuos originales de la proteína, incorpora 20 residuos nuevos, codificados por la secuencia intrónica retenida, antes de continuar en marco con el exón 3 (**Figura 11**).

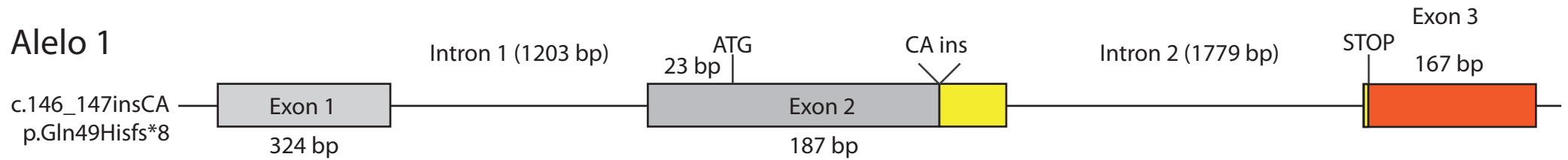
Figura 11 | Representación parcial de la región genómica de CCDC28B. Se muestran los exones 1 al 3 (de un total de 6) y se indica con una línea roja la posición del ARN guía #1. Representación esquemática de dos alelos de CCDC28B en hTERT-RPE CRISPR CCDC28B Clon B1. Un alelo lleva una inserción de dos bases (CA) que produce un cambio en el marco abierto de lectura y la incorporación de un codón de terminación prematuro (“STOP”). El segundo alelo presenta una delección de 220 pb que elimina las últimas 93 bases del exón 2 y las primeras 127 bases del intrón 2. La secuenciación del ADNc muestra que 60 bases del intrón 2 remanente (amarillo) se incorporan en el exón 2 haciendo entonces que codifique 20 residuos nuevos que están en marco con la proteína wt codificada desde el exón 3 en adelante.

Wild type Chr. 1

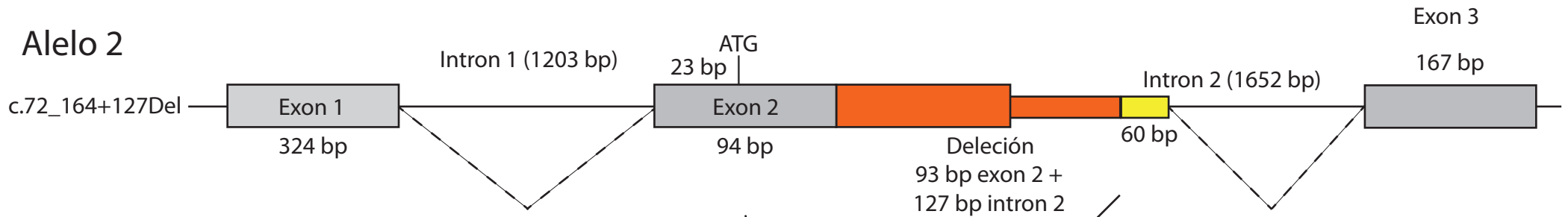


Clon B1 Chr. 1

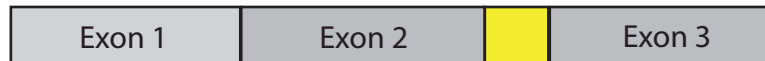
Alelo 1



Alelo 2



Splicing Alternativo



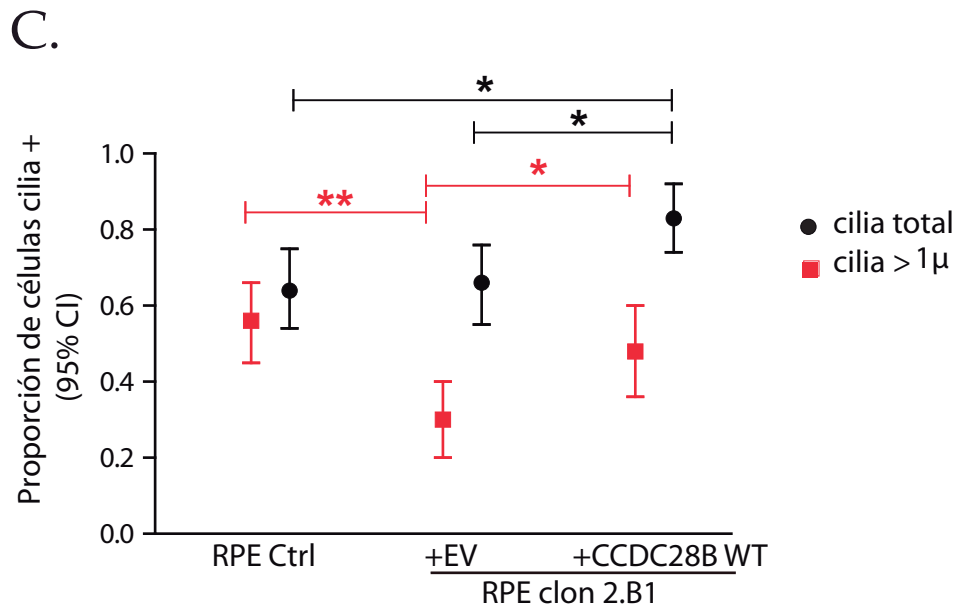
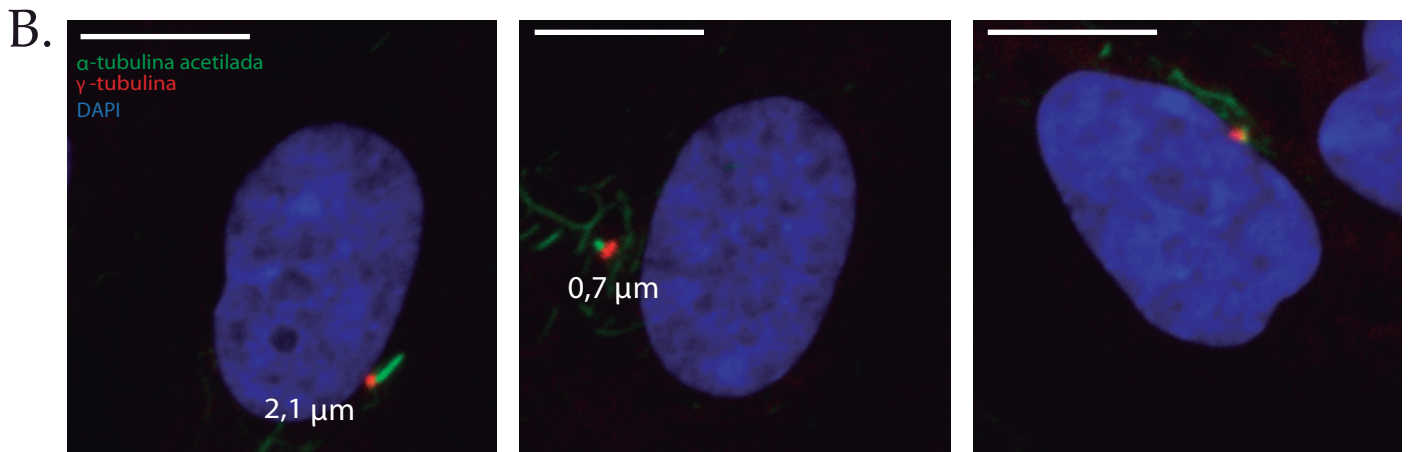
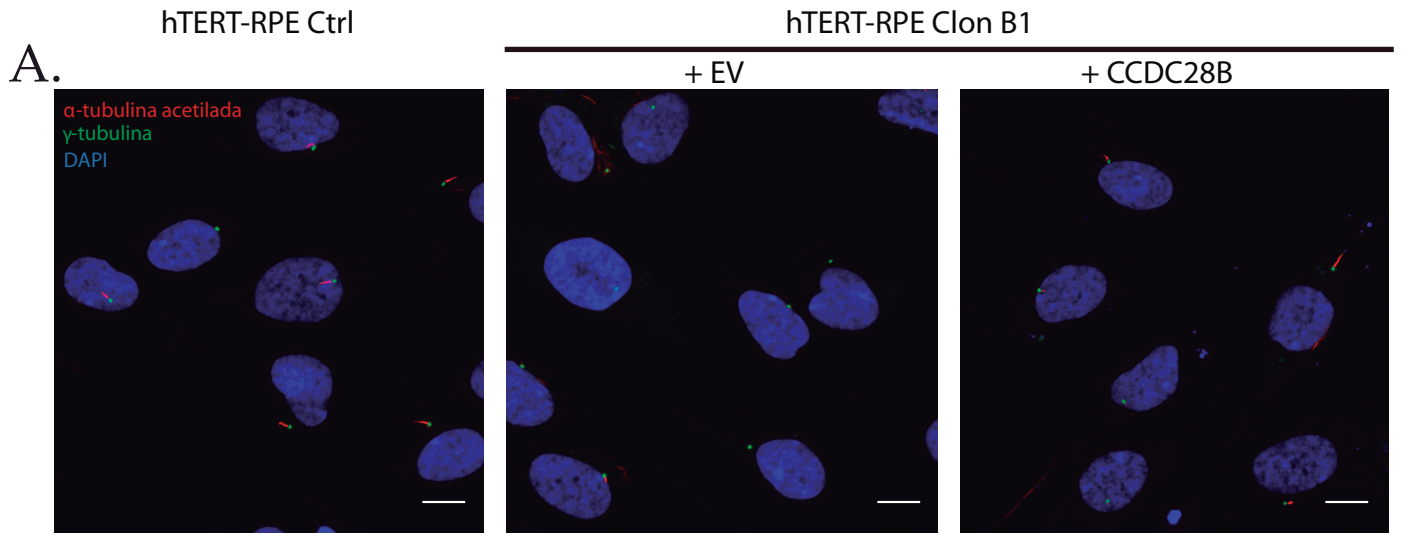
Por RT-PCR semi-cuantitativa detectamos únicamente el ARNm de *CCDC28B* que tiene el splicing aberrante y a menores niveles que el ARNm salvaje de células controles (**Figura 10C**). No detectamos el ARNm que tiene la mutación con el cambio del marco abierto de lectura que lleva a la incorporación de un codón stop prematuro en el exón 3 (**Figura 11**). Estos resultados están de acuerdo con datos reportados previamente donde se muestra que un alelo que lleva una mutación que introduce un codón stop prematuro en el exón 3 es eliminado por el mecanismo de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras, más conocido por sus siglas en inglés NMD (de *Nonsense Mediated Decay*) (97). Los resultados de estos datos de RT-PCR sugieren la posibilidad de que exista un mecanismo de compensación a nivel post-transcripcional para mantener los niveles de *CCDC28B* en el Clon B1 que requerirán de mayor evaluación. Una posibilidad es que se estén aumentando las tasas de traducción o modulando el recambio de la proteína.

Es interesante notar que no fuimos capaces de aislar ningún clon que fuera un knockout completo de *CCDC28B*, lo que puede estar sugiriendo que al menos niveles mínimos de *CCDC28B* son necesarios para que las células hTERT-RPE proliferen. Seleccionamos el Clon B1 para continuar trabajando debido a que posiblemente era el clon con mayor compromiso de la función de *CCDC28B* dado que solo expresa una proteína mutada a la que le faltan 31 aminoácidos de la secuencia salvaje. El Clon B1 presenta ciliación reducida y las cilias que presenta son extremadamente cortas, al punto que dificulta medir su largo (**Figura 12A**). Para intentar distinguir cual de estos era el principal defecto del Clon B1 (capacidad de ciliar o largo de cilias) realizamos un análisis más detallado cuantificando células con cilias de 1 μm o más de largo y contabilizando el número total de cilias (tomando todas las células con una marca visible de tubulina acetilada, que marca axonema, irrespectivamente de su tamaño) (**Figura 12B**). Resultó interesante que, mientras la proporción total de cilias fue comparable entre el Clon B1 y las células control (**Figura 12C**, datos en negro), la proporción de cilias “largas” (mayores a 1 μm de largo) se vio significativamente reducida en el clon B1, un defecto que se pudo revertir re-introduciendo *CCDC28B* mediante transfección: la proporción de células cilia positivas (de 1 μm o más) en células hTERT-RPE control fue de 0,56, se redujo a 0,30 en el clon B1 y subió a 0,48 luego del rescate (**Figura 12C** datos en rojo). Estos resultados indican que la función principal de *CCDC28B* se estaría dando a nivel de la regulación del largo de cilias.

Sin embargo, la sobre-expresión de CCDC28B en el Clon B1 resultó en un incremento en la proporción total de cilias y por lo tanto no podemos descartar que los niveles de CCDC28B también impacten en ciliogénesis en alguna medida (**Figura 12C**).

Dado esto, para los análisis realizados en base a este clon celular decidimos basarnos solamente en la cuantificación de la proporción de células que presentaban cilia con un axonema claramente distinguible (llamamos a esto “proporción de células cilia positiva”).

Figura 12 | **A.** Células del Clon B1 fueron analizadas por inmunofluorescencia y microscopía confocal usando anti-tubulina acetilada (rojo), anti- γ tubulina (verde) y DAPI (azul) para marcar la cilia, el cuerpo basal y los núcleos respectivamente. Células hTERT-RPE fueron usadas como control y el Clon B1 transfectado con pCS2+ _CCDC28B wt se usó para mostrar el rescate y la especificidad del fenotipo ciliar. **B y C.** Las células del Clon B1 fueron analizadas para cuantificar el número total de células cilia positivas (marca de tubulina acetilada irrespectivamente de su largo) y células con cilias de al menos 1 μm de largo. La barra de escala representa 10 μm . La cuantificación muestra que mientras el número total de cilias es similar entre células hTERT-RPE control y el Clon B1, el último presenta significativamente menos cilias de al menos 1 μm de largo. Es importante que la proporción de células con cilias de 1 μm de largo fue rescatada luego de la transfección con CCDC28B wt. 80 células fueron analizadas para el control y el clon B1 y 70 células para el Clon sobre-expresando CCDC28B. Test estadístico utilizado: test de hipótesis de proporciones. Los datos son de un experimento representativo de tres experimentos independientes.



2.6 Pez cebra como organismo modelo

El pez cebra es un organismo modelo para el estudio de la biología de vertebrados en general, tanto para estudios del desarrollo como para análisis genéticos, fisiológicos e incluso el estudio de enfermedades humanas. Entre las ventajas que presenta como modelo se destaca su reproducción externa, que permite controlar los tiempos de la fecundación y estudiar las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. A su vez, los peces alcanzan su madurez sexual entre los 3-4 meses de edad y cada hembra desova alrededor de 200-300 huevos por puesta permitiendo el análisis de un número alto de embriones por experimento. Los huevos son transparentes y su desarrollo embrionario es rápido permitiendo visualizar y registrar en tiempo real el desarrollo donde la mayoría de estructuras se forman en las primeras 24 horas post fertilización (hpf) (175). Otra ventaja muy importante que presenta el pez cebra es que su genoma ha sido completamente secuenciado y se han desarrollado métodos muy efectivos, económicos y técnicamente fáciles para manipular la expresión génica. También se dispone de una gran biblioteca de referencia donde se incluye desde información de mutantes así como de fenotipos que es de libre acceso para toda la comunidad científica (<http://zfin.org>; http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/zmp).

Una de las técnicas más utilizadas para inhibir la expresión de genes en el pez cebra es la microinyección de morfolidos en el vitelo de embriones tempranos (estadio de 1 a 8 células). Los embriones inyectados son llamados morfantes y se analizan en las primeras horas de desarrollo y hasta los 5 días post-fertilización (5 dpf). Los morfolidos (MO) son oligómeros, análogos químicamente a los ácidos nucleicos, que presentan un anillo de morfolido en lugar de ribosa, y las bases están unidas entre sí por enlaces fosforodiamidato. Estas modificaciones hacen que estos oligos sean estables, ya que no son reconocidos por endonucleasas, pero sin embargo sí hibridan con alta afinidad a secuencias nucleotídicas complementarias de simple cadena (por ejemplo los ARNm correspondientes) y de esta forma interactúan con ellas. Existen dos tipos de morfolidos que se diferencian en su modo de acción. Los MO bloqueadores de la traducción se unen a secuencias complementarias dentro de la región 5' UTR del ARNm (incluyendo el ATG inicial) bloqueando de este modo el sitio donde se unen los ribosomas y el comienzo de la

traducción. Por otro lado también se pueden diseñar los MO para que se unan por complementariedad a las secuencias de unión exón-intrón o intrón-exón, alterando así el correcto procesamiento de los ARNm (MOspl por “MO splicing”) de manera que puedan resultar en cambios en el marco de lectura y la introducción de codones de terminación prematuros. En esta tesis se utilizaron de este último tipo de morfolinos.

2.6.1 Morfolinos utilizados

Los morfolinos fueron adquiridos en Gene Tools, LLC. Se prepararon soluciones stock a 20 ng/nl en agua estéril y se prepararon diluciones de trabajo para inyectar. Los morfolinos en solución fueron mantenidos a -20°C e incubados a 65°C durante 10 min previamente a ser utilizados.

MOstd: CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

MOspl *ccdc28b*: TTTAGAAGACGCACACAAACCTTGT

2.6.2 Edición genómica en pez cebra: CRISPR/Cas9

Se utilizó CRISPR/Cas9 para generar mutantes de *ccdc28b* de Pez cebra en su región codificante siguiendo los métodos descritos en (176). Se diseñaron 4 ARN guías (ARNg) usando la herramienta CRISPRscan. Los ARN se produjeron como se describe en (176). Brevemente, un molde de ADN conteniendo el promotor T7, la secuencia blanco de los ARNg y la región 3' invariable de los ARNg fueron generados por PCR. Este molde fue purificado y utilizado para transcripción *in vitro* usando Ambion MAXIscript SP6/T7 *In Vitro* Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Luego de un tratamiento con ADNasa, los ARNg fueron purificados a través de su precipitación con acetato de sodio y etanol. Todos los ARNg fueron testeados y dos de ellos con blanco en el exón 2 fueron elegidos para este estudio. El ARNm de Cas9 fue sintetizado *in vitro* usando mMACHINE mMACHINE Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) a partir del plásmido pT3TS-nCas9n (177) que codifica para una Cas9 con codones optimizados para pez cebra fusionada a una señal de localización nuclear. Zf-nCas9n ARNm fue purificado utilizando MicroSpin G-50 columns (GE Healthcare). Los embriones de pez cebra fueron inyectados en el citoplasma en el estadio de una célula con una combinación de 50 pg de cada ARNg

y 100 pg de zf-nCas9n ARNm. La morfología general de los embriones y el aspecto de las ciliadas en diferentes órganos fueron analizados a las 48 hpf.

2.6.3 Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra

La expresión de *ccdc28b* salvaje y del mutante *ccdc28b* Δ 4-10 en los embriones de pez cebra se realizó por medio de la inyección de los ARNm correspondientes en el vitelo de los embriones. El ORF tanto de *ccdc28b* como del mutante Δ 4-10 del pez cebra se encontraban ya clonados en el vector pCS2+ (trabajo realizado por la Dra. Magdalena Cárdenas). Utilizando el sistema *mMESSAGE mMACHINE kit* (Applied Biosystems #AM1340) se sintetizaron los ARNm *in vitro* utilizando a la ARN polimerasa SP6 y siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante. El ARNm fue conservado a -80°C y se inyectaron 400 pg de ARNm por embrión.

2.6.4 Extracción de proteínas de embriones de pez cebra

Para obtener lisados de proteínas totales de embriones de pez cebra se procesaron ~30 embriones de ≥ 24 hpf en batch. En primer lugar se les quitó el corion y se colocaron los embriones en un tubo *Eppendorf* con 500 μ l de agua. Se les extrajo el vitelo por medio de sucesivos pasajes por una pipeta Pasteur con la punta pulida por fuego, con un grosor mayor a la cabeza del embrión pero menor que el ancho del cuerpo + vitelo. Se realizaron tres lavados con H₂O ultrapura y centrifugación. Se extrajo toda el agua y los embriones se congelaron en N₂ líquido durante 5 min para luego conservarlos a -80°C hasta su utilización. Para la obtención del lisado y extracción de las proteínas se colocaron 50 μ l de buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40, Na₃VO₄ 1 mM, inhibidores de proteasas) sobre el *pellet* de los embriones y se homogeneizaron utilizando *micropestles* (Eppendorf). El lisado se centrifugó durante 30 min a 20000 g a 4°C. Se conservó el sobrenadante y posteriormente se determinó la concentración de proteínas por BCA y se realizaron ensayos de western blots como se detallaron para las muestras de células de mamíferos.

2.6.5 Inmunofluorescencia *in toto*

Se utilizaron embriones que fueron incubados con PTU 0,003% (1-phenyl 2-thiourea, Sigma-Aldrich #P7629) desde las 24 hpf para evitar el desarrollo de la pigmentación. Embriones de 12-48 hpf fueron fijados con PFA 4% durante toda la noche a 4°C, lavados con PBS-Triton (1%) durante 5 min y finalmente deshidratados por medio de dos lavados con 50% Metanol/50% PBS-Triton (1%) durante 5 min y con 100% Metanol durante 5 min. Luego se agregó nuev metanol 100% y se los mantuvo a -20°C durante toda la noche o hasta su uso. Para comenzar con la inmunomarcación los embriones fueron re-hidratados con 50% Methanol/50% PBS-Triton (1%) durante 5 min y luego con dos lavados de 5 min con PBS-Triton (1%). Los embriones de ≥ 24 hpf fueron incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de Proteínasa K (Sigma-Aldrich) durante 20 min (embriones 24 hpf) y por 30 min los embriones de ≥ 48 hpf o más. La reacción se detuvo por medio de una fijación con PFA 4% durante 20 min. Luego se lavaron dos veces con PBS-Triton (1%) durante 5 min y fueron bloqueados con 5% de suero fetal bovino (SFB) durante 1 hora. Se incubó con los anticuerpos primarios en PBS-T (1%) + 2% SFB, ON a 4°C. Al día siguiente se realizaron cuatro lavados con PBS-T (1%) de 10 min cada uno y luego se incubó con los anticuerpos secundarios apropiados y un marcador nuclear, diluídos en PBS-T (1%) + 2% SFB, ON a 4°C. Los embriones luego fueron lavados cuatro veces con PBS-T (1%) durante 10 min cada uno y montados en glicerol (Glicerol 75%, Tris 0,1 M pH 8) para su observación por microscopía confocal.

Para la visualización de las cilias y cuerpo basal se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Monoclonal Anti- γ -Tubulina (Sigma-Aldrich # T6557)

Monoclonal Anti- α -Tubulina acetilada (Sigma-Aldrich #T7451)

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG1 (γ 1) (Invitrogen #A21121)

Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse IgG2b (γ 2b) (Invitrogen #A21144)

Marcador nuclear: DAPI (Invitrogen #D1306)

2.7 Análisis estadísticos

La proporción de células cilia positivas fue calculada contando el número de cilias con una clara marca de tubulina acetilada sobre el número total de células y los resultados se

expresan como una proporción con un intervalo de confianza de 95% (IC). Las comparaciones entre las distintas muestras se realizó utilizando un test de hipótesis específico para comparar entre dos proporciones (test de hipótesis de proporciones). Para el análisis del largo de las cilias, primero analizamos si el conjunto de los datos presentaba distribución normal usando el test de Shapiro-Wilk y luego analizamos la homogeneidad de varianza utilizando el test de Levene. Cuando fue necesario, se realizó la transformación logarítmica de los datos para cumplir con los supuestos de distribución y homogeneidad requeridos para aplicar los test estadísticos. Para comparar tres o más grupos con distribución normal utilizamos ANOVA de una cola. En el caso de datos que no presentaban distribución normal usamos tests no paramétricos, el test de dos colas de Mann Whitney para comparar dos conjuntos de datos o Kruskal Wallison para comparar más de dos conjuntos. Para comparar la distribución de clases en los experimentos de pez cebra utilizamos el test de Chi-cuadrado (χ^2) cuando los datos fueron agrupados y el test de ranking de Wilcoxon y el test-t pareado para el análisis del porcentaje de embriones por clase clase y condición.

2.8 Análisis transcriptómico ARN sec

Este análisis fue realizado a través de una colaboración con el laboratorio del Dr. Santhosh Girirajan de Pennsylvania State University, Pennsylvania, Estados Unidos, a partir de muestras de ARNm obtenido de células hTERT-RPE y el Clon B1, con 5 réplicas de cada condición. Los datos fueron generados con un RNA-Seq pipeline estandarizado que consiste en Trimmomatic para eliminar lecturas de baja calidad, HISAT2 para alinear lecturas sin procesar con el transcriptoma humano, HTSeq-Count para cuantificar los niveles de expresión para cada variante y edgeR para identificar transcripciones con expresión diferencial que cumplieran el siguiente requisito estadístico: $\text{e}^{\log\text{FC}} > 1$ or < -1 and $\text{FDR} < 0.05$ (see the file `edgeR_diff_exp_filter.csv`). Se utilizó el programa PantherDB para encontrar vías enriquecidas realizando análisis ontológicos de los genes diferencialmente expresados.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA RELACIÓN FUNCIONAL CCDC28B-SIN1-CILIA

Como se detalló en la introducción, los datos de nuestro laboratorio indican que por lo menos parte del rol de CCDC28B en cilia se basa en su interacción con SIN1, quien estaría río abajo en el mecanismo (138). Sin embargo, no se sabe como SIN1 regula la cilia y tampoco cual sería el rol de CCDC28B en este contexto.

SIN1 fue originalmente descrita como un inhibidor de MAPKs (148,178) y esta vía de señalización ha sido vinculada al proceso de ciliogénesis y a la regulación del largo de las cilia aunque su rol no está claro, ya que algunos estudios reportan que la inhibición de esta vía determina la formación de cilia más largas mientras que otros sugieren un efecto contrario. Por ejemplo en *C. elegans*, la quinasa MAP DYF-5, regula el movimiento IFT anterógrado y la pérdida de la función de dyf-5 determina la formación de cilia más largas (66). Mientras que el trabajo de Abdul-Majeed y colaboradores, mostró que la inhibición de MAPKK determina la formación de cilia más cortas (179). Por lo tanto, si bien es claro que las alteraciones en la señalización por MAPKs pueden afectar la regulación del largo del organelo, el resultado final parecería depender de la quinasa específica que está siendo alterada y el contexto.

Por otro lado es interesante que CCDC28B, como previamente mencionamos, presente un dominio de unión a MAPK, ya que abre la posibilidad de que CCDC28B participe acercando o mediando la interacción de SIN1 con las quinasas MAP. Por lo tanto, en el trabajo presentado en este capítulo nos propusimos estudiar la posibilidad de que CCDC28B-SIN1 estén regulando las cilia a través de modular la señalización de MAPKs.

RESULTADOS

Determinación del estado de activación de diferentes MAPKs en mutantes de CCDC28B y SIN1.

Dado lo mencionado anteriormente decidimos evaluar el estado de activación de las tres principales salidas de señalización de la vía MAPK: JNK, p38 y ERK. Para esto realizamos ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos para detectar cantidad total y fosforilada (activada) de estas quinasas tanto en células hTERT-RPE depletadas de CCDC28B y SIN1 mediante la transfección de oligos de ARN

interferentes previamente validados en nuestro laboratorio (Stealths oligos, Invitrogen; (180); ver materiales y métodos), como en el Clon B1.

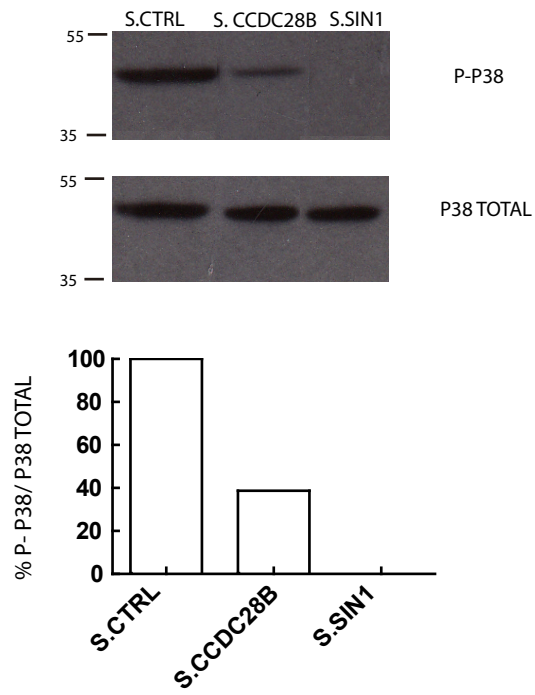
En el caso de JNK no pudimos realizar un análisis concluyente por falta de algunos reactivos. La principal dificultad en este análisis fue que solo contamos con un anticuerpo contra la proteína fosforilada por lo que no pudimos analizar niveles de JNK total. En este contexto, y dado que no obtuvimos señal de JNK fosforilada en ninguna de las condiciones analizadas, no pudimos concluir si en la línea celular hTERT-RPE la vía JNK no se encuentra activa, si es que se activa de manera transitoria, o si lo hace en niveles bajos (por debajo del límite de detección del western blot). Tampoco pudimos comprobar que el anticuerpo estuviera funcionando correctamente ya que no contamos con un control positivo de activación. Por lo tanto, se deberán hacer otros ensayos a futuro para poder determinar si existen diferencias en la activación de JNK en ausencia de proteínas como CCDC28B o SIN1.

La siguiente vía en la que nos centramos fue p38. La posibilidad de que la vía mediada por p38 pudiera estar afectada nos pareció particularmente interesante dada la literatura que vincula esta vía con ciliogénesis y la regulación del largo de las cilia. Por ejemplo, en un trabajo se muestra que bajo circunstancias de activación por estrés, p38 regula la organización de proteínas satélites del centrosoma que son necesarias para la ciliogénesis (181). A su vez, más recientemente, un estudio realizado en *C. elegans* mostró que la vía DLK-1/p38 actúa en el control del largo de las cilia a través de modular la endocitosis mediada por RAB-5 (153).

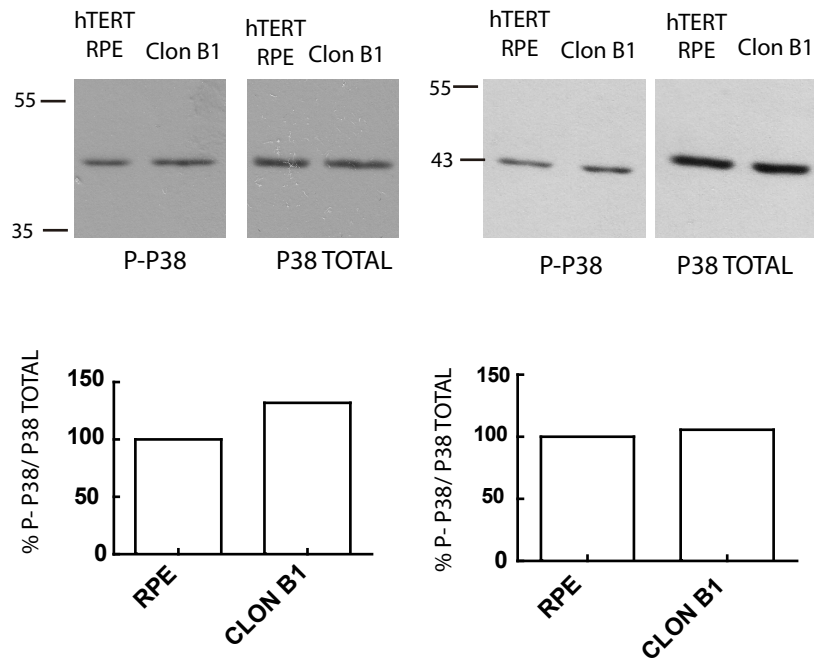
Comparamos entonces los niveles de activación de p38 entre células control (S.CTRL) y células depletadas tanto de CCDC28B como de SIN1 (S.CCDC28B y S.SIN1 respectivamente). En ambos casos, observamos una disminución en los niveles de p38 activa (p38 fosforilada: P-P38) (**Figura 13A**).

Figura 13 | Estado de activación de la vía p38 de las MAPK en mutantes de interés **A.** Western blot de p38 activo (fosforilado, P-P38) y total en células hTERT-RPE transfectadas con oligos de ARN (stealths) para CCDC28B (S.CCDC28B) y SIN1 (S.SIN1). En ambos casos observamos una disminución en los niveles de fosforilación de p38. **B.** Se muestra el western blot de dos experimentos distintos, donde en uno (izquierda) se observa un leve aumento en los niveles de p38 activo (P-P38) en el Clon B1 respecto a células hTERT-RPE control y en el otro (western blot a la derecha) no parece haber diferencias en los niveles de p38 fosforilado entre el Clon B1 y las RPE control.

A.



B.



Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que la falta de CCDC28B y SIN1 afectan la activación de p38 en el mismo sentido, una observación compatible con la posibilidad de que CCDC28B podría afectar las cilias a través de su interacción con SIN1 y la modulación de esta vía. Sin embargo, cuando repetimos estos ensayos en la línea celular hTERT-RPE CRISPR para CCDC28B (Clon B1) no observamos diferencias claras en la activación de p38. En algunos casos observamos niveles de p38 fosforilado ligeramente aumentados en esta línea celular respecto a la situación control (células hTERT-RPE) (**Figura 13B**, panel izquierdo), mientras que otras veces no encontramos diferencias (**Figura 13B**, panel derecho). Es decir que el efecto sobre la activación de p38 en el Clon B1 no solo no fue robusto sino que incluso parecía ser opuesto a lo observado cuando depletamos CCDC28B medianter ARNi.

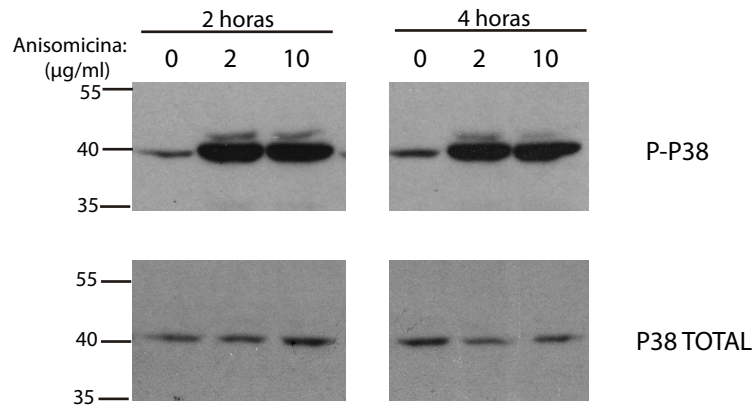
La falta de correspondencia entre fenotipos que se observan al depletar una proteína por el método de ARNi y CRISPR/CAS9 ha sido ampliamente observado y discutido en la literatura y se le han atribuido numerosas razones (182). Entre ellas, se ha observado un fenómeno de compensación genética particularmente cuando la lesión se da a nivel genómico como es el caso de CRISPR/CAS9. Por ejemplo un estudio hecho en pez cebra (*Danio rerio*) encontró que la discrepancia fenotípica que observaban entre morfantes (embriones inyectados con morfolin) y mutantes generados por CRISPR del gen *egfl7* se debía a cambios en la expresión de genes no blanco, que ocurría en mutantes del gen y no en embriones inyectados con morfolino (183). Un fenómeno de este tipo podría estar ocurriendo en el Clon B1, explicando por tanto la diferencia con el stealth de CCDC28B sobre la activación de p38. No obstante, el Clon B1 tiene un marcado defecto ciliar a pesar de no presentar cambios significativos en p38 sugiriendo por lo tanto que el fenotipo no estaría causado, al menos exclusivamente, por la modulación de esta vía.

De todas formas, en paralelo evaluamos si era posible rescatar el fenotipo de acortamiento de cilias, característico de la depleción de CCDC28B, con la droga Anisomicina, un activador específico de p38 (184). En primer lugar pusimos a punto la dosis y duración del tratamiento con Anisomicina en nuestras células basándonos en datos previos de la literatura (**Figura 14A**). Decidimos utilizar [2 µg/ml] de droga durante 4 horas, ya que en estas condiciones observamos un aumento de p38

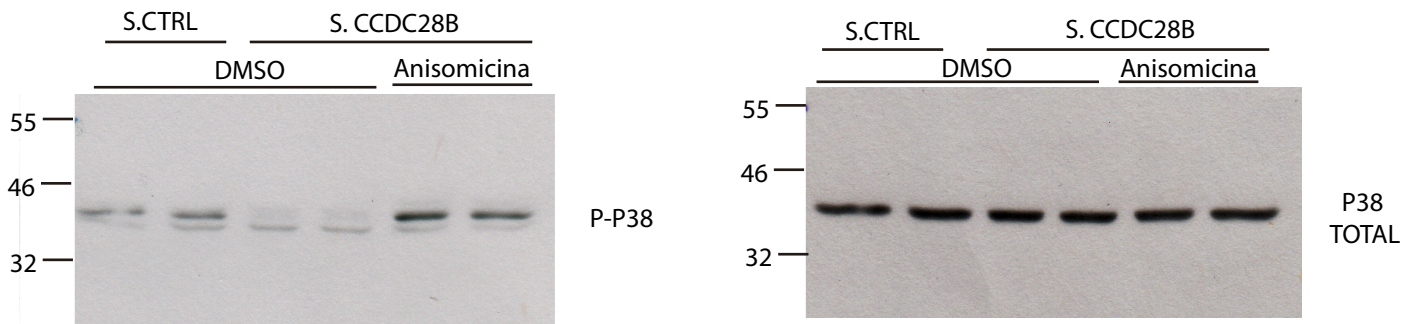
fosforilado en células hTERT-RPE transfectadas con nuestro stealth para CCDC28B (S.CCDC28B) (**Figura 14B** y cuantificación en C), y pensamos que era un período de tiempo que podía ser compatible con la visualización de cambios en el largo de cilias. Para evaluar el efecto sobre el largo de las cilias realizamos inmunofluorescencias con un anticuerpo contra tubulina acetilada para marcar la cilia y medimos su largo utilizando el programa FIJI como se detalla en materiales y métodos. Nuestros datos mostraron que con el tratamiento se pudo rescatar la activación de p38, inclusive alcanzando niveles más altos que en la situación control (**Figura 14B**). Sin embargo, recuperar los niveles de activación de p38 con Anisomicina no fue suficiente, al menos en el tiempo analizado, para rescatar el acortamiento ciliar que se produce con la depleción de CCDC28B (**Figura 14C**). Estos datos sugirieron que no existiría una relación causal clara entre cambios en la señalización de p38 y el acortamiento de cilias. Apoyando también esta idea, observamos entre diferentes experimentos una variabilidad importante tanto en el estado de activación de p38 en el Clon B1 como en la disminución de la activación de p38 observada con la depleción de CCDC28B y SIN1, quizás debido a que diferencias sutiles en el estado de las células (confluencia, número de pasaje) pueden estar teniendo un impacto importante en la actividad de esta vía.

Figura 14 | Restauración de los niveles de activación de p38 con Anisomicina y evaluación del efecto sobre el fenotipo ciliar en células hTERT-RPE transfectadas con stealth de CCDC28B. **A.** Evaluación por western blot de diferentes concentraciones de Anisomicina (2 y 4 $\mu\text{g/ml}$) y tiempos de tratamiento (2 y 4 horas) sobre la activación de p38. **B.** Western blot utilizando un anticuerpo contra p38 fosforilado (P-P38 blot a la izquierda) y total (P38 TOTAL, blot a la derecha) de células transfectadas con stealth control (S.CTRL) o stealth de CCDC28B (S.CCDC28B) y tratadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de Anisomicina o DMSO durante 4 horas. **C.** Cuantificación del western blot mostrado en **B** donde se confirma que esa dosis y tiempo de tratamiento recupera los niveles de activación basales (incluso los supera). **D.** Cuantificación de largo de cilias. La transfección con el stealth de CCDC28B resulta en cilias significativamente más cortas comparado con el stealth control tanto cuando se las trata con DMSO como control como con Anisomicina (Kruskal Wallis, *** $p < 0,005$).

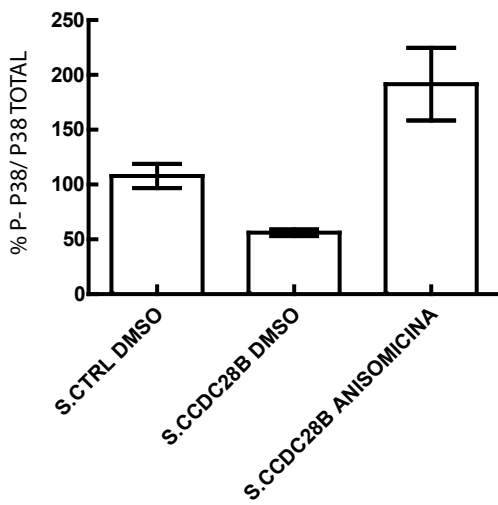
A.



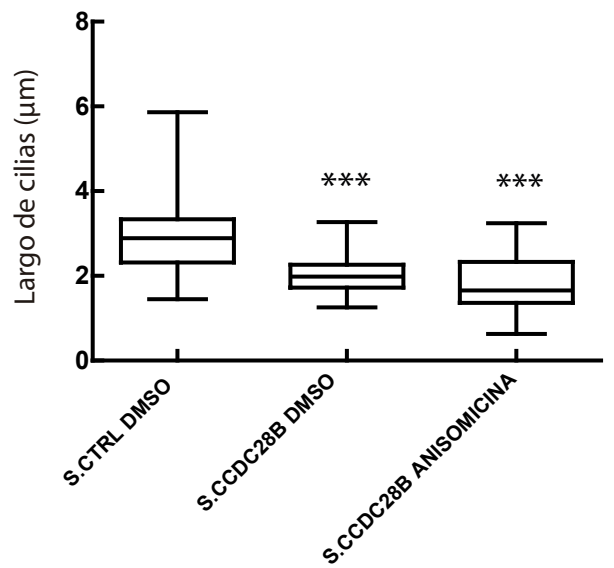
B.



C.



D.



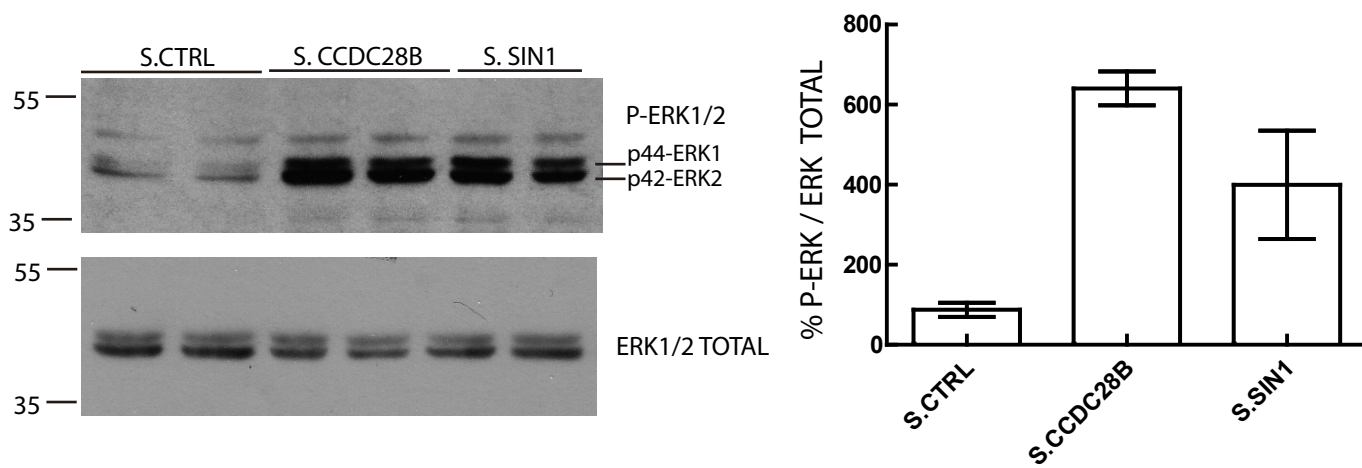
Basado en el global de nuestros datos (lo observado en el Clon B1 y el intento de rescate con Anisomicina en células knockdown) pensamos que si bien la depleción de CCDC28B tendría un efecto sobre la actividad de p38, ésta no sería la causa, o por lo menos la única, del fenotipo ciliar observado.

Otra de las salidas importantes de la señalización por MAPKs es la vía de ERK y resulta importante destacar que varios reportes la vinculan también con el proceso de ciliogénesis y la regulación del largo de las cilias (179,185,186). Entre ellos, un trabajo muy reciente reporta que la vía FGF cuando es activada de manera sostenida acorta las cilias mientras que cuando es activada de forma transitoria extiende las cilias a través de la señalización por ERK y mTORC2, pero no a través de mTORC1 (185).

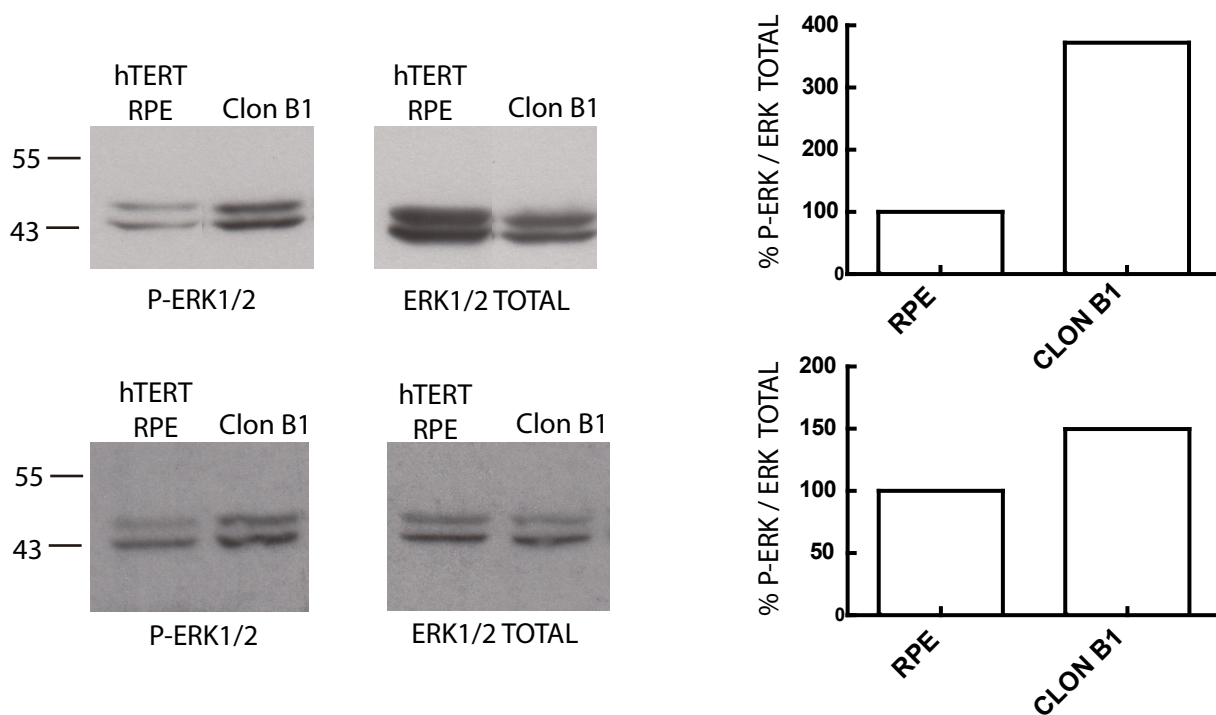
En el análisis de la vía de ERK encontramos que, a diferencia de lo observado para p38, la depleción de CCDC28B y SIN1 en células hTERT-RPE utilizando nuestros oligos stealth resultó, en ambos casos, en un aumento en los niveles de ERK activo (ERK1 fosforilado: p44-ERK y ERK2 fosforilado: p42-ERK) (**Figura 15A**). De manera similar, el análisis de la activación de ERK en células del Clon B1 también mostró un claro aumento en los niveles de ERK fosforilado comparando con células control, en varios experimentos distintos (mostramos dos de ellos en **Figura 15B**). A diferencia de lo que sucedía para p38, estos resultados fueron robustos siendo completamente reproducibles en un mínimo de 3 experimentos independientes. Debido a que CCDC28B y SIN1 afectan en el mismo sentido la activación de ERK, estos resultados son compatibles con un mecanismo de regulación del largo ciliar en línea con nuestra hipótesis original que postulaba que CCDC28B regula la cilia a través de su interacción física con SIN1 y la modulación de su actividad.

Figura 15 | Estado de activación de la vía ERK en mutantes de interés. **A.** Análisis por western blot de ERK1 fosforilado (P-ERK1, p44-ERK), ERK2 fosforilado (P-ERK2, p42-ERK) y total (ERK1/2 total) en células hTERT-RPE transfectadas con oligos de ARN (stealths) para CCDC28B (S.CCDC28B) y SIN1 (S.SIN1). Con la depleción de ambas proteínas aumentan considerablemente los niveles de fosforilación de ERK1/2. **B.** Western blot de dos experimentos distintos donde se comparan los niveles de activación de ERK1/2 en la línea hTERT-RPE CRISPR de CCDC28B (Clon B1) respecto a células hTERT-RPE control. En ambos experimentos se observa aumento en los niveles de ERK1/2 activo (P-ERK1/2) en el Clon B1 respecto a las células control.

A.



B.



Hipotetizamos por lo tanto que al menos parte del fenotipo ciliar dado por la falta de CCDC28B/SIN1 se pudiera basar en la activación de ERK. Para testear esta posibilidad realizamos ensayos de rescate del fenotipo ciliar de las células depletadas de CCDC28B inhibiendo la activación de ERK con la droga U0126 (187). Decidimos intentar el rescate primero en el Clon B1 para eliminar la variabilidad que pudiera generar la transfección con los stealth (**Figura 16**).

Distintos reportes muestran que la inhibición de ERK con U0126 presenta un pico de inhibición a un cierto tiempo, pasado el cual se recuperan los niveles de activación pudiendo inclusive superar los niveles de fosforilación basales (188). Estos resultados dejan en evidencia la existencia de mecanismos de retroalimentación y/o compensación que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar e interpretar los experimentos. El tiempo de tratamiento en el que este fenómeno de compensación ocurre parece ser variable entre condiciones y tipos celulares por lo que comenzamos nuestro estudio con una dosis ampliamente utilizada en la literatura (10 μ M de U0126) y analizando la activación de ERK y su efecto sobre las cilias a las 6, 16 y 24 horas de tratamiento con el inhibidor. Por western blot, analizamos el efecto del tratamiento con la droga sobre los niveles de activación de ERK utilizando un anticuerpo contra la proteína fosforilada (PERK1/2). Observamos que a las 6 horas de tratamiento con U0126 la activación de ERK se encuentra disminuída mientras que los niveles de fosforilación de ERK se recuperan a partir de las 16 horas, permaneciendo altos luego de 24 horas de tratamiento (**Figura 16A**). En estas mismas células realizamos también una inmunofluorescencia para marcar las cilias y así poder cuantificar la proporción de células cilia positivas (células con una clara señal de tubulina acetilada en el axonema de las cilias) en los mismos tiempos. De manera interesante, a las 6 hrs del tratamiento con U0126, momento en que la inhibición de ERK es máxima, observamos una tendencia al aumento en la proporción de células cilia positivas respecto a células del Clon B1 tratadas con DMSO, si bien la diferencia resultó estadísticamente no significativa (**Figura 16B**). Más aún, cuando los niveles de activación de ERK fueron compensados a las 16 y 24 horas de tratamiento con la droga, se ve una tendencia a una exacerbación del defecto en las cilias (**Figura 16B**).

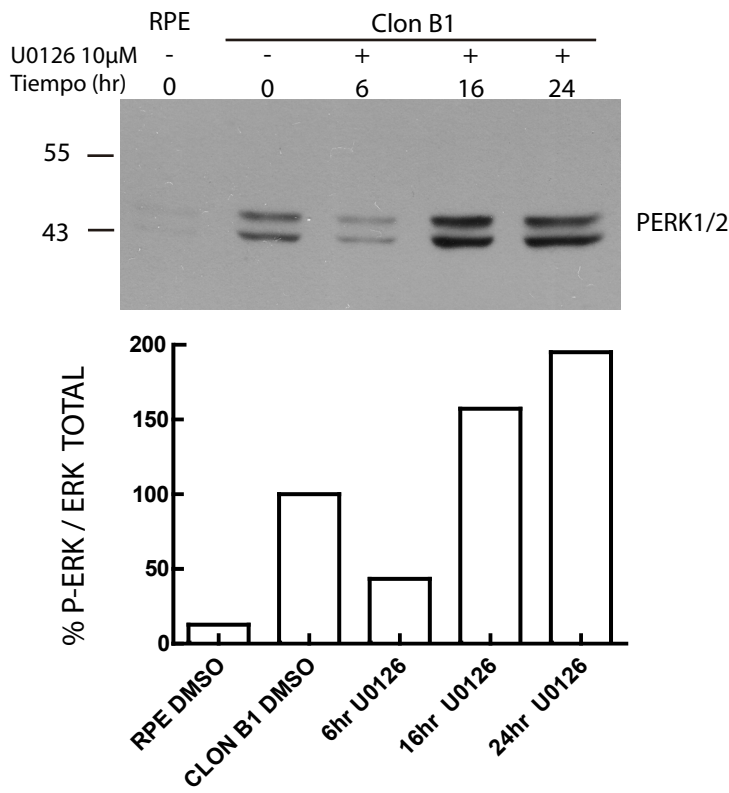
Dada la tendencia observada a las 6 horas de tratamiento con la droga, y el hecho de que a las 16 horas los niveles de fosforilación de ERK ya se habían recuperado, decidimos realizar otro experimento analizando tiempos intermedios, pensando que el rescate máximo de la ciliación pudiera estar ocurriendo desfasado del efecto bioquímico sobre ERK (ejemplo: a las 8-9 horas en el experimento anterior). Repetimos entonces el experimento en el Clon B1 con la misma dosis de U0126 y los siguientes tiempos de tratamiento: 3, 6, 9 y 16 horas. Nuevamente evaluamos por western blot los niveles de ERK activado (**Figura 16C**) y por inmunofluorescencia la proporción de células cilia positivas (**Figura 16D**). En este experimento, el pico de inhibición de ERK se dio a las 3 horas de tratamiento con U0126 (una reducción del 67%) y a partir de las 6 horas se pudo observar que los niveles de fosforilación se empezaron a recuperar, mostrando incluso un efecto rebote a las 9 y 16 horas de tratamiento donde los niveles de ERK fosforilado sobrepasaron los niveles de activación basales en un 80% y 570% respectivamente (**Figura 16C**). Cuando analizamos las cilia por inmunofluorescencia encontramos que a las 6 horas de tratamiento con la droga se produjo un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células cilia positiva comparado con la situación control (Clon B1 tratado con DMSO) y este efecto se perdió en los siguientes tiempos analizados (9 y 16 horas) (**Figura 16D**). Por lo tanto, nuestros datos muestran que la inhibición de la actividad de ERK precede al rescate. En este punto es importante mencionar que la figura muestra un experimento representativo de 3 realizados de manera independiente. Entre experimentos pudimos observar una variabilidad significativa en los tiempos en donde se alcanzó la mayor inhibición de ERK: el momento de mayor inhibición de ERK y el rescate del fenotipo ciliar no siempre ocurrió en las mismas horas de tratamiento con la droga. Esta observación sugiere que variaciones en el estado del cultivo celular (diferencias en número de células, niveles de confluencia o número de pasaje) puedan afectar los niveles de ERK y su respuesta al tratamiento. Por este motivo, consideramos importantísimo poder comparar los resultados de western blots e inmunofluorescencias siempre utilizando un mismo cultivo. Dicho esto, en todos los experimentos realizados observamos la misma tendencia: el rescate del fenotipo ciliar ocurrió en un tiempo igual o inmediatamente posterior al punto de

mayor inhibición de ERK evaluado por western blot. Este desfase entre el efecto bioquímico sobre ERK y el efecto celular sobre las cilia seguramente refleje el mecanismo por el cual ERK afecta las cilia, que aunque todavía no lo conocemos, posiblemente involucre cambios en la célula que no son inmediatos (activación de otras vías, cambios en la transcripción génica o remodelado del citoesqueleto por ejemplo).

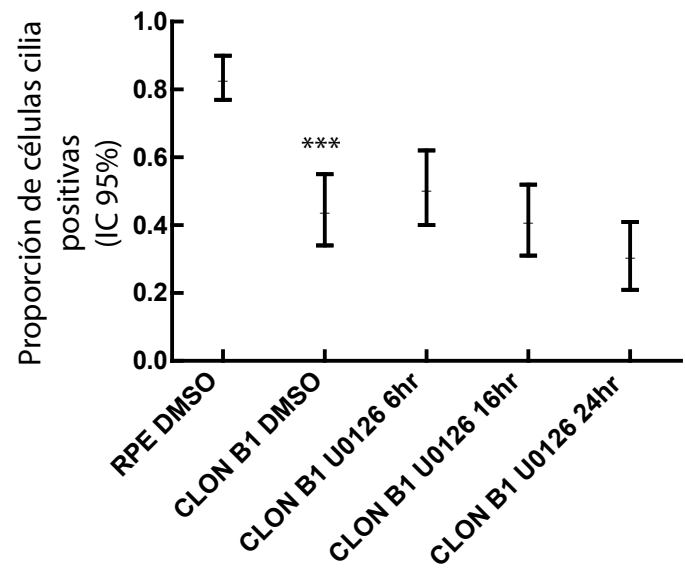
En conjunto nuestros resultados indican que CCDC28B/SIN1 regulan el largo de las cilia, al menos en parte, a través de la modulación de la vía de ERK.

Figura 16 | Tratamiento del Clon B1 con U0126 y análisis del efecto sobre los niveles de activación de ERK y el fenotipo ciliar. **A y B.** Western blot con anticuerpo contra ERK fosforilado (PERK1/2) (A) y cuantificación de la proporción de células cilia positivas (B) en células tratadas con DMSO como control o con 10 μ M de U0126 por 6, 16 o 24 horas. Células hTERT-RPE tratadas con DMSO se muestran como control del aumento de los niveles de ERK activado en el Clon B1 y de la disminución de su proporción de células cilia positivas que es estadísticamente significativo (***) test de hipótesis de proporciones $p < 0,005$). **C y D.** Western blot con anticuerpo contra ERK fosforilado y total (PERK1/2 y ERK1/2 TOTAL respectivamente) (C) y cuantificación de la proporción de células cilia positivas en ensayos de inmunofluorescencia (D) en células tratadas con DMSO como control o con U0126 10 μ M por 3, 6, 9 y 16 horas. (***) en D representan la comparación con las RPE control tratadas con DMSO (test de hipótesis de proporciones $p < 0,005$) y \blacklozenge la comparación con el Clon B1 tratado con DMSO (test de hipótesis de proporciones, $p < 0,05$).

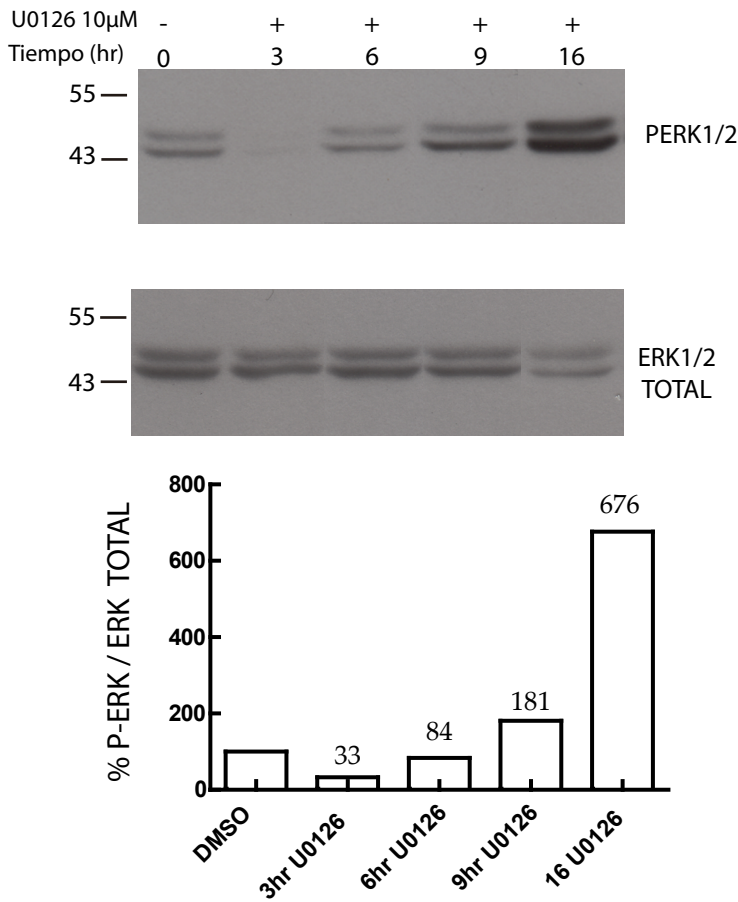
A.



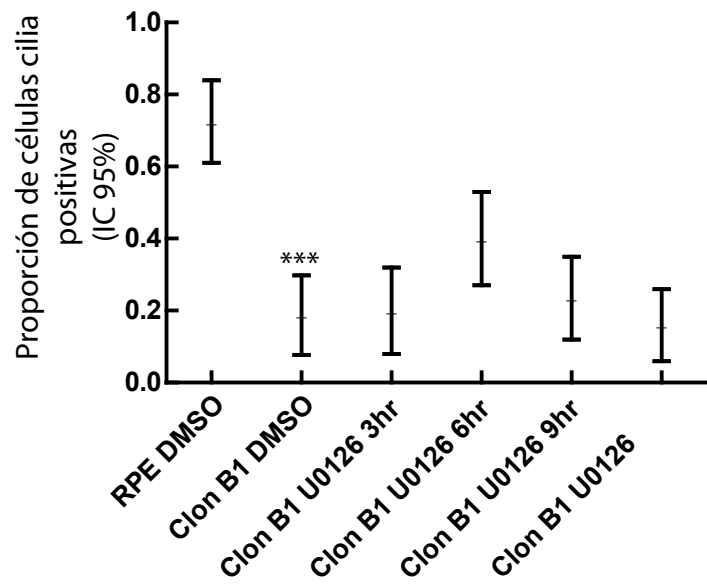
B.



C.



D.



CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CCDC28B Y COMPONENTES DE LA KINESINA 1

Todavía no comprendemos en profundidad la relación funcional entre CCDC28B y SIN1 así como tampoco entre CCDC28B y las proteínas BBS, pero hipotetizamos que CCDC28B podría estar regulando su actividad. Esta hipótesis se basa en algunas observaciones y datos experimentales. En primer lugar, el análisis *in silico* de la secuencia de amino ácidos de CCDC28B no revela motivos efectores de ningún tipo, pero si un dominio de interacción proteína-proteína como es el coiled-coil en la porción C-terminal de la proteína. Por otro lado, de los ensayos de rescate en pez cebra realizados por la Dra. Magdalena Cárdenas-Rodríguez sabemos que SIN1 actuaría corriente abajo de CCDC28B, ya que la sobre-expresión de SIN1 rescata el fenotipo causado por una disminución de CCDC28B pero no viceversa (138). En este contexto, pensamos que identificar y caracterizar nuevos interactores era una herramienta útil para obtener pistas acerca de la función y eventualmente el mecanismo de acción de CCDC28B.

Durante mi tesina de grado realizamos un ensayo de doble híbrido citoplasmático en levaduras donde surgió como potencial interactor de CCDC28B, entre otros, la cadena liviana de la kinesina 1 (KLC1). Esta interacción fue posteriormente confirmada en células de mamífero por co-inmunoprecipitación en lisados de células HEK293 donde sobre-expresamos ambas proteínas fusionadas a un tag. La confirmación de esta interacción fue el punto de partida del trabajo que presentamos en este capítulo y el siguiente donde nos enfocamos en la caracterización funcional de dicha interacción.

RESULTADOS

4.1 CCDC28B interactúa con el motor molecular Kinesina 1

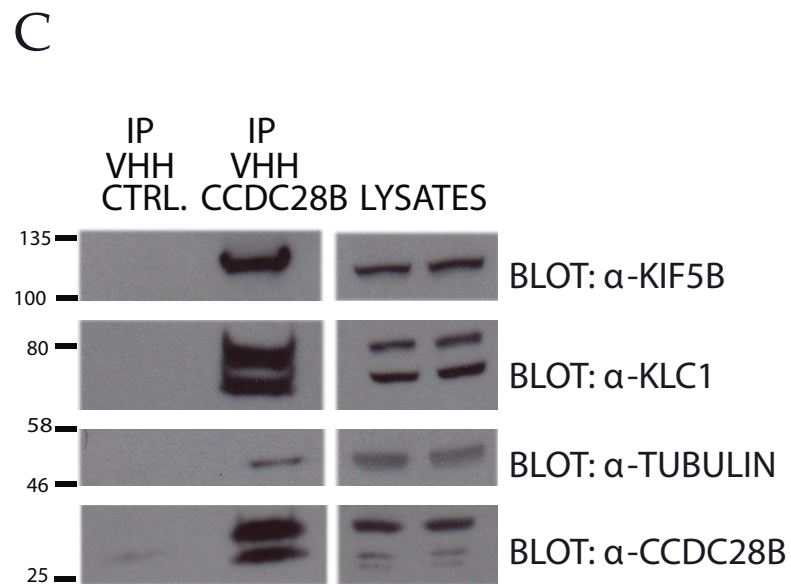
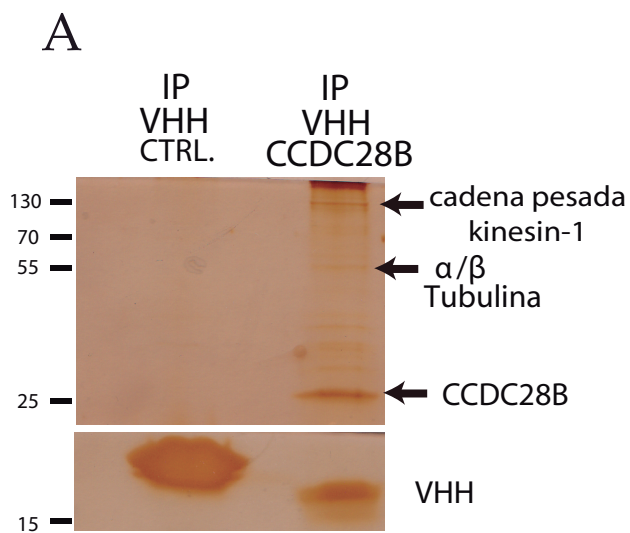
Mediante ensayos de doble híbrido en levadura y de co-inmunoprecipitación en células de mamíferos previamente identificamos una interacción física entre CCDC28B y la proteína KLC1 (kinesin light chain 1). Como describimos en la introducción de esta tesis, KLC1 es un componente del motor molecular kinesina 1 que típicamente está formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En este trabajo por lo tanto lo

primero que nos propusimos fue determinar si la interacción de CCDC28B con KLC1 ocurría en el contexto del complejo motor kinesina 1 del cual KLC1 forma parte.

Para esto realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo de dominio simple producido en llama específico para CCDC28B (VHH) (ver Métodos). Con este anticuerpo inmunoprecipitamos CCDC28B de un lisado de Hek293 transfectado con la construcción pCS2+ CCDC28B. A continuación realizamos un SDS-PAGE y teñimos el gel con plata. De esta forma detectamos, proteínas de diferente peso molecular co-immunoprecipitando con CCDC28B (**Figura 17A**). Para identificar estos posibles interactores cortamos las principales bandas del gel y las mismas se analizaron por espectrometría de masa donde fueron identificadas la cadena pesada de la kinesina 1 KIF5B, α/β -tubulina y CCDC28B (**Figura 17B**).

Dado que estas interacciones fueron detectadas en lisados donde sobre-expresamos CCDC28B, decidimos confirmarlas en lisados de células Hek293 sin transfectar mediante una combinación de inmunoprecipitación y análisis por western blot. Para esto inmunoprecipitamos CCDC28B endógena con nuestro VHH y evaluamos la presencia de KIF5B, KLC1 y α -tubulina en los inmunoprecipitados utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas. Utilizando un VHH irrelevante como control, mostramos que estas proteínas co-inmunoprecipitan de manera específica con CCDC28B (**Figura 17C**).

Figura 17| CCDC28B interactúa con los componentes de la Kinesina 1 KLC1 y KIF5B. **A.** La inmunoprecipitación a partir de lisados de células Hek293 que sobreexpresan CCDC28B con el anticuerpo específico de dominio único de llama (VHH) resultó en la co-inmunoprecipitación de otras proteínas. Las flechas indican bandas en el gel que fueron cortadas para analizar por espectrometría de masa. Un VHH irrelevante fue usado como control. El gel se cortó en dos para evitar la saturación de las bandas del VHH cuando lo teñimos con plata ya que la parte de arriba del gel requirió mayor tiempo de exposición. **B.** Lista de proteínas identificadas por MALDI/TOF MS. **C.** Se utilizó el VHH contra CCDC28B para inmunoprecipitar la proteína endógena en lisados de células Hek293 y anticuerpos específicos para detectar KIF5B, KLC1, α -tubulin y CCDC28B. Los lisados celulares muestran la presencia de las proteínas correspondientes en los extractos usados para la inmunoprecipitación. La membrana entera fue cortada y expuesta a los diferentes anticuerpos.



B

List of proteins identified by MALDI TOF/TOF MS from bands

Label	Description	Accession N ^o	Sequence coverage (%)	Mascot protein score	# of assigned peptides *
50KDa	α-Tubulin	gi 340021	43	264	14
50KDa	β-tubulin	gi 18088719	52	409	23
120KDa	kinesin-1 heavy chain 5B	gi 4758648	52	591	47
25KDa	Coiled-coil domain-containing protein 28B	gi 110349769	45	237	8

* at least three sequences were confirmed by MS/MS analysis

Estos resultados indican que CCDC28B estaría interactuando con KLC1 posiblemente en el contexto del complejo motor kinesina 1 ya que vimos que también interactúa con la cadena pesada del complejo, KIF5B.

4.2 Evaluación del efecto del Knockdown de KLC1 y KIF5B en el número y largo de las cilias

Habiendo determinado que CCDC28B interactúa físicamente con distintos miembros del motor molecular kinesina 1, hipotetizamos que esta interacción podría ser relevante en el contexto de la regulación del largo de cilias, principal función descrita para CCDC28B. Para estudiar esta posibilidad comenzamos por evaluar el efecto de depletar los componentes de la kinesina 1 sobre el número y largo de las cilias en células hTERT-RPE.

En primer lugar nos centramos en generar herramientas para poder reducir los niveles de KLC1 y KIF5B. En el caso de KLC1 se han reportado tres isoformas que son producidas por splicing alternativo involucrando los últimos exones del gen (NM_005552.4; NM_182923.3; NM_001130107.1) y que codifican para proteínas que difieren únicamente en su extremo C-terminal (**Figura 18A**). Por lo tanto, diseñamos y validamos un oligo doble hebra de ARN interferente (Stealth de Invitrogen) en una región del ARNm común a las 3 isoformas (**Figura 18A**).

Para validar el oligo transfectamos células hTERT-RPE y a las 48 horas post-transfección extrajimos proteínas y realizamos un western blot con el anticuerpo específico para KLC1. Nuestros resultados muestran que la transfección con el stealth para KLC1 redujo eficientemente los niveles de KLC1 (**Figura 18B**).

La Kinesina 1 puede estar formada por una de tres cadenas pesadas diferentes: KIF5A, KIF5B o KIF5C. Obtuvimos oligos de ARN para cada uno de los tres transcritos y evaluamos su eficiencia por RT-PCR. Tanto KIF5B como KIF5C se expresan en hTERT-RPE y la transfección con los oligos de ARN resultó en una reducción en sus niveles de expresión (**Figura 18C**). En el caso de KIF5B contábamos con un anticuerpo específico por lo que pudimos también verificar la bajada en los niveles de proteínas por western blot (**Figura 18C**). Sin embargo, en ningún experimento pudimos amplificar KIF5A sugiriendo que su expresión es baja en esta línea celular. A pesar de este resultado, y

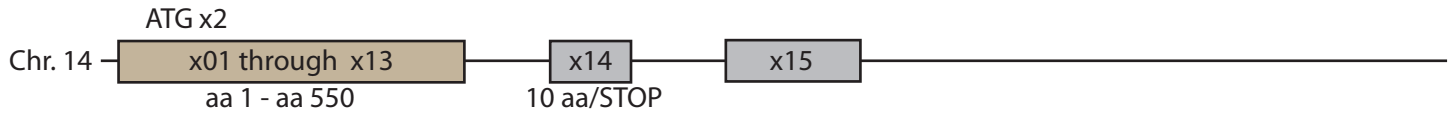
ante la posibilidad de tener niveles bajos de mensajero produciendo proteína que pudiera interferir en la interpretación de los resultados, el stealth para KIF5A fue igualmente incluido en los análisis que se describen a continuación.

Figura 18 Isoformas de KLC1 y validación de los Stealths ARN oligos. **A.** Representación esquemática de las 3 isoformas de KLC1 donde se indica la posición reconocida por el oligo de ARN utilizado en este trabajo. **B.** Western blot de lisados de hTERT-RPE transfectados con el oligo ARN para KLC1 (S.KLC1), mostrando una reducción en los niveles de KLC1 en. **C.** Análisis por RT-PCR semi-cuantitativo a partir de ARNm de células hTERT-RPE mostrando una reducción en los niveles de ARNm de KIF5B y KIF5C luego de la transfección con sus oligos de ARN respectivos. La expresión de KIF5A posiblemente sea muy baja en esta línea celular ya que no logramos amplificarla. La expresión del gen GAPDH fue usado como control. **D.** Western blot a partir de células transfectadas con el oligo de ARN S.KIF5B, confirmando la depleción de KIF5B. La tubulina fue utilizada como control.

A.

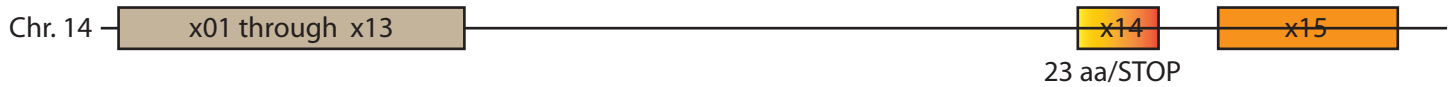
KLC1 isoforma 1: NM_005552.4

Proteina: 560 aa
PM estimado: 64 KDa



KLC1 isoforma 2: NM_182923.3

Proteina: 573 aa
PM estimado: 65 KDa

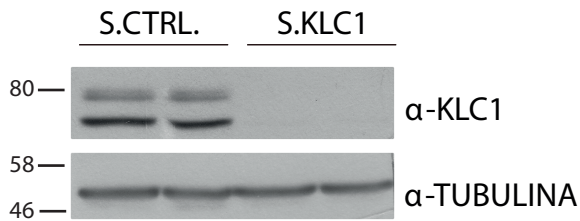


KLC1 isoforma 3: NM_001130107.1

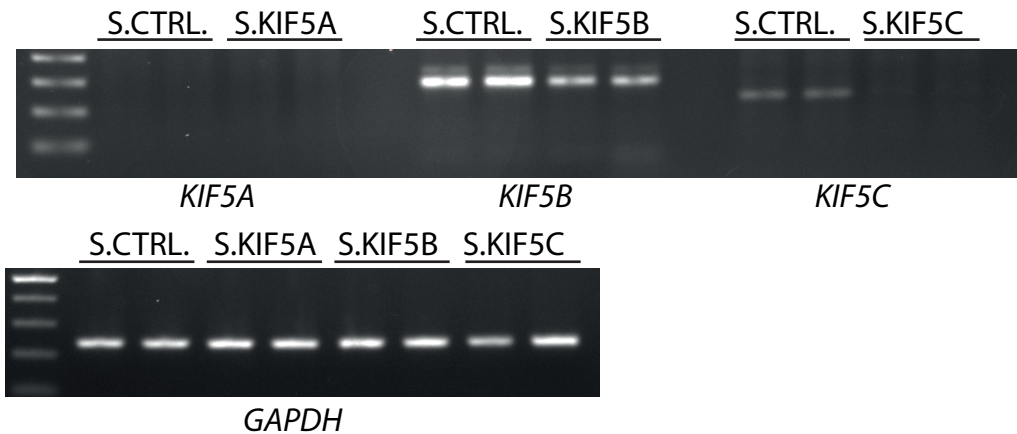
Protein: 618 aa
PM estimado: 70 KDa



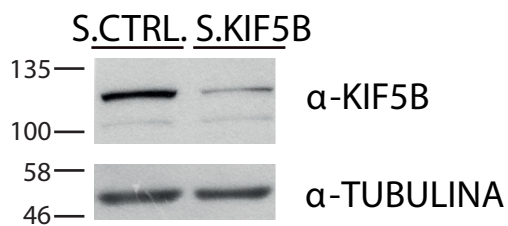
B.



C.



D.

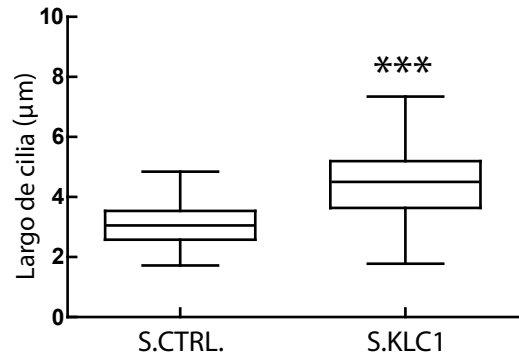
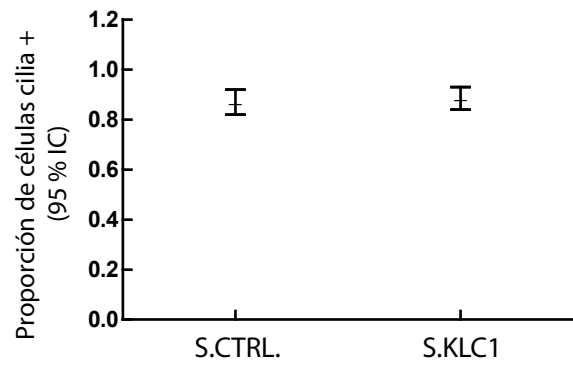
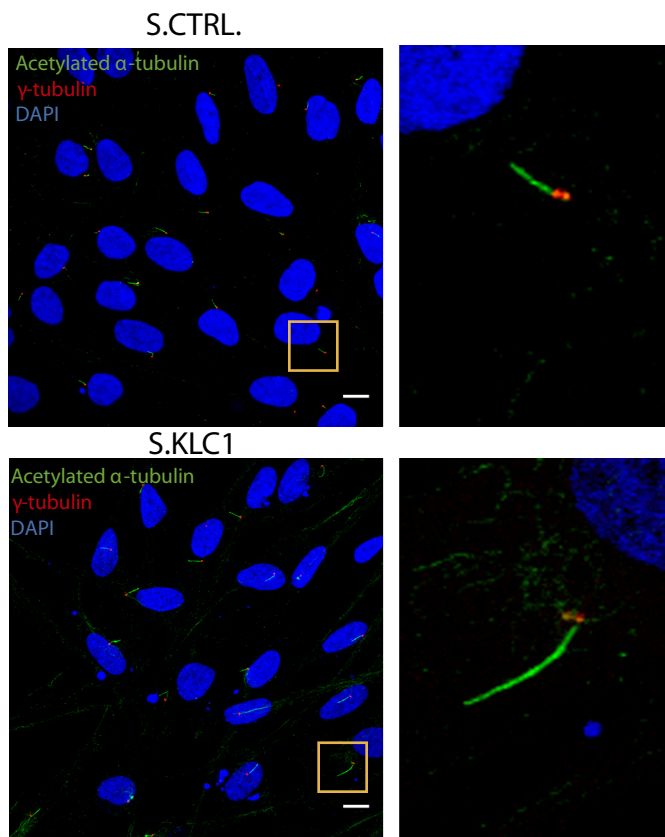


Una vez validados los oligos, transfectamos células hTERT-RPE, les retiramos el suero 48 horas para inducir la ciliación y analizamos las cilias a las 72 horas post transfección por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico para α -tubulina acetilada (**Figura 19**). Medimos por un lado la proporción de células cilia-positivas y el largo de las cilias en al menos 10 campos seleccionados al azar en tres experimentos independientes y para cada condición: células transfectadas con un stealth control (S.CTRL) o stealth para KLC1 o las cadenas pesadas (S.KLC1 o S.KIF5A-C respectivamente). En primer lugar analizamos las consecuencias de reducir los niveles de KLC1. Nuestros resultados muestran que la depleción de KLC1 no afectó la proporción de células cilia positivas (**Figura 19A**). Sin embargo, la media del largo de las cilias en células knockdown para KLC1 fue significativamente mayor que en las células transfectadas con el oligo de ARN control (una media de 3,1 μm en controles comparado con 4,5 μm en células depletadas de KLC1; $P = 8.24\text{E}-28$; **Figura 19A**).

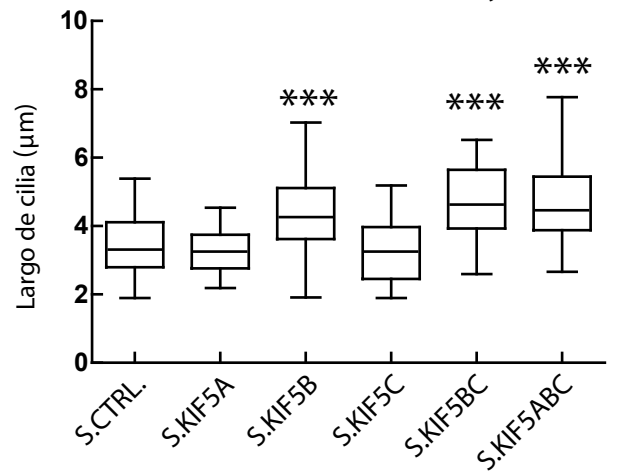
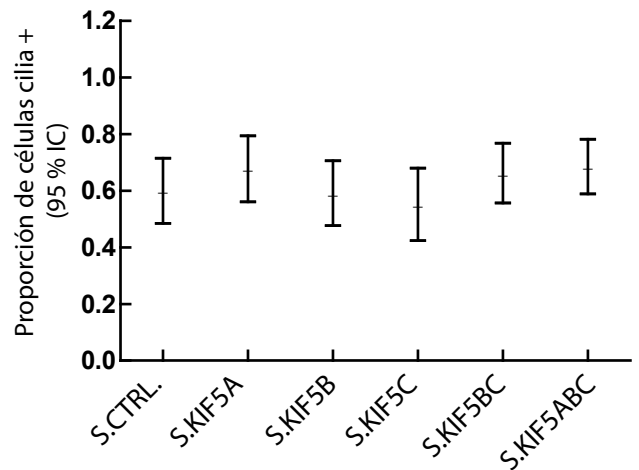
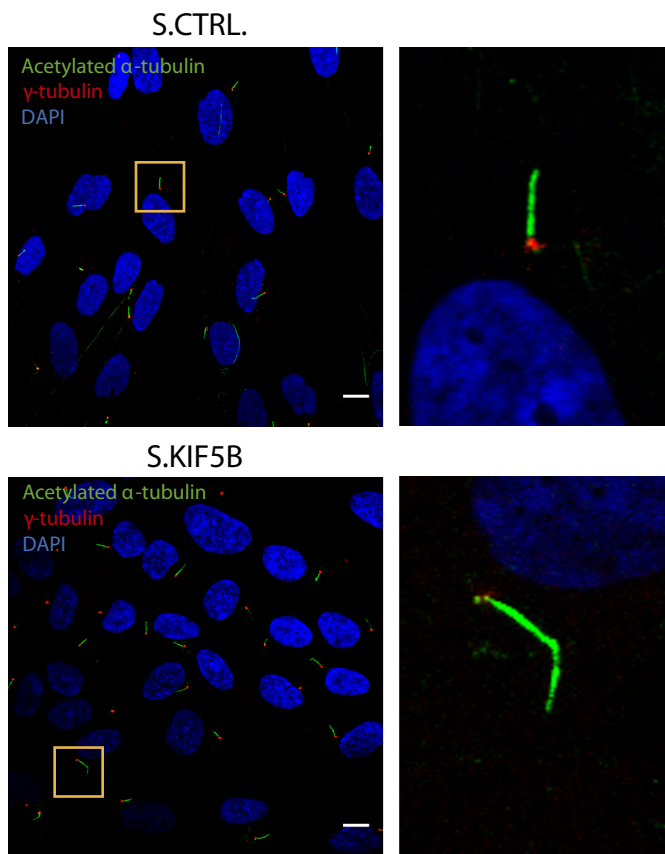
Similar a lo que ocurre con la depleción de KLC1, depletar las diferentes cadenas pesadas de manera individual o en combinación no afectó la proporción de células cilia positiva (**Figura 19B**) y depletar KIF5B también resultó en cilias significativamente más largas (una media de 3,3 μm en controles en comparación con 4,3 μm en células depletadas de KIF5B; $P = 2.30\text{E}-11$). Por el contrario, la depleción individual de las otras kinesinas no fue suficiente para afectar el largo de las cilias. La depleción simultánea de KIF5B y KIF5C o KIF5A+B+C resultó en una leve exacerbación del fenotipo de KIF5B si bien la diferencia no resultó estadísticamente significativa cuando comparamos con KIF5B solo (4,6 μm con S.KIF5BC $P = 0,74$, y 4,5 μm con la depleción de KIF5ABC, $P = 0,81$; **Figura 19B**). Estos resultados indican que KLC1 en el contexto del complejo kinesina 1 cumplen un rol inhibitorio sobre el alargamiento de las cilias. A su vez, y en relación a las cadenas pesadas del motor molecular, KIF5B sería el principal responsable del fenotipo ciliar observado en hTERT-RPE, aunque no podemos descartar que exista redundancia funcional al menos parcial entre cadenas pesadas, particularmente con KIF5C.

Figura 19| La depleción de KLC1 y KIF5B resulta en cilias más largas. Células hTERT-RPE transfectadas con stealth control o para los diferentes componentes del complejo kinesina 1 fueron marcadas usando un anticuerpo contra tubulina acetilada (verde), contra α tubulina (rojo) y DAPI (azul) para marcar cilias, cuerpo basal y núcleos respectivamente, y analizadas por microscopía confocal. Se midió el largo de las cilias y los resultados se representan en box plots. Se muestran los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. **A.** Mientras que la depleción de KLC1 no afecta la proporción de células cilia positivas comparado con un oligo control (test de hipótesis para proporciones), resultó en cilias anormalmente largas (test estadístico: Mann-Whitney; ***P < 0.0001). Por lo menos 100 cilias fueron medidas para cada condición (143 para S.CTRL. y 147 para S.KLC1). **B.** La depleción de las diferentes KIFs (S.KIF5A, B, C) no afectó la proporción de células cilia positivas. De manera similar a la depleción de KLC1, depletar KIF5B, KIF5BC y KIF5ABC resultó en cilias alargadas (se midieron 122 cilias KIF5B KD, 96 KIF5BC y 109 KIF5ABC y se compararon con 95 cilias control). Test estadístico: one-way ANOVA. Los asteriscos muestran la diferencia estadística significativa comparada a los controles ***P < 0.0001. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

A.



B.



4.3 Análisis de la localización subcelular de KLC1 y KIF5B en hTERT-RPE

Como se mencionaba en la introducción, se ha demostrado que diferentes kinesinas se localizan en la base de la cilia o dentro del compartimiento ciliar desde donde regulan el largo de las ciliias por diferentes mecanismos. En muchos casos en donde la kinesina tiene un rol inhibitorio del largo de las ciliias el motor molecular se localiza en el axonema ciliar y regula su largo localmente a través de actividades despolimerizantes de microtúbulos, como discutíamos anteriormente en el ejemplo de KIF7 (2–6). Con esto en mente, y para ganar información acerca de la forma en que la Kinesina 1 regula el largo de las ciliias, lo primero que decidimos evaluar fue la localización subcelular de KLC1 y KIF5B en células hTERT-RPE.

Transfectamos células con el plásmido pMyc-KLC1 para sobre-expresar KLC1 fusionada al tag Myc y evaluar su localización por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-Myc. Myc-KLC1 se localizó formando agregados en el citoplasma, un patrón esperable para una proteína sobre-expresada. Sin embargo, fue interesante notar que en todas las células analizadas, uno de estos agregados siempre se encontró en la base de la cilia, como lo muestra la marca con un anticuerpo anti α -tubulina acetilada (**Figura 20A**). Estos resultados concuerdan con un reporte previo que muestra que la sobre-expresión de KLC1 resulta en la formación de agregados citoplasmáticos, posiblemente causados por la interacción entre sus dominios HR (heptad repeats), algunos localizados en el centrosoma (158). Dado que la sobre-expresión puede resultar en señal no específica, lo siguiente que hicimos fue evaluar la localización de KLC1 endógena con un anticuerpo específico. Observamos una señal difusa extendida por todo el citoplasma pero también, consistente con los resultados previos, una señal en la base de la cilia (**Figura 20B**). De la misma forma analizamos la localización de KIF5B, realizando una inmunofluorescencia con un anticuerpo comercial anti KIF5B para detectar la proteína endógena. Similar a lo observado para KLC1, detectamos señal citoplasmática difusa y una acumulación en la base de la cilia (**Figura 20C**). Para confirmar la especificidad de la señal, tanto de KLC1 como de KIF5B, realizamos las inmunofluorescencias correspondientes en células transfectadas con el S.KLC1 o con

S.KIF5ABC. En estas células observamos que se perdió el patrón de localización mencionado anteriormente (**Figura 21**).

Figura 20 | KLC1 y KIF5B se localizan en la base de la cilia. Análisis de células hTERT-RPE por microscopía confocal. **A.** Células hTERT-RPE fueron transfectadas para sobreexpresar KLC1 fusionada al tag Myc. Además de los agregados citoplasmáticos, un conjunto de Myc- KLC1 (anti-Myc en verde) se localiza en la base de la cilia (anti α -tubulina acetilada en rojo) **B.** Además de una señal difusa en el citoplasma, el anticuerpo anti-KLC1 muestra una acumulación de la proteína endógena en la base de la cilia. **C.** De manera similar, KIF5B endógena también se encuentra en el citoplasma y concentrado en la base de la cilia. Los cuadros en amarillo marcan el área que está magnificada y mostrada en los paneles a la derecha. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

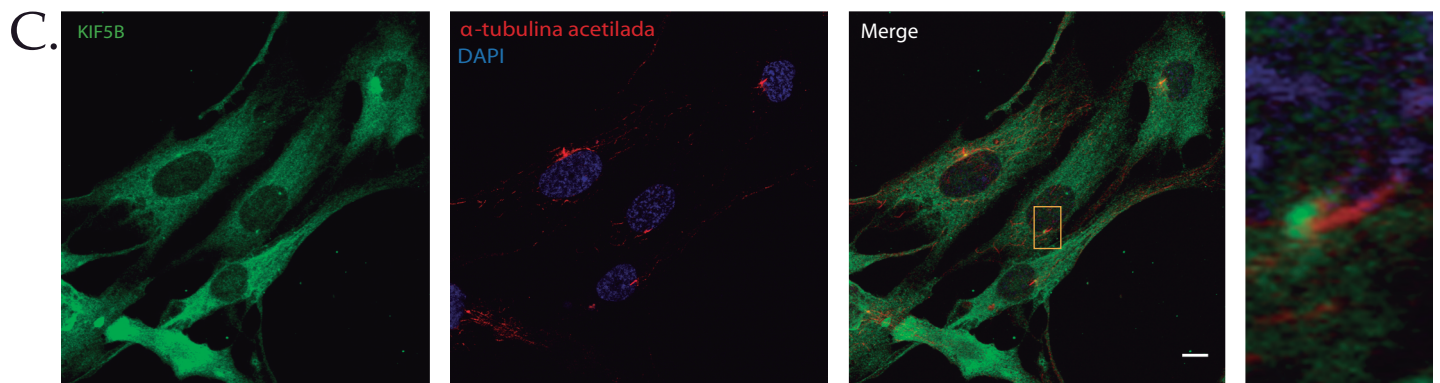
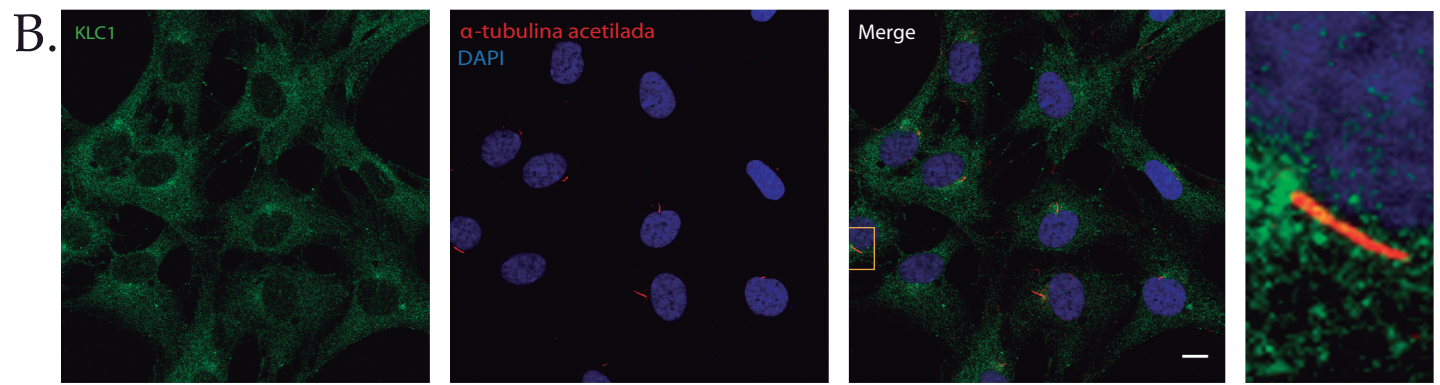
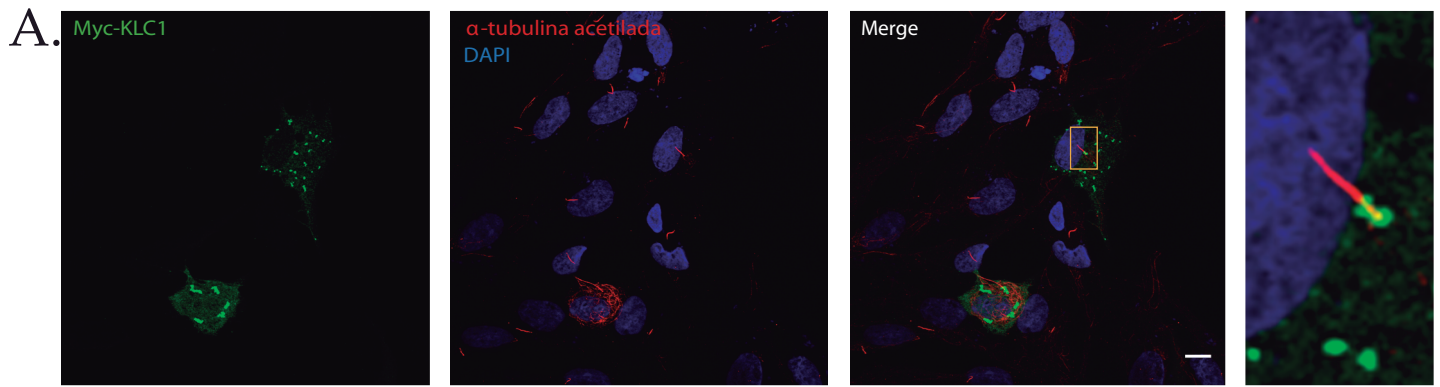
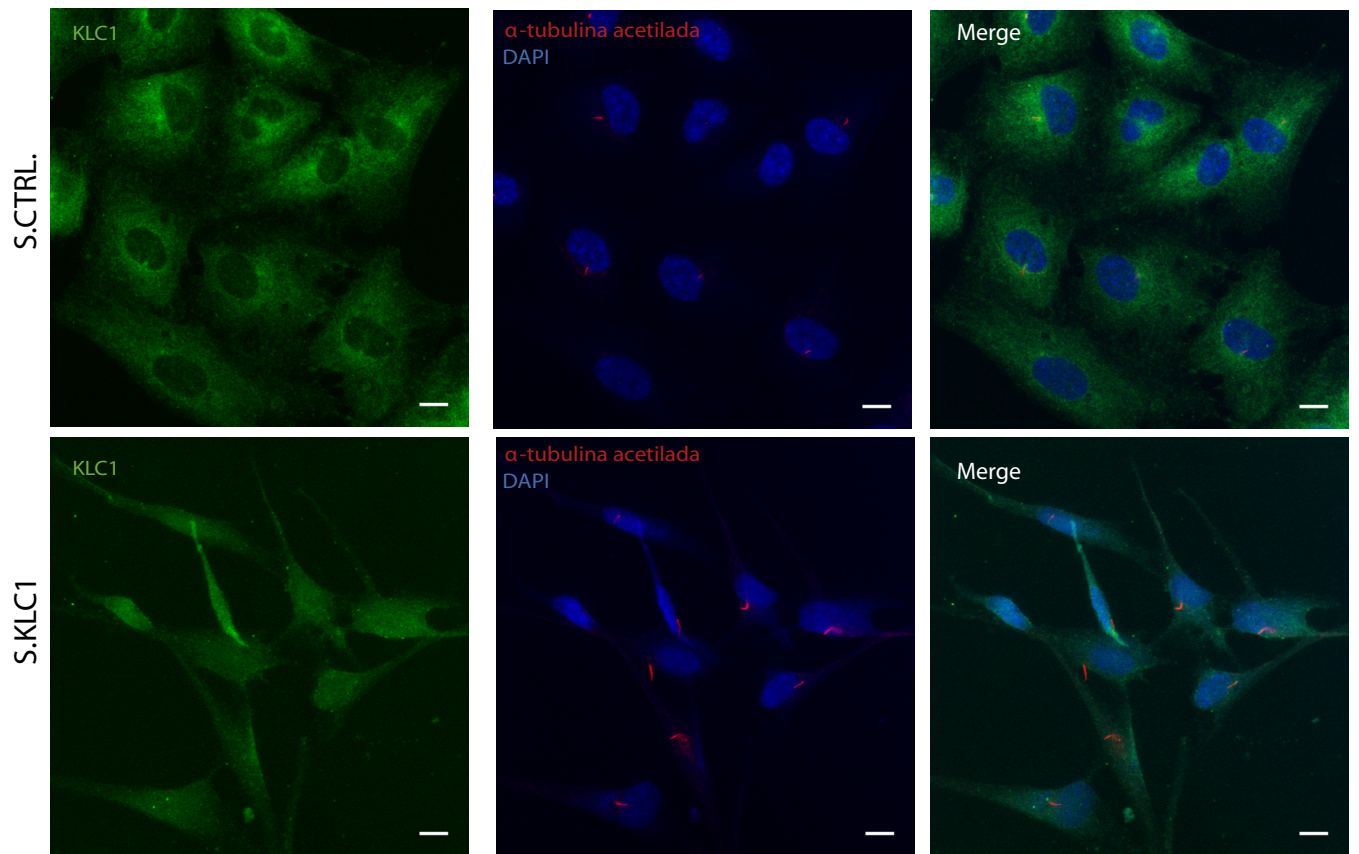
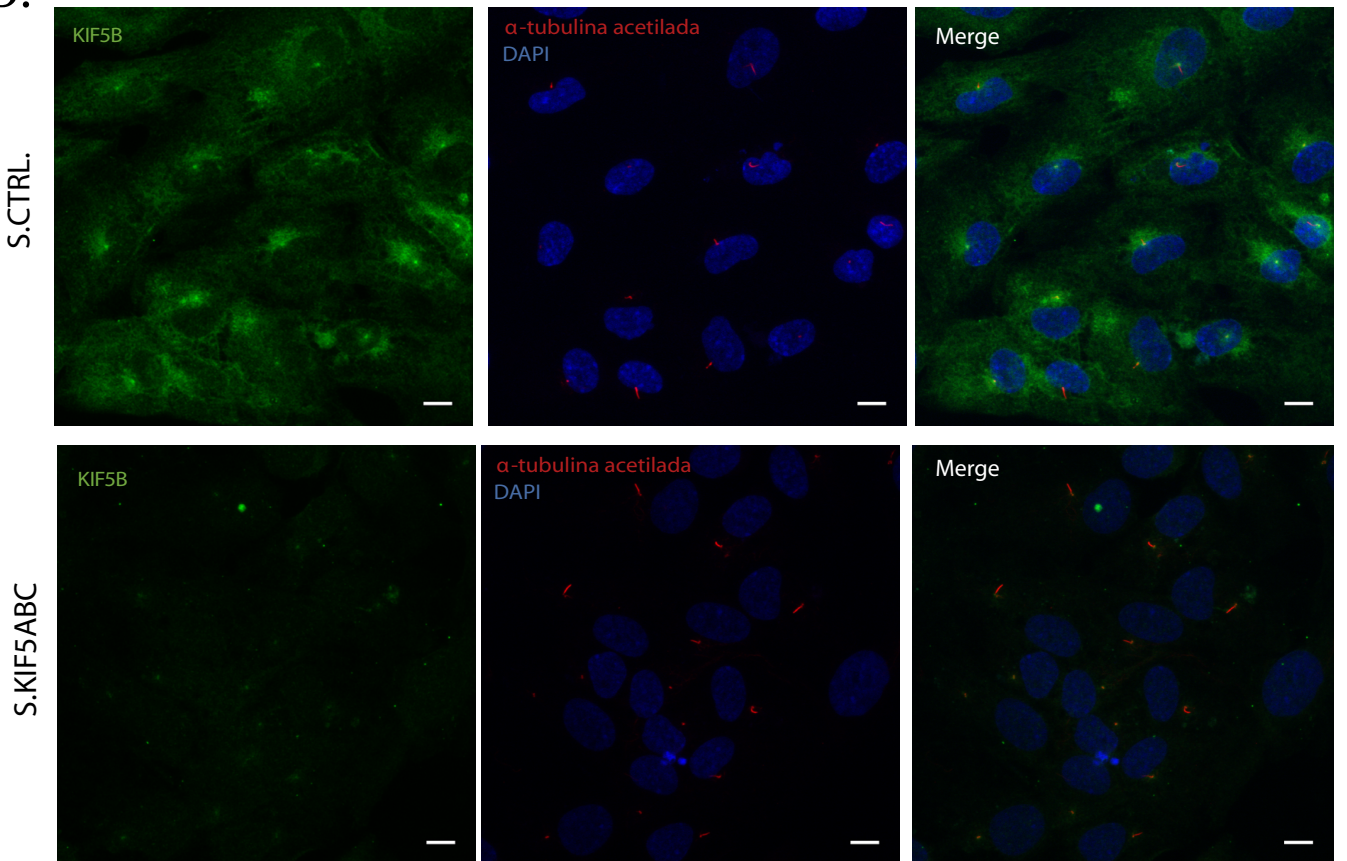


Figura 21 | Validación de la localización del anticuerpo anti-KLC1 y KIF5B. **A.** KLC1 endógena se localiza en el citoplasma y la región pericentriolar y esta señal se pierde cuando se transfecta con su oligo de ARN (S.KLC1). **B.** De manera similar, la localización endógena de KIF5B en la región pericentriolar es específica.

A.



B.



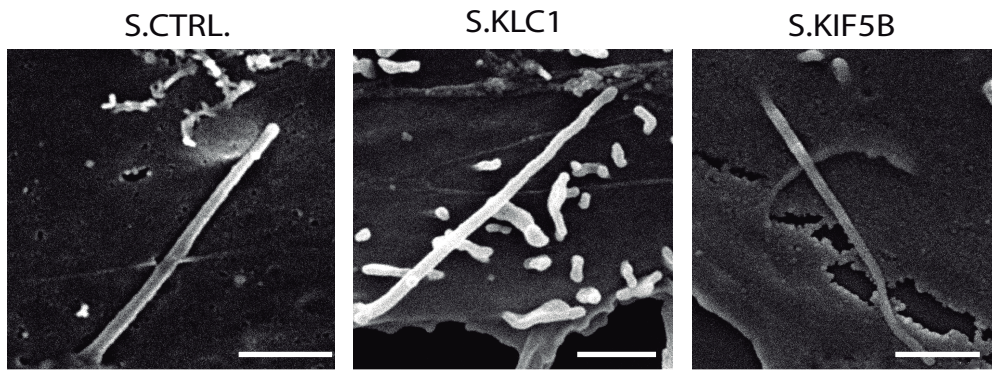
Si bien es difícil concluir sobre resultados negativos, nuestros datos mostraron que, a diferencia de lo reportado para otras kinesinas, KLC1 y KIF5B no se localizarían dentro del compartimiento ciliar, dato que sugiere un mecanismo de regulación del largo de las ciliias diferente a la despolimerización de microtúbulos directamente a nivel del axonema.

4.4 Evaluación de la forma y estabilidad de las ciliias mutantes para la kinesina 1

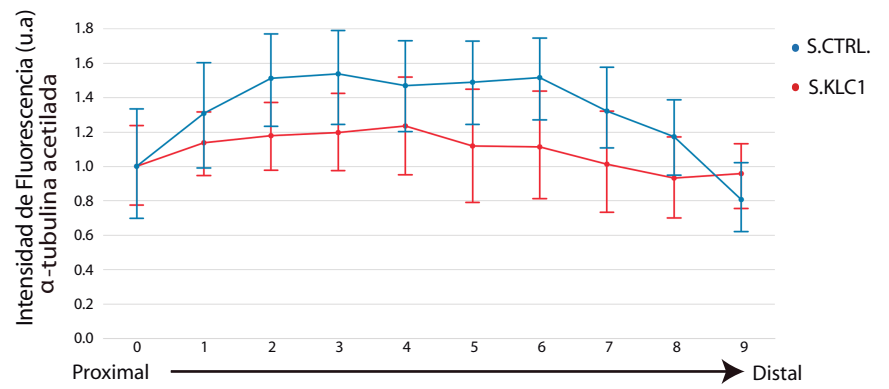
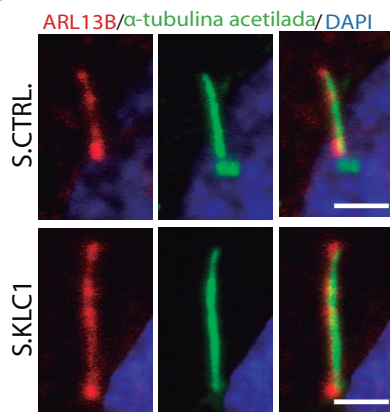
Una de las características de las ciliias mutantes de otras kinesinas que regulan el largo de las ciliias a través de modular la estabilidad de los microtúbulos del axonema, es que presentan defectos estructurales. Por ejemplo fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) obtenidos de ratones KO para *Kif7* (*Kif7*^{-/-}) presentan ciliias más largas que MEFs wt, y analizadas por microscopía electrónica muestran dobleces y estrangulamientos. A su vez, estas ciliias presentan una reducción en los niveles de acetilación de tubulina (una modificación post traduccional asociada con mayor estabilidad de los microtúbulos) principalmente en la mitad distal del organelo (189). En colaboración con la Unidad de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias, analizamos las ciliias de las células depletadas de KLC1 y KIF5B por microscopia electrónica de barrido. A diferencia de las ciliias mutantes *Kif7*^{-/-}, nuestros resultados mostraron que la reducción en los niveles de kinesina 1 no resulta en defectos estructurales evidentes (**Figura 22A**). También analizamos la intensidad de fluorescencia de la tubulina acetilada a lo largo del axonema de ciliias en células depletadas de KLC1, marcando todo el largo de las ciliias con un anticuerpo contra la proteína de membrana ciliar ARL13B como se describe en materiales y métodos. Si bien no podemos descartar una reducción generalizada en los niveles de tubulina acetilada, principalmente en los segmentos medios de las ciliias depletadas de KLC1, el patrón de acetilación en los extremos distal y proximal es comparable al de las ciliias control (**Figura 22B**), efecto que es diferente a lo observado en células *Kif7*^{-/-} (189).

Figura 22 | Las ciliias de células depletadas de KLC1 o KIF5B son más largas pero no presentan defectos estructurales. **A.** Micrografías electrónicas de barrido mostrando ciliias de células hTERT-RPE transfectadas con oligos de ARN control (S.CTRL), KLC1 (S.KLC1) o KIF5B (S.KIF5B). La escala de las barras corresponden a 1 μm . **B.** Los niveles de tubulina acetilada en ciliias de células control o depletadas de KLC1 fueron cuantificados midiendo la intensidad de fluorescencia de la señal obtenida utilizando el anticuerpo contra α -tubulina acetilada (verde). La señal obtenida con el anticuerpo anti-ARL13B (rojo) se utilizó para marcar el largo total de la cilia. Las barras de escala corresponden a 2 μm . Para la cuantificación, cada cilia fue dividida en 10 segmentos desde la base a la punta en los que se determinó la intensidad media (ver detalles en sección materiales y métodos). Para cada experimento (S.KLC1 y S.CTRL) un perfil de intensidad de diez puntos fue calculado promediando la medida de todas las ciliias en cada una de las regiones de interés. Estos perfiles se muestran normalizados por la medida de la primer región de interés. Las barras verticales trazan el intervalo de confianza del 95% sobre la media.

A.



B.



En suma, nuestros resultados mostraron por primera vez un vínculo directo entre el motor molecular kinesina 1 y la regulación del largo de las cilias. Este complejo actúa como un inhibidor del largo de las cilias dado que su depleción resulta en cilias anormalmente largas. A su vez, nuestros datos dejaron en evidencia que estas cilias largas no presentan los defectos estructurales que se han reportado en las cilias largas de otros mutantes de kinesinas que afectan la polimerización de tubulina a nivel del axonema, sugiriendo por lo tanto un mecanismo de acción diferente.

CAPÍTULO V

RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE CCDC28B Y COMPONENTES DE LA KINESINA 1

Nuestros resultados hasta el momento indicaban que CCDC28B y la kinesina 1 participan en un proceso celular común, la regulación del largo de las cilias, aunque con roles opuestos. Basados en su interacción física hipotetizamos que CCDC28B y kinesina 1 podrían regular cilias en forma conjunta en una misma vía o proceso.

Por otro lado, dado que kinesina 1 es un motor molecular cuya principal función es mover cargos dentro de la célula y sumado a que su efecto sobre las cilias no parece ser regular los microtúbulos del axonema, hipotetizamos que una posibilidad sería que module el largo de las cilias a través de CCDC28B que sería el efector en esta vía común: kinesina 1 podría modular la actividad de CCDC28B regulando su localización subcelular. La ausencia de kinesina 1 podría resultar en más CCDC28B disponible para cumplir su actividad ciliar y esa ser la causa de observar cilias más largas en esta condición. En el trabajo que presentamos en este capítulo nos propusimos testear esta hipótesis.

RESULTADOS

5.1 Kinesina 1 y CCDC28B operan en una vía común para regular las cilias

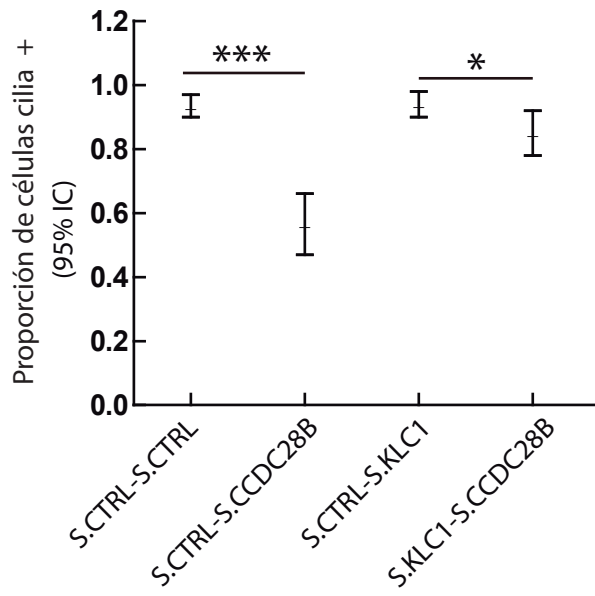
En primer lugar decidimos realizar ensayos de interacción génica para evaluar la posibilidad de que CCDC28B y la kinesina 1 estén actuando en forma conjunta para regular las cilias. Los ensayos de interacción génica apuntan a determinar si dos genes actúan sobre un proceso en forma conjunta (como parte de una misma vía) o lo afectan a través de vías/mecanismos independientes. Cuando los dos genes en cuestión tienen un efecto similar sobre el proceso en estudio (por ejemplo cuando la depleción de ambos genes resulta en un acortamiento de cilias) modular los niveles de ambos genes en conjunto puede resultar en efectos sinérgicos que evidencien una interacción. En este caso depletar CCDC28B o kinesina 1 resulta en fenotipos ciliares opuestos. En este contexto, si las dos proteínas actúan en procesos independientes relacionados a la regulación del largo de cilias esperaríamos que la depleción de ambas en simultáneo generase una compensación en el fenotipo. Si ambas proteínas participan en una misma cascada sin embargo, esperaríamos que el fenotipo ciliar final causado por la depleción conjunta de CCDC28B y kinesina 1 fuera el fenotipo correspondiente al de la

proteína que actúa río abajo en esta vía común: según nuestra hipótesis, acortamiento de cilias por falta de CCDC28B.

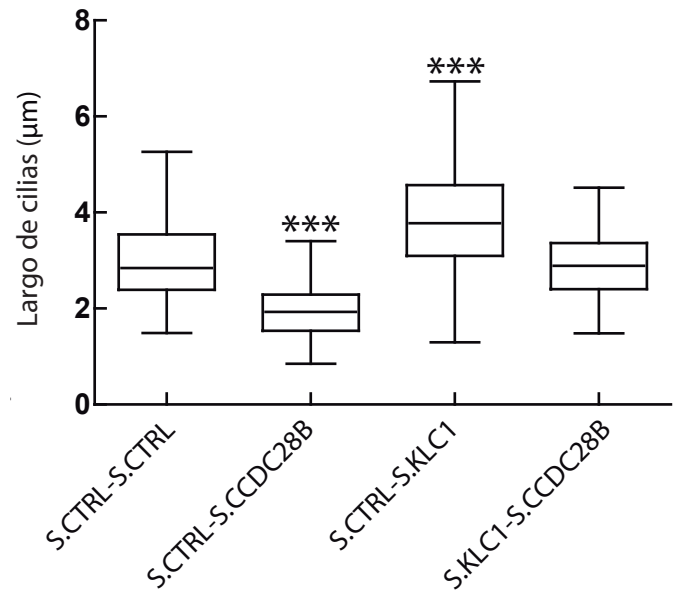
Elegimos realizar el análisis depletando KLC1 dado que siempre dio un fenotipo más robusto que depletar KIF5B (posiblemente debido al solapamiento funcional entre las distintas cadenas pesadas como mencionábamos). Transfectamos células hTERT-RPE con nuestros oligos de ARNi para CCDC28B y KLC1 solos o en combinación, manteniendo la cantidad de oligo de ARN constante al sumarle un oligo control y medimos la proporción de células cilia positivas y el largo de las cilias (**Figura 23A**). La proporción de células cilia positivas solo se vió reducida con la depleción de CCDC28B y este fenotipo fue parcialmente rescatado con la depleción simultánea de KLC1. En este punto es importante tener en cuenta que la depleción de CCDC28B resulta en cilias cortas y por lo tanto una reducción en la proporción de células cilia positivas no necesariamente indica un defecto en ciliogénesis o la capacidad de ciliar, ya que células con cilias extremadamente cortas no van a ser consideradas positivas. Con respecto al largo de las cilias, las células transfectadas solo con el S.CCDC28B o solo con S.KLC1 presentaron cilias más cortas y más largas que las control respectivamente como esperábamos (S.CCDC28B: 1,9 μm ; S.KLC1: 3,8 μm ; células control: 2,9 μm ; **Figura 23B**). Cuando co-transfectamos ambos ARNi el largo de las cilias fue comparable al de las células control (2,9 μm ; **Figura 23B**). Este resultado no nos permitió concluir si simplemente estábamos observando el efecto aditivo de perturbar dos vías independientes de regulación del largo de las cilias o si el efecto observado era consecuencia de la interacción de ambas proteínas en una misma vía. En este último caso el remanente de cada proteína por trabajar con depleciones parciales de las proteínas y no con mutantes nulos completos, podría estar enmascarando el resultado. Por este motivo decidimos repetir este ensayo esta vez sobre un fondo genético nulo para alguno de nuestros genes de interés.

Figura 23| A. La proporción de células cilia-positivas se vió significativamente reducida con la depleción de CCDC28B pero no de KLC1 (test de hipótesis de proporciones). La co-transfección con el oligo de ARN para KLC1 rescata el fenotipo de las células depletadas de CCDC28B. **B.** Células depletadas de CCDC28B (118 ciliadas analizadas) y de KLC1 (155 ciliadas analizadas) muestran ciliadas significativamente más cortas y más largas respectivamente. Las ciliadas fueron del largo control en células co-transfectadas con ambos oligos de ARN (115 ciliadas medidas). Test estadístico: ANOVA unidireccional; **P < 0.001. La cantidad de oligo transfectada por condición se mantuvo constante usando un oligo de ARN control.

A.



B.



Dado el amplio rol de la kinesina 1 en el transporte intracelular favorecimos la posibilidad de que fuera CCDC28B el efector que actuara río abajo en una posible vía común de regulación del largo de las cilias. A su vez pensamos que anular CCDC28B en lugar de kinesina 1 podría minimizar las chances de observar efectos pleiotrópicos asociados a eliminar uno de los principales motores moleculares de la célula facilitando por lo tanto la interpretación de los resultados.

Como ya mostramos, no nos fue posible obtener una línea celular completamente carente de CCDC28B. Sin embargo, el Clon B1 no produce CCDC28B salvaje y presenta un fenotipo ciliar marcado. Repetimos por lo tanto el experimento de interacción con KLC1 esta vez utilizando el Clon B1. La depleción de KLC1 o KIF5B (las tres cadenas pesadas) en esta línea resultó en un rescate parcial en la proporción de células cilia positivas en el Clon B1 (**Figura 24**). Debido a que este efecto se podría deber a la actividad del remanente de CCDC28B presente en el Clon B1, decidimos disminuir este remanente con nuestro ARNi para CCDC28B. La depleción de este remanente de CCDC28B con ARNi eliminó completamente el rescate observado con la depleción de KLC1 y también, aunque en menor medida, el observado depletando las KIFs (**Figura 24**). En contraste, depletando KIF7, lo cual normalmente produce alargamiento de las cilias al promover la depolimerización de microtúbulos dentro de la cilia (189), y que por lo tanto actuaría de manera independiente a CCDC28B, resultó en un rescate significativo y mayor en la proporción de células cilia positivas comparado al de la kinesina 1, y fue independiente al tratamiento con ARNi para CCDC28B (**Figura 24**). Por lo tanto, nuestros resultados indican que la kinesina 1 requiere de CCDC28B para regular el largo de las cilias.

Figura 24 | Experimentos de interacción génica usando el Clon B1. La depleción de KLC1 y KIF5ABC resulta en un rescate parcial y moderado (comparado con la depleción de KIF7) que se elimina o disminuye con la depleción de CCDC28B para KLC1 y KIF5B respectivamente. La depleción de KIF7 rescata el fenotipo ciliar irrespectivamente de la presencia de CCDC28B. El experimento mostrado es representativo de cuatro experimentos independientes. El número total de células medidas para este experimento fue 89 para la condición CTRL.-CTRL., 96 CTRL.-CCDC28B, 91 CTRL.-KLC1, 86 KLC1.-CCDC28B, 84 CTRL.-KIF5ABC, 86 KIF5ABC-CCDC28B, 84 CTRL.-KIF7, 104 KIF7.-CCDC28B. Test estadístico: test de hipótesis de proporciones. * Indica la comparación con el Clon B1 transfectado con los oligos control (S.CTRL-S.CTRL). ♦ Indica la comparación con el Clon B1 transfectado con el oligo control y el oligo de CCDC28B (S.CTRL-S.CCDC28B). */♦P < 0.05; **P < 0.01; ***/♦♦♦P < 0.001. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

5.2 La Kinesina 1 regula la distribución subcelular de CCDC28B

Nuestros resultados previos sugieren que kinesina 1 podría regular la actividad de CCDC28B en el control del largo de las cilia. Por tratarse de un motor molecular asociado a microtúbulos, hipotetizamos que podría hacerlo afectando su localización subcelular. Usando nuestro anticuerpo de ratón policlonal anti-CCDC28B observamos señal en la región pericentriolar en la base de la cilia, como fue previamente reportado (97), pero también observamos un patrón de señal citoplasmática difuso y señal dentro del compartimiento nuclear (**Figura 25A**). Luego evaluamos la localización de CCDC28B en células depletadas de KLC1. No observamos cambios notorios en la localización pericentriolar. Sin embargo, aunque variable entre células, si observamos un inesperado aumento en la señal nuclear de CCDC28B luego de depletar KLC1 (**Figura 25B**). Depletando las KIF5s obtuvimos resultados similares (**Figura 26**). Dada la variabilidad entre células que observamos en estas inmunofluorescencias, decidimos complementar el análisis realizando fraccionamiento subcelular y western blot comparando la relación de CCDC28B en el núcleo/CCDC28B total entre células control y células depletadas de KLC1. En las células depletadas de KLC1 nuevamente observamos un aumento en la señal nuclear de CCDC28B (**Figura 25C**). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la kinesina podría estar involucrada en regular la distribución subcelular de CCDC28B.

Figura 25 | KLC1 juega un rol regulando la distribución sub-celular de CCDC28B.

A. Análisis por microscopía confocal de la localización endógena de CCDC28B (verde) en células hTERT-RPE mostrando localización de la proteína en el citoplasma, la región pericentriolar/cuerpo basal (las flechas muestran ejemplos en células ciliadas y no ciliadas, mayor magnificación se muestra en los cuadros amarillos) y en el núcleo (círculo). El cuerpo basal y el axonema de las ciliadas se tiñeron con anti- γ tubulina y anti- α -tubulina acetilada respectivamente (rojo). **B.** La señal de CCDC28B (verde) en el núcleo aumenta con la delección de KLC1 (S.KLC1; panel inferior) comparado con las células control (S.CTRL; panel superior). En ambos (A, B) se usó DAPI para marcar el núcleo. Las barras de escala corresponden a 10 μ m. **C.** Ensayo de fraccionamiento subcelular usando células hTERT-RPE transfectadas con un plásmido expresando Myc-CCDC28B junto con un oligo de ARN control (S.CTRL) o con el oligo de ARN de KLC1 (S.KLC1). CCDC28B se presenta en la fracción citosólica y en la nuclear en células control y se acumula en la fracción nuclear en células depletadas de KLC1 (S.KLC1). La membrana se cortó en la banda de 35 KDa que indica el marcador de peso. El blot incubado con el anticuerpo anti-Myc para visualizar CCDC28B fue “stripped” e incubado con un anticuerpo anti-Histona. La gráfica muestra la relación núcleo/total (núcleo + citoplasma) obtenido de cuantificar por densitometría las bandas del western blot. α -tubulina fue utilizado para normalizar la intensidad de CCDC28B en el núcleo y compensar por la contaminación de citosol en la fracción nuclear.

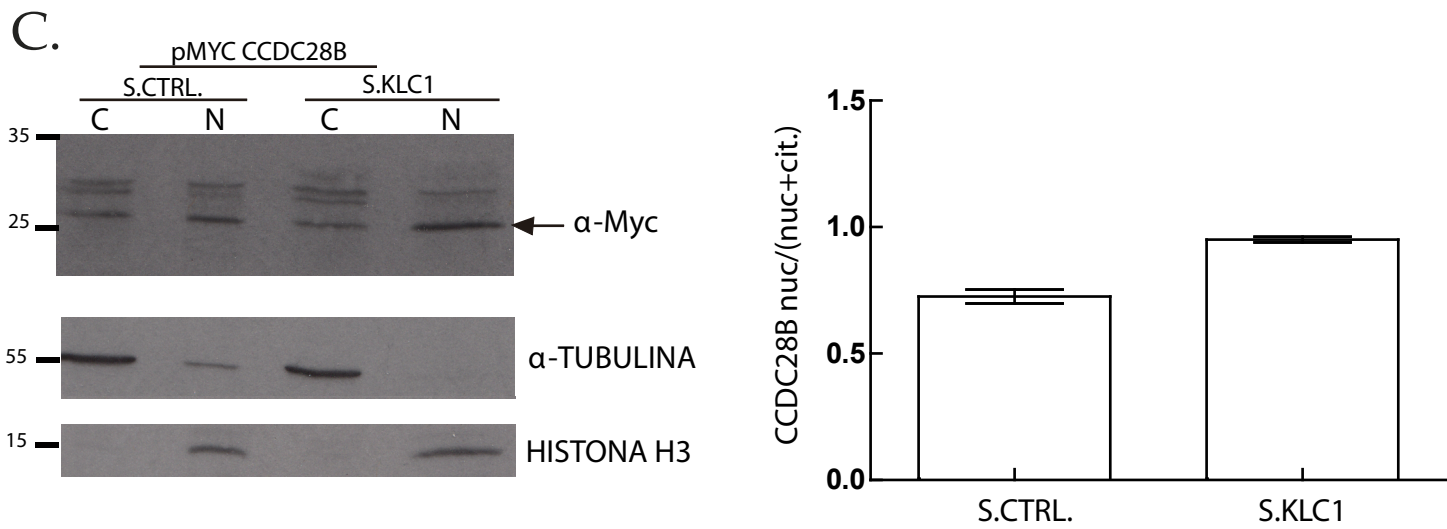
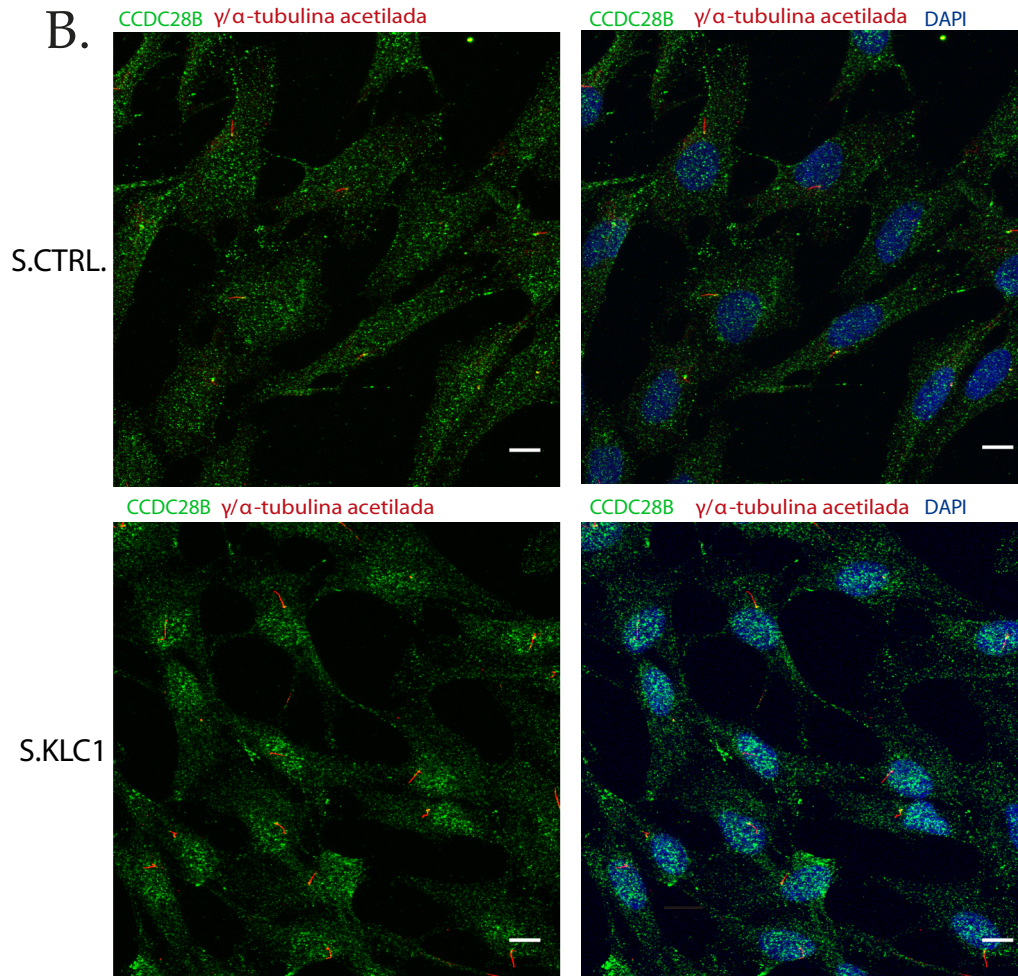
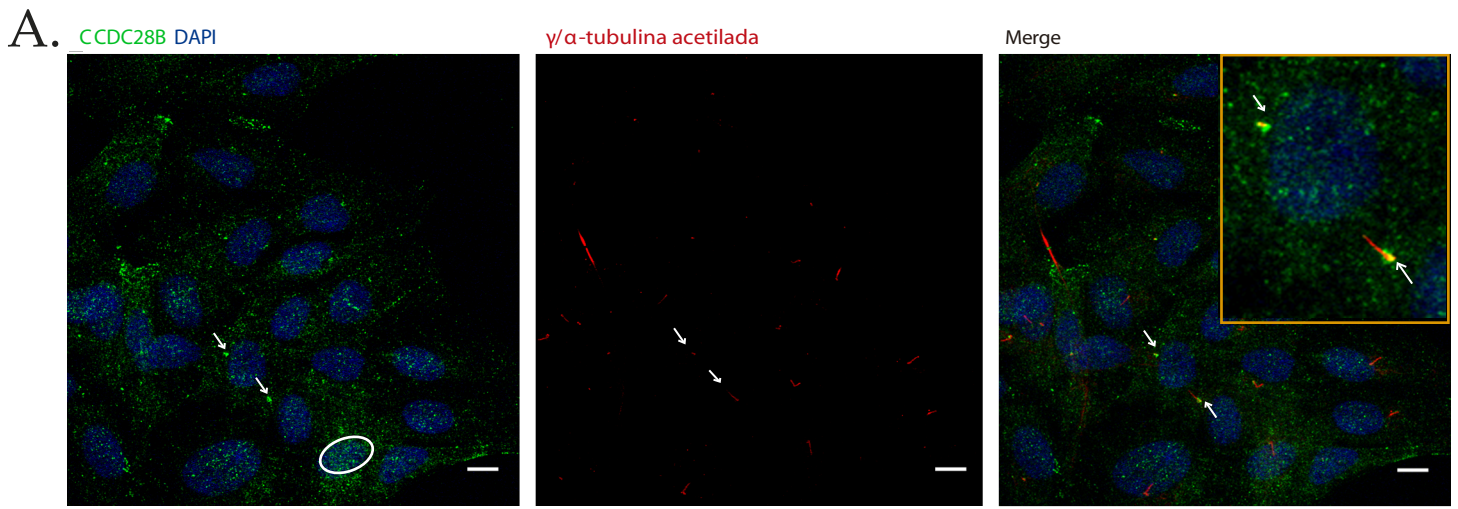
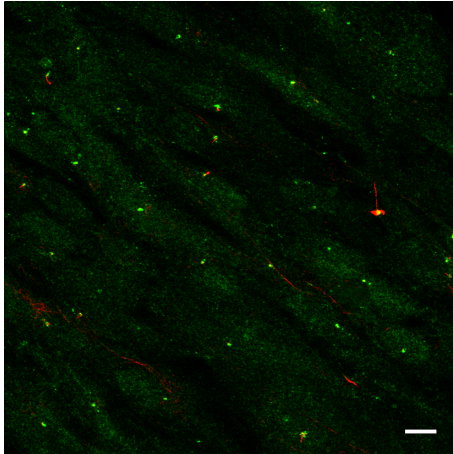


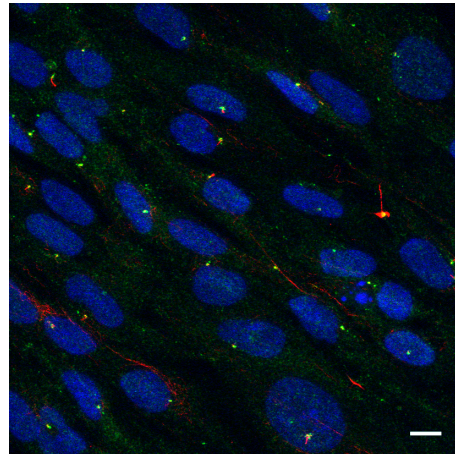
Figura 26 | Evaluación de la acumulación nuclear de CCDC28B en células depletadas de KIF5. CCDC28B se acumula en el núcleo en células depletadas de KIF5 (depletando las 3 KIF5s: KIF5A+B+C). Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

S.CTRL.

CCDC28B γ/α -tubulina acetilada

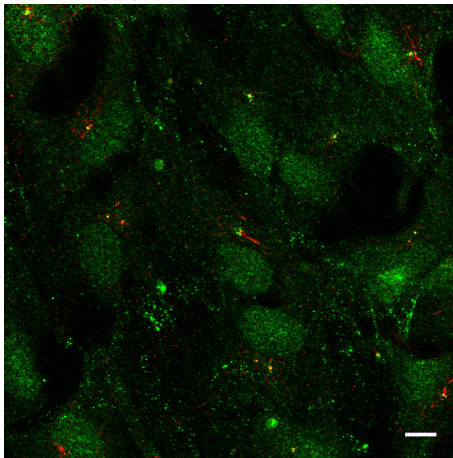


CCDC28B γ/α -tubulina acetilada DAPI

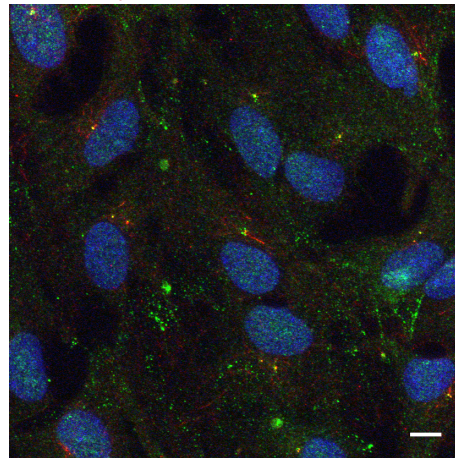


S.KIF5A+B+C

CCDC28B γ/α -tubulina acetilada



CCDC28B γ/α -tubulina acetilada DAPI



5.3 La delección de una señal NLS predicha afecta la función de *ccdc28b* de pez cebra

Los resultados anteriores sugerían por lo tanto que la entrada al núcleo de CCDC28B pudiera ser relevante para su rol en las cilias. Decidimos evaluar esta posibilidad en mayor profundidad. En primer lugar estudiamos si la señal predicha de localización nuclear (NLS) que abarca de los residuos 4 al 10 de CCDC28B era funcional (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLSstradamus/http://elm.eu.org>; **Figura 27A**). En este contexto resultó importante contar con una construcción para expresar CCDC28B con una delección de los residuos 4 al 10 ($\Delta 4-10$) generada previamente por la Dra. Magdalena Cárdenas. Primero determinamos por co-inmunoprecipitación que la mutante NLS de CCDC28B mantiene su capacidad de interactuar con KLC1 (**Figura 27B**). Luego intentamos determinar si la delección de la NLS afectaba la localización de CCDC28B por inmunofluorescencia. Luego de transfectar células hTERT-RPE con nuestra construcción para sobre-expresar CCDC28B en sus formas salvaje (wild type o wt) y mutante NLS (NLS mut) observamos una señal homogénea, tanto citoplasmática como nuclear dificultando el análisis. Este resultado se debe probablemente a los altos niveles de CCDC28B alcanzados con la sobre-expresión sumado a que CCDC28B tiene un tamaño que le permitiría ingresar al núcleo por difusión (aproximadamente 25 KDa). Por lo tanto, al estar sobre-expresada probablemente no requiera la señal NLS para ingresar al núcleo. Dada esta dificultad, probamos evaluar los niveles de CCDC28B en citosol y núcleo por una técnica más sensible como el western blot. Transfectamos células con CCDC28B wt y CCDC28B NLS mut para luego realizar fraccionamiento celular seguido de western blot. Con la sobre-expresión, observamos tanto la proteína salvaje como la mutante NLS en el citoplasma y en el compartimiento nuclear, al igual que observamos por inmunofluorescencia. Sin embargo los niveles de la mutante NLS en el núcleo se vieron reducidos comparados a la salvaje, lo cual sugiere que el motivo NLS sería funcional (**Figura 27C**). El objetivo de esta construcción era poder realizar ensayos de rescate para evaluar funcionalidad. Además del modelo de células hTERT-RPE contábamos también con la posibilidad de realizar ensayos de rescate en el modelo de pez cebra donde originalmente se caracterizó la función de *ccdc28b* (138). Esta NLS es conservada entre humanos y pez cebra (**Figura**

27A) y la construcción para expresar la proteína con la $\Delta 4-10$ en este modelo también había sido generada por la Dra. Cárdenas. La mutante ccdc28b NLS de pez cebra expresada en células humanas hTERT-RPE también mostró una reducción en su entrada al núcleo por fraccionamiento celular (**Figura 27D**).

Figura 27 | Evaluación de la NLS de CCDC28B. **A.** Se muestra la secuencia de la proteína de CCDC28B humana y de pez cebra indicándose la posición predicha de la señal de localización nuclear (NLS). **B.** Ensayo de co-inmunoprecipitación mostrando que la mutante NLS humana de CCDC28B también puede ser inmunoprecipitada por Myc-KLC1. **C.** Fraccionamiento celular de células transfectadas con CCDC28B salvaje o mutante NLS ($\Delta 4-10$). Las membranas se cortaron entre 35 y 40 KDa en C y A 35 KDa en D. La parte de menor peso molecular se incubó con el anticuerpo de CCDC28B y luego se “strippeo” e incubó con anticuerpo anti-histona. **C y D.** Cuantificación de la relación núcleo/total (núcleo+citoplasma) usando los blots mostrados, normalizados usando la tubulina para reducir el impacto de la contaminación de la fracción nuclear con la fracción citosólica.

A.

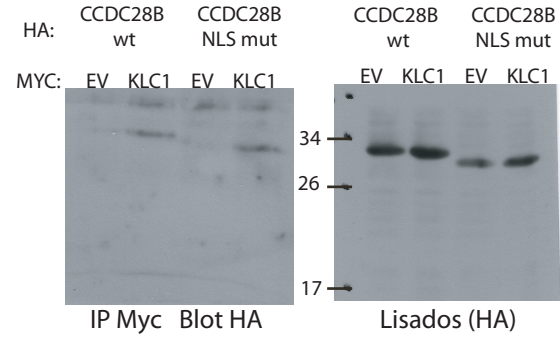
Homo sapiens CCDC28B
NP_077272

NLS
MDDK K K K R S P K P C L A Q P A Q A P G T L R R V P V P T S H S G S L A L G L P H L P S P K Q R A K F K R V G K E K C R P V L A G G G S
G S A G T P L Q H S F L T E V T D V Y E M E G L L N L L N D F H S G R L Q A F G K E C S F E Q L E H V R E M Q E K L A R L H F S L D V C G
E E E D E E E E D G V T E G L P E E Q K K T M A D R N L D Q L L S N L E D L S N S I Q K L H L A E N A E P E E Q S A A

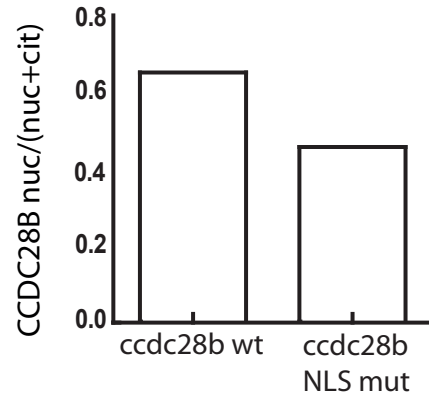
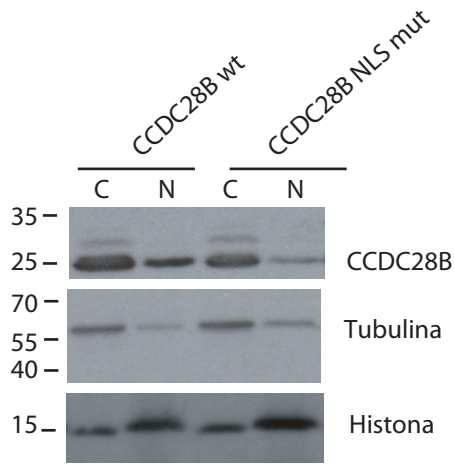
Danio rerio ccdc28b
NP_077272

NLS
M E D K R K R S P K V S L P Q P P P P I N P R K L T V L P A S K S A T F S L G L P Q P P S P K P R G K Y K R S V G A M G P S K E A L A V
P V V P P K N T R P H R E K P R A P Q P A G P S R V S Q S S S P L Q H T F L T D V S D V R E M E G L L N L L N D F H S G K L Q A F G K V C
S F E Q L E H V R E M Q E R L A R L H F S L D S H V E E L S E D Q R K N A S D R N L E H L L S N L E E L S T S I Q K L H L A E N Q D L P K T
S N T

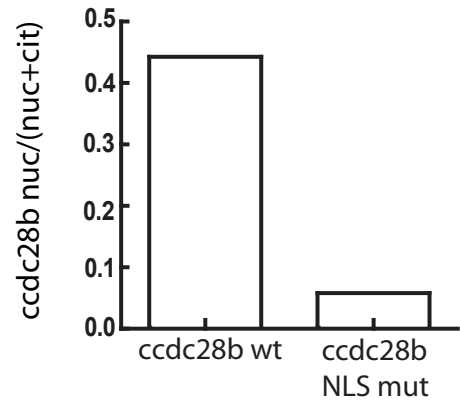
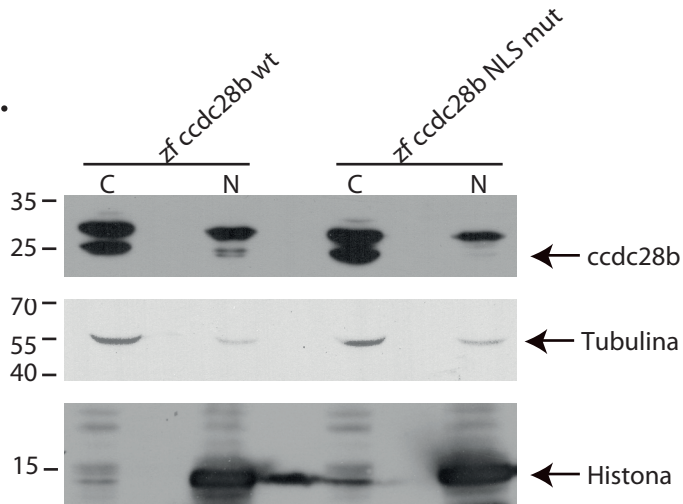
B.



C.



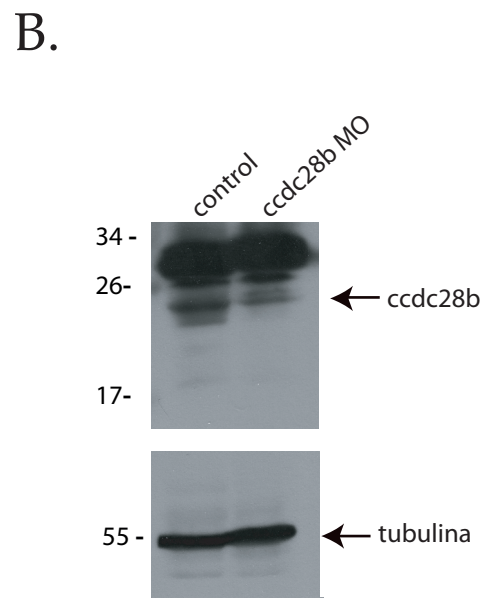
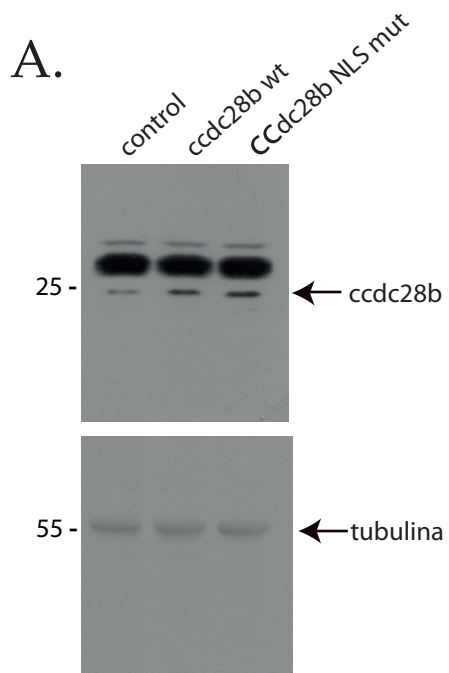
D.



A continuación nos enfocamos en analizar la relevancia funcional de este motivo NLS de CCDC28B. En primer lugar intentamos los rescates en células humanas (hTERT-RPE y Clon B1). Sin embargo, cuando transfectamos CCDC28B wt humana y mutante NLS repetidamente observamos que los niveles de esta última eran menores a los de la proteína salvaje (por ejemplo ver los lisados de la **(Figura 26B)**). Dado este resultado decidimos no usar estas construcciones para rescatar el fenotipo ciliar del Clon B1 ya que un rescate reducido de la mutante NLS podría deberse a que tiene su función reducida o simplemente a que se expresa menos que la salvaje.

En contraste, *ccdc28b* wt y mutante NLS de pez cebra se expresaron en niveles comparables cuando inyectamos los ARNm directamente en los embriones de pez cebra **(Figura 28A)**. Por lo tanto decidimos continuar solo con el modelo de pez cebra para evaluar la funcionalidad de este motivo NLS conservado. El uso de pez cebra como organismo modelo para el estudio de genes asociados a ciliopatías presenta múltiples ventajas que se detallan en la sección materiales y métodos donde también describimos las herramientas moleculares utilizadas para manipular la expresión génica en estos organismos.

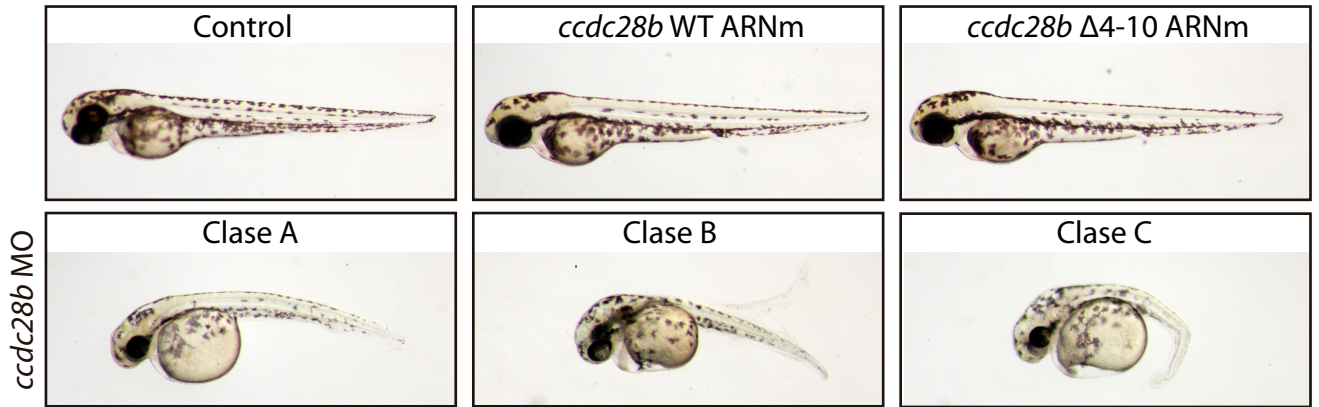
Figura 28 | **A.** ARNm de *ccdc28b* de pez cebra salvaje o mutante NLS fueron inyectados en embriones de pez cebra de 2-4 células y se extrajo proteína total a las 48 horas post inyección (un conjunto de 30 embriones fueron utilizados para cada condición). **B.** Los niveles de *ccdc28b* se ven reducidos en embriones inyectados con el morfolino (MO).



Por resultados previos de nuestro laboratorio sabíamos que la depleción de *ccdc28b* en pez cebra con morfolinós (MO, **Figura 28B**) resulta en defectos ciliares en diferentes tejidos y los embriones de pez afectados se caracterizan por presentar cuerpo significativamente más corto y curvo, tamaño de ojos reducido, alteraciones craniofaciales y defectos en la pigmentación (**Figura 29A**). Estos fenotipos son característicos de mutantes para proteínas ciliares y previamente nuestro grupo demostró que son específicos de *ccdc28b* ya que pueden ser rescatados co-inyectando ARNm *ccdc28b* wild type (wt) de pez cebra (189). A su vez, y dada la disponibilidad de nuevas tecnologías en el laboratorio, confirmamos la especificidad del fenotipo utilizando edición genómica en embriones de pez cebra introduciendo mutaciones en el exón 2 de *ccdc28b* por CRISPR/Cas9. Estos experimentos fueron llevados a cabo por la Dra. Paola Lepanto en el laboratorio. Se diseñaron y testearon cuatro ARN guías (ARNg) diferentes tanto solos como en combinación y observamos el fenotipo a las 48 horas post fecundación en la F0. La inyección de ARNg individuales no produce grandes cambios fenotípicos, sin embargo inyectarlos en combinación de a dos resultó en un rango de fenotipos que, como se esperaba, fueron muy variables en su penetrancia en la F0. De todas formas, los diferentes fenotipos que observamos fueron comparables a los que observamos con los morfolinós, lo cual nos permitió validar su especificidad (**Figura 30**).

Figura 29 | **A.** Se muestran embriones de pez cebra de 48 horas controles e inyectados. Mientras que la inyección con ARNm de *ccdc28b* salvaje o mutante no resulta en alteraciones del fenotipo, la inyección del MO de *ccdc28b* resulta en un rango de fenotipos que van de suaves a severos correspondiéndose con Clase A a C respectivamente. Se muestran imágenes representativas de cada clase. **B.** La severidad del fenotipo externo en las diferentes clases se correlaciona con un aumento en la perturbación de tejidos ciliares. Se muestran imágenes de la vesícula ótica y de la fosa nasal.

A.



B.

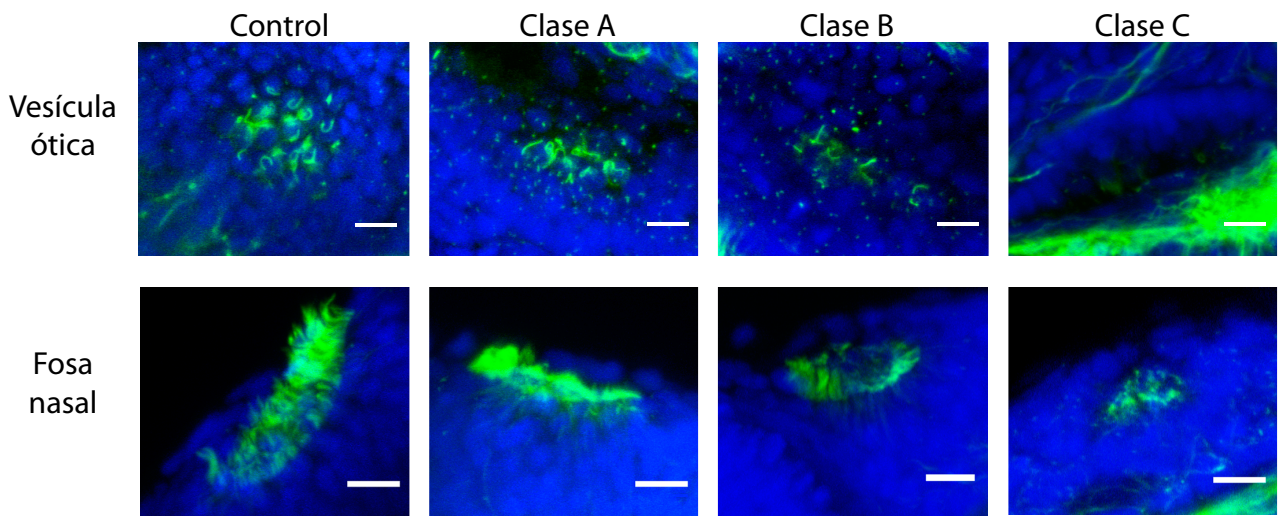
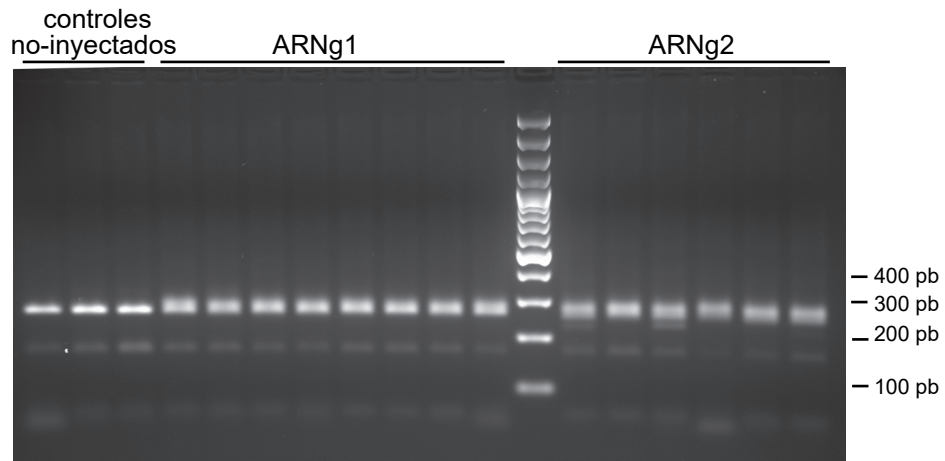
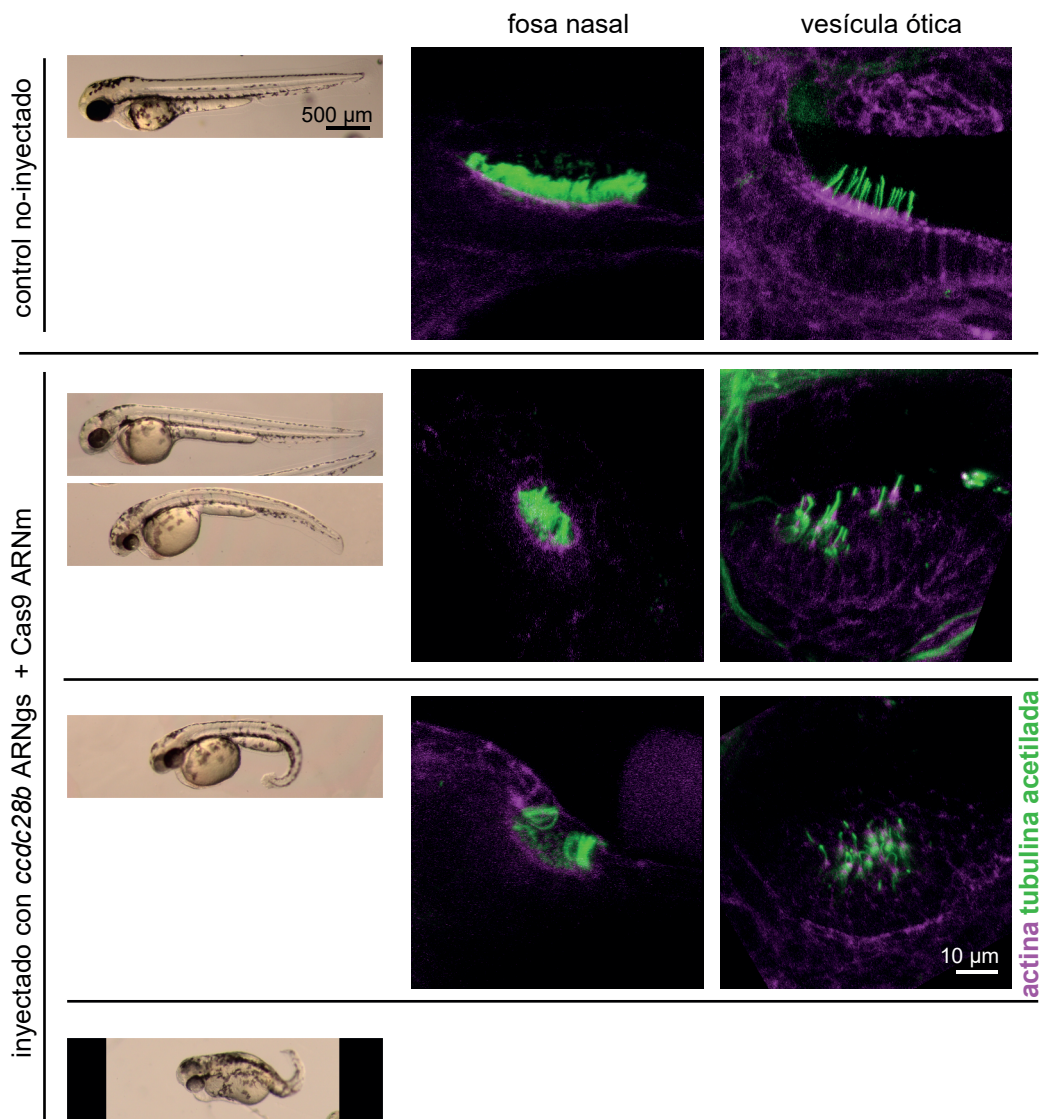


Figura 30 | F0 pez cebra *ccdc28b* CRISPR/Cas9. **A.** Análisis por PCR de ADN de embriones individuales inyectados con dos guías de ARN para *ccdc28b*. En ambos casos el PCR resulta compatible con que los ARN guías estén produciendo cambios genómicos en el locus. **B.** La edición genómica de *ccdc28b* con CRISPR/Cas9 genera embriones con fenotipo similar a los observados en embriones inyectados con el morfolino de *ccdc28b*. La columna de la izquierda muestran imágenes poco magnificadas de la morfología general del embrión inyectados con la combinación de los ARN guías y del ARNm de la *zf-nCas9n* a las 48 horas post inyección. Embriones con fenotipo similar se fijaron para analizar el aspecto de las cilias en diferentes órganos por inmunofluorescencia. La actina y el axonema de la cilia fueron marcados con faloidina conjugada a TMR (magenta) y anticuerpo anti-tubulina acetilada respectivamente (verde). Como en los embriones inyectados con morfolino, embriones inyectados con ARN guías para *ccdc28b* muestran perturbaciones en sus tejidos ciliares.

A.



B.



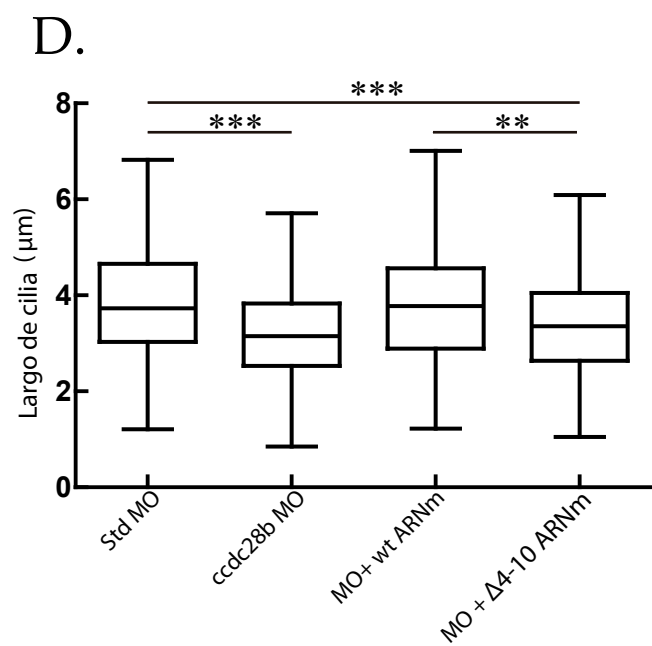
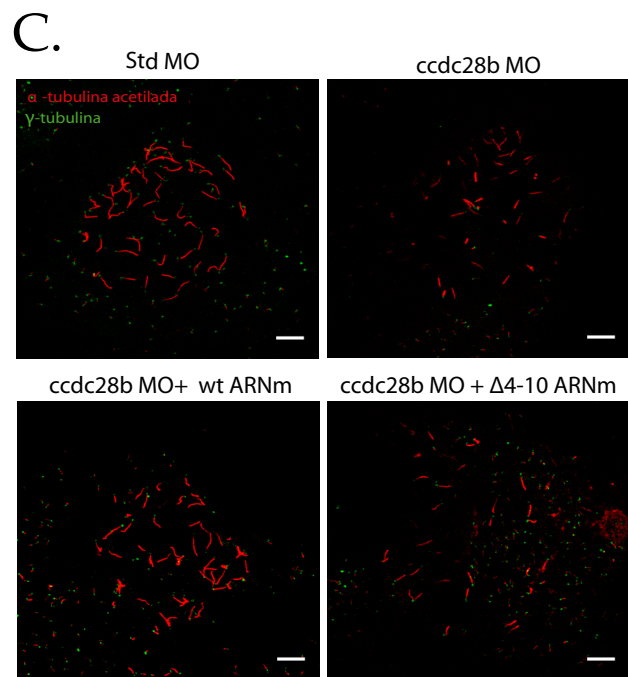
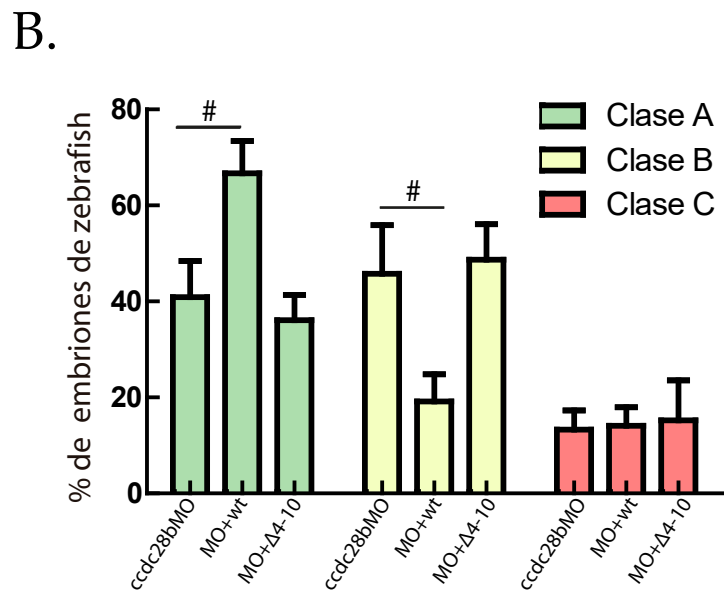
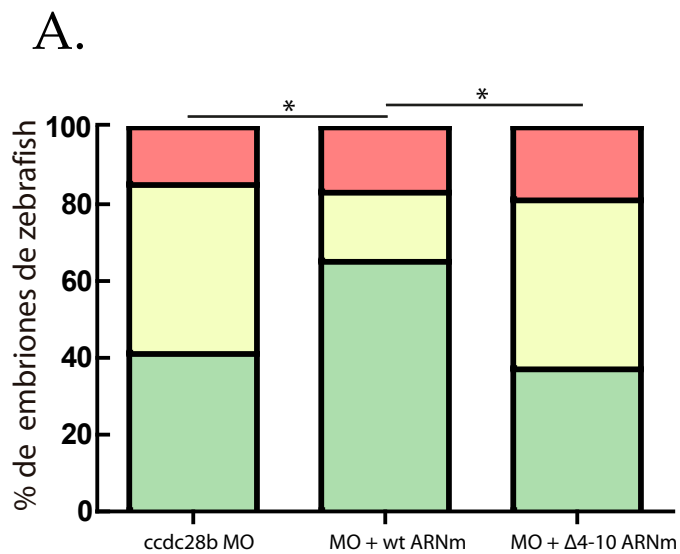
A continuación testamos si la mutante *ccdc28b* $\Delta 4-10$ (NLS) era capaz de rescatar el fenotipo de los embriones morfantos de *ccdc28b*. Para esto co-inyectamos embriones de pez cebra en estadio de 2-4 células con nuestro morfolino previamente validado solo o en combinación con el ARNm *ccdc28b* wt o mutante *ccdc28b* $\Delta 4-10$ (NLS). Cabe destacar que el morfolino utilizado actúa bloqueando el splicing al unirse a una unión exón-intrón. Por lo tanto, el ARNm maduro inyectado para expresar *ccdc28b* (wt o mutante) no es blanco del mismo. Un morfolino control y los ARNm individuales fueron inyectados solos como control. Para cada condición, dos investigadores independientes (uno de ellos ciego al experimento), clasificó los embriones morfantos en 3 categorías diferentes de acuerdo a su fenotipo externo: clase A comprendió el rango de embriones caracterizados por presentar leve acortamiento del eje axial del cuerpo, con poca curvatura hasta los que tienen aspecto de wt; los embriones clase B presentaron un acortamiento pronunciado del cuerpo, curvatura ventral, defectos en la pigmentación y craniofaciales y los embriones clase C se caracterizaron por presentar acortamiento y curvatura severa del cuerpo y pronunciados defectos craniofaciales y en la pigmentación. Por inmunofluorescencia de embriones teñidos con α -tubulina acetilada observamos que la severidad de las clases se correlacionó con el grado de defectos en tejidos ciliares, en particular mirando la vesícula ótica y la fosa nasal (**Figura 29**), similar a lo que observamos con nuestros mutantes hechos por CRISPR. Para evaluar el efecto del rescate cuantificamos las clases de los distintos fenotipos en 5 experimentos independientes. Para cada experimento inyectamos embriones obtenidos de una misma hembra para generar todas las condiciones experimentales que fueron analizadas (MO solo, MO+wt ARNm and MO+ $\Delta 4-10$ ARNm) y todos los controles necesarios (no inyectados, solo con ARN wt y solo con $\Delta 4-10$ ARNm). De esta forma eliminamos la variabilidad que se hubiera introducido de utilizar embriones provenientes de distintas hembras. Sin embargo, esta aproximación presentó el inconveniente de poder evaluar un número relativamente bajo de embriones por condición. Por lo tanto, primero analizamos los experimentos individuales y luego juntamos todos los datos y comparamos la distribución general de clases de fenotipos entre las diferentes condiciones (**Figura 31A**). El análisis mostró que la distribución de clases entre el MO

+ ARNm wt fue significativamente diferente de la observada para el MO solo o el MO + $\Delta 4-10$ ARNm. El MO *ccdc28b* solo resultó en 41% clase A, 46% clase B y 13% clase C. Co-inyectando el MO con el ARNm de *ccdc28b* wt aumentó el porcentaje de los embriones levemente afectados clase A (69%) a la vez que se redujo la clase B más severa a 19% (χ^2 test, $P=0.005$; **Figura 31A**). En cambio, co-inyectar $\Delta 4-10$ *ccdc28b* ARNm no rescató el fenotipo de los morfantes resultando en una distribución comparable a la del MO solo con 36% clase A, 49% clase B y 15% clase C (χ^2 test, $P=0,87$; **Figura 31A**) mientras que sí fue significativamente diferente del rescate con el wt (χ^2 test, $P=0,007$; **Figura 31A**). Para caracterizar este efecto en mayor profundidad comparamos el porcentaje medio de embriones para cada clase en cada condición experimental (**Figura 31B**). Este análisis confirmó que la diferencia entre el MO solo y el MO + ARN wt fue causado por un incremento en la clase A y una reducción en la clase B en la condición de rescate (Wilcoxon rank test, $P=0,06$ and $P=0.05$ respectivamente; asumiendo distribución normal, t-test pareado, $P=0,02$ en ambos casos).

Estos resultados apoyan datos previos obtenidos por la Dra. Magdalena Cárdenas mostrando que el mutante *ccdc28b* $\Delta 4-10$ presenta una capacidad disminuída de rescatar un defecto específico de cilias en pez cebra. Resumidamente, las cilias pueden ser visualizadas y evaluadas en distintintos tejidos del pez cebra. Para la cuantificación de largo, se utiliza generalmente la medición de cilias en la vesícula de Kuppfer's (VK), un órgano transitorio (presente entre los estadios de 4 y 15 somites) que cumple un rol crítico en el establecimiento del eje de simetría izquierda-derecha (192). Se procesaron embriones en el estadio de 12 somites para visualizar cilias en la VK por microscopía confocal, utilizando anticuerpos contra tubulina acetilada y γ -tubulin (**Figura 31C**). Se midieron más de 250 cilias por cada condición comparando controles (inyectados con MO estándar), MO *ccdc28b*, y MO *ccdc28b* co-inyectado con wt o con ARNm $\Delta 4-10$ *ccdc28b*. Como ya se había reportado por nuestro grupo (134), el MO *ccdc28b* resultó en cilias significativamente más cortas con una mediana de 3,1 μm comparadas con 3,7 μm en controles ($P=4,10\text{E-}13$). Co-inyectar el ARNm wt rescató el fenotipo de los morfantes restaurando el largo de las cilias al valor de las cilias control con una mediana de 3,8 μm ($P=0,339$). En cambio el

largo de las cilias de los embriones morfantes co-inyectados con *ccdc28b* Δ 4–10 fue significativamente diferente a los controles (una mediana de 3,4 μ m; $P = 4,18E-05$) y a los embriones inyectados con *ccdc28b* mRNA wt ($P = 0,0051$) (**Figura 31D**). El conjunto de nuestros resultados por lo tanto indica que los residuos 4 a 10 de CCDC28B, que comprenden una señal de localización nuclear, son importantes para mantener la función de *ccdc28b* en pez cebra.

Figura 31 | Un mutante $\Delta 4-10$ *ccdc28b* no rescata el fenotipo de los morfantes en pez cebra. **A.** Se compara la distribución de clases luego de la inyección con el morfolino solo (*ccdc28b* MO) y el morfolino co-inyectado con ARNm de *ccdc28b* salvaje o mutante $\Delta 4-10$. Se juntaron datos de 5 inyecciones distintas alcanzando un n de embriones =128 del MO *ccdc28b*, 65 del MO *ccdc28b* + ARN salvaje y 63 del MO *ccdc28b* + $\Delta 4-10$ *ccdc28b*. Solo se observó rescate del fenotipo con la inyección del ARNm salvaje pero no con el mutante $\Delta 4-10$. Test estadístico: χ^2 ; * $P < 0,01$. **B.** El porcentaje de embriones de cada clase fenotípica fue calculado de 5 experimentos diferentes. Se grafican la media y el SEM (barras). La diferencia entre las condiciones (#) se analizaron usando el test de ranking de Wilcoxon ($P = 0,06$ para clase A; $P = 0,05$ para clase B) y test-t pareado asumiendo distribución normal ($P = 0,02$ para ambas clases A y B). **C.** Cilia y cuerpo basal en la Vesícula de Kupffer se visualizaron con anti-tubulina acetilada (rojo) y anti γ -tubulina (verde) respectivamente. Se muestran imágenes representativas de embriones control, MO *ccdc28b* y MO *ccdc28b* co-inyectados con ARNm salvaje o $\Delta 4-10$. **D.** El largo de las cilia fue medido usando Image J (355 cilia del MO control, 336 para el MO *ccdc28b*, 276 del MO +ARNm salvaje y 266 del MO *ccdc28b* + ARNm $\Delta 4-10$). Las cilia son significativamente más cortas en los embriones inyectados con MO *ccdc28b* y su largo es rescatado con la inyección del ARNm de *ccdc28b* salvaje pero no con el ARNm $\Delta 4-10$ *ccdc28b*. Test estadístico: Kruskal Wallis. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Las barras de escala corresponden a 10 μm .



CAPÍTULO VI

EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN CCDC28B- ACTINA-CILIA

En el transcurso de nuestros experimentos para determinar el efecto sobre el largo de las cilias observamos que la depleción de CCDC28B y de KLC1 en hTERT-RPE sistemáticamente resultaba en cambios en la forma de las células. Los cambios de forma en las células eucariotas están principalmente regulados por la dinámica del citoesqueleto de actina y éste, como mencionamos en la introducción, cumple un rol en la regulación de la ciliogénesis y el largo de las cilias aunque el mecanismo no esté completamente elucidado. En líneas generales, lo que se sabe es que la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés actúan como un regulador negativo de ciliogénesis, inhibiendo la formación o extensión de las cilias, mientras que la depolimerización de la actina genera el efecto contrario (88). Dado esto, hipotetizamos que CCDC28B directa o indirectamente a través de sus interactores, podría estar modulando el esqueleto de actina y esta ser la causa del efecto a nivel de la cilia.

En el trabajo presentado en este capítulo analizamos el fenotipo de actina en nuestros mutantes de interés y comenzamos a evaluar su relación con el fenotipo ciliar en el mutante de CCDC28B.

RESULTADOS

El defecto de las cilias en nuestros mutantes de interés se correlaciona con cambios en el esqueleto de actina.

Cuando realizamos los experimentos de depleción de CCDC28B y KLC1 mediante stealths en células hTERT-RPE, las células depletadas de KLC1 presentan forma alargada y ocupan menor área en comparación con las control (**Figura 32C**), mientras que las células depletadas de CCDC28B ocupan mayor superficie (**Figura 32B**).

Figura 32 | Células depletadas de CCDC28B y KLC1 difieren en su forma de las células control. Células hTERT-RPE transfectadas con stealth control o específico para CCDC28B o KLC1 fueron fotografiadas con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) luego de 72 horas de transfección y 48 horas sin suero fetal bovino. Las células depletadas de CCDC28B se esparcen más y abarcan mayor superficie de área mientras que las depletadas de KLC1 presentan forma alargada y ocupan menor superficie de área en comparación con las control. En negro se marca el contorno de células representativas de cada condición.

Células hTERT-RPE

A.

S.CTRL

10x

10x

B.

S.CCDC28B

10x

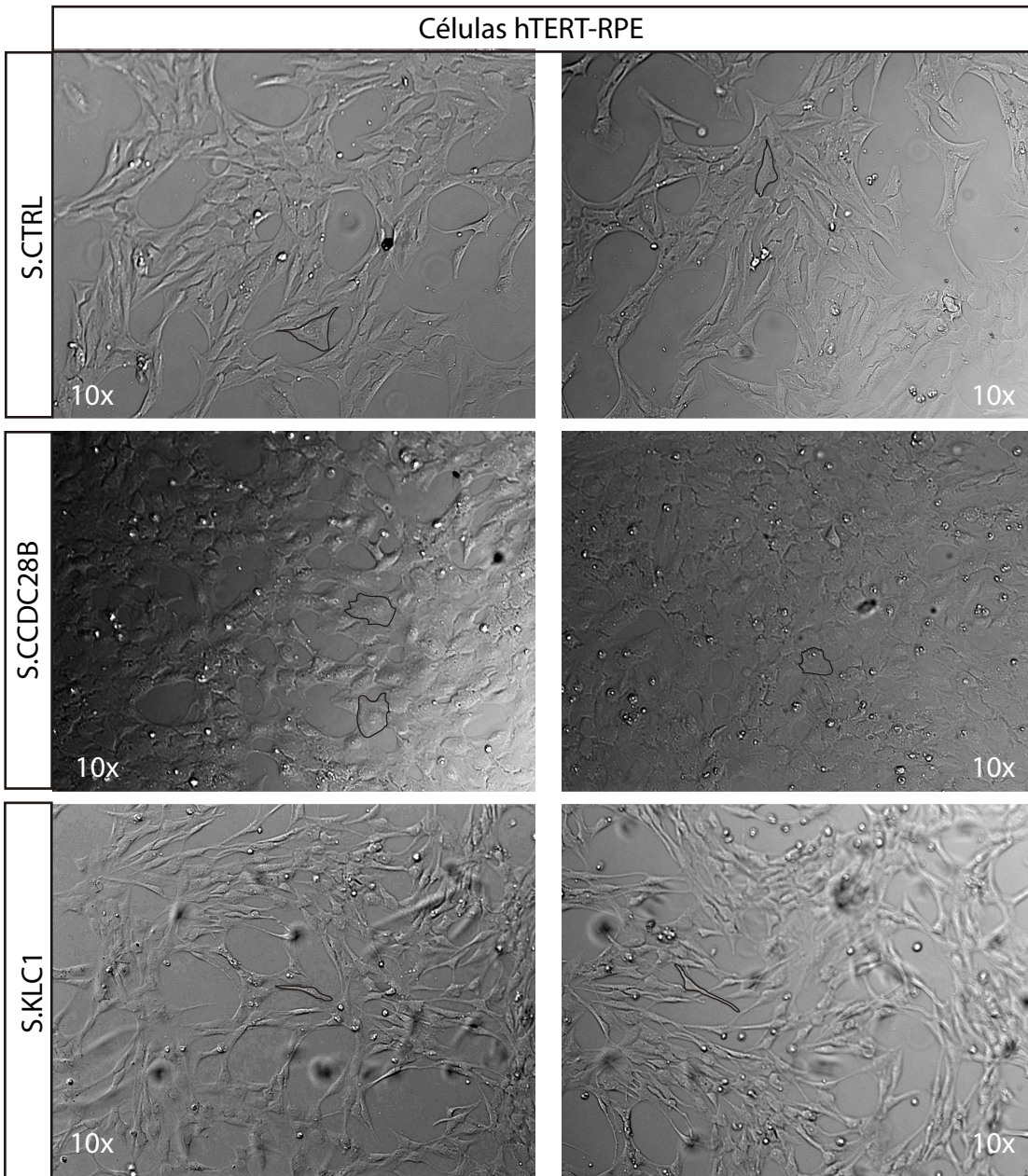
10x

C.

S.KLC1

10x

10x

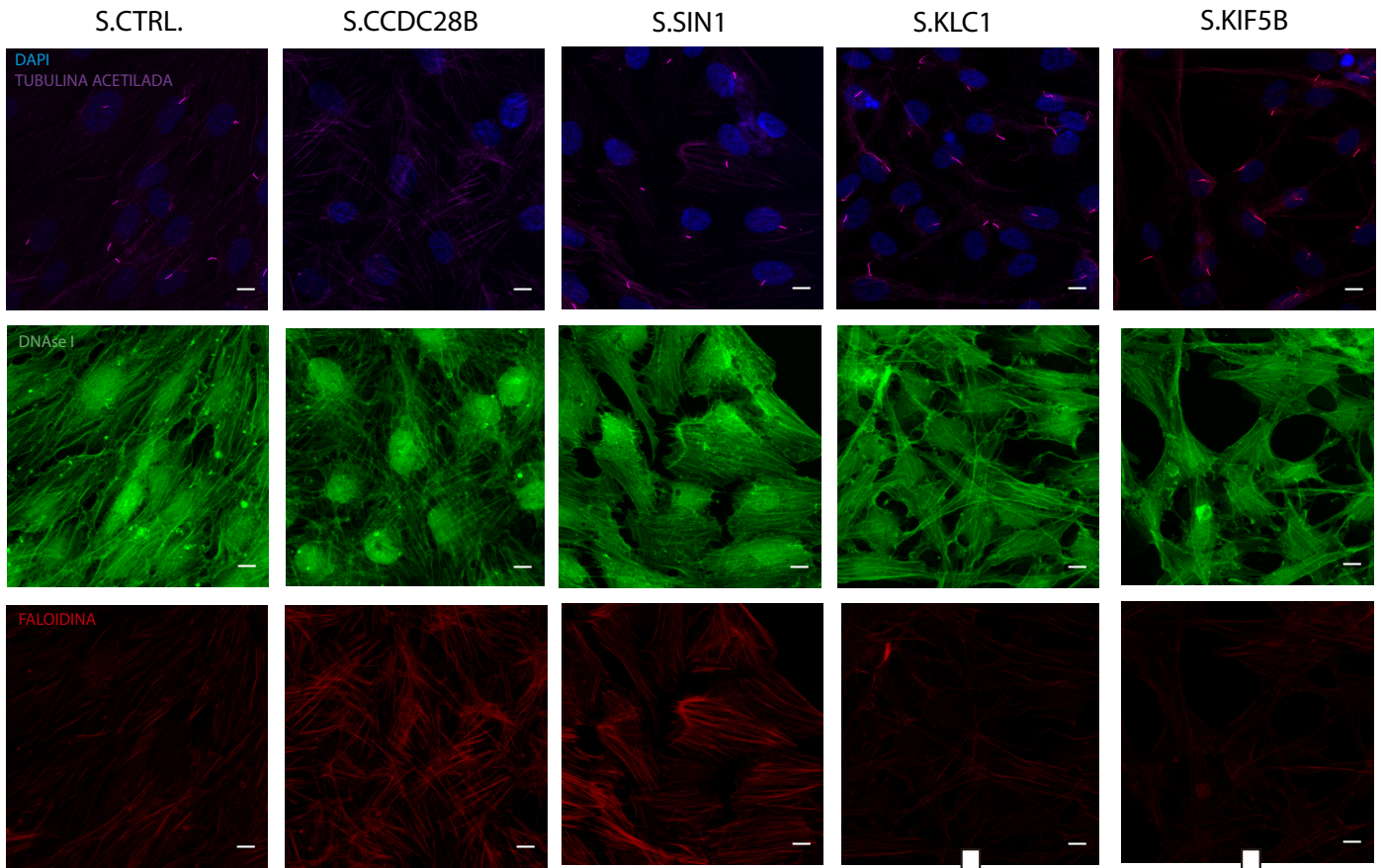


Esto nos llevó a pensar que el fenotipo ciliar en estas células podría estar relacionado con cambios en la arquitectura del citoesqueleto de actina. Para probar esta posibilidad realizamos inmunofluorescencia en células hTERT-RPE depletadas de nuestras proteínas de interés mediante stealths donde analizamos el efecto sobre el esqueleto de actina tiñendo actina fibrilar (F-actina) y monómeros de actina globular (G-actina) con Faloidina 594 y DNaseI 488 respectivamente. A pesar de que depletando KIF5B y SIN1 no observamos cambios marcados en la forma de las células por microscopía de interferencia diferencial (DIC), nos pareció que de todas formas podíamos darnos información interesante incluir el análisis de su esqueleto de actina. Analizamos las células usando microscopía confocal adquiriendo imágenes de las distintas condiciones testeadas con los mismos parámetros para que fueran comparables (**Figura 33**). Encontramos que las células depletadas tanto de CCDC28B como de SIN1 presentaron señal de actina fibrilar aumentada y con mayor abundancia de fibras de estrés en comparación a las células control y a las células depletadas de KLC1 y KIF5B (**Figura 33A**). Por el contrario, las células depletadas de KLC1 o KIF5B, presentaron una marcación de actina fibrilar disminuída que se organiza principalmente formando actina cortical y una cantidad reducida de fibras de estrés (**Figura 33A**). De acuerdo con estas observaciones, la cuantificación de la relación intensidad de actina fibrilar/actina globular en células mutantes y control mostró un aumento de la polimerización de actina en células depletadas de CCDC28B y SIN1 y una disminución en las depletadas de KLC1 y KIF5B (**Figura 33B**). Estos resultados nos parecieron interesantes por distintos motivos. Por un lado porque están en concordancia con lo documentado en la literatura donde, como mencionábamos, se ha visto que la depolimerización de actina promueve el ensamblado y la elongación de las cilias (73,76) mientras que la polimerización y la formación de fibras de estrés se asocian con el desensamblado o la inhibición de la ciliogénesis (75,193). Por otro lado, el hecho de que la depleción de SIN1 y CCDC28B genere cambios en el esqueleto de actina afectándolo en el mismo sentido apoya la posibilidad de que puedan actuar juntos mecánicamente para producir estos cambios. KIF5B y KLC1 también afectan el citoesqueleto de actina en el mismo sentido apoyando la idea de que la interacción

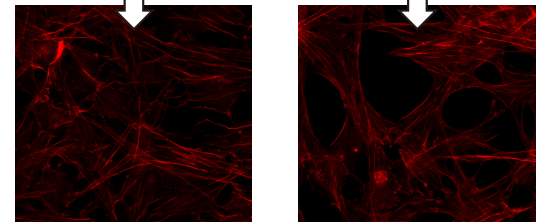
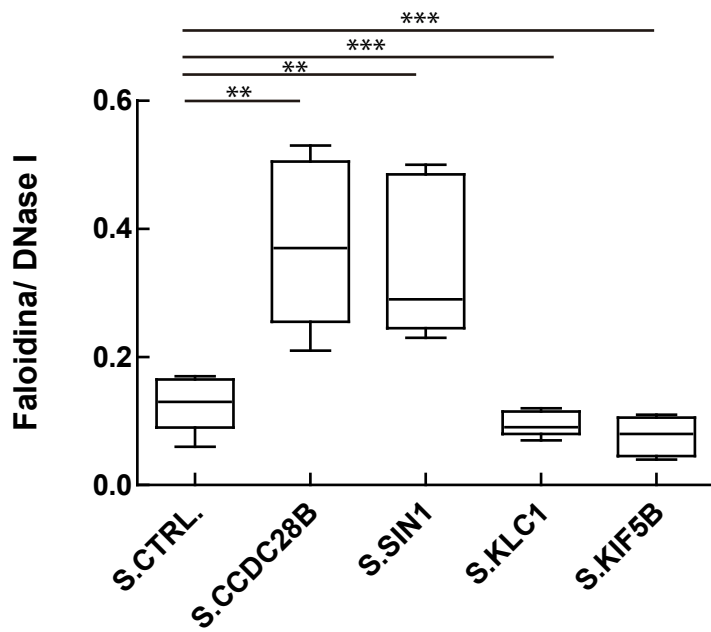
funcional de CCDC28B con KLC1 pueda ocurrir en el contexto del complejo molecular kinesina 1.

Figura 33 | Análisis del esqueleto de actina en mutantes de interés. **A.** Inmunofluorescencias realizadas en células hTERT-RPE transfectadas con stealth control o específico para CCDC28B, SIN1, KLC1 o KIF5B donde teñimos actina fibrilar con faloidina 594 y globular con DNaseI 488. Se muestran imágenes tomadas con los mismos parámetros de adquisición en cada condición. Las células depletadas tanto de CCDC28B como de SIN1 presentan señal de actina fibrilar aumentada y con mayor abundancia de fibras de estrés en comparación al control y a las células depletadas de KLC1 y KIF5B. De las células transfectadas con stealth de KLC1 y KIF5B también se muestran las mismas imágenes capturadas con mayor ganancia para poder visualizar el esqueleto de actina que presentan una marca muy tenue de actina fibrilar y reducida también la cantidad de fibras de estrés. Las barras de escala representan 10 μm . **B.** Cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia donde medimos la relación intensidad de actina fibrilar/actina globular en células mutantes y control, se ve el aumento de la polimerización de actina en células depletadas de CCDC28B y SIN1 y la disminución en las depletadas de KLC1 y KIF5B (one way- ANOVA **p <0,005 , *** p <0,0005).

A.



B.

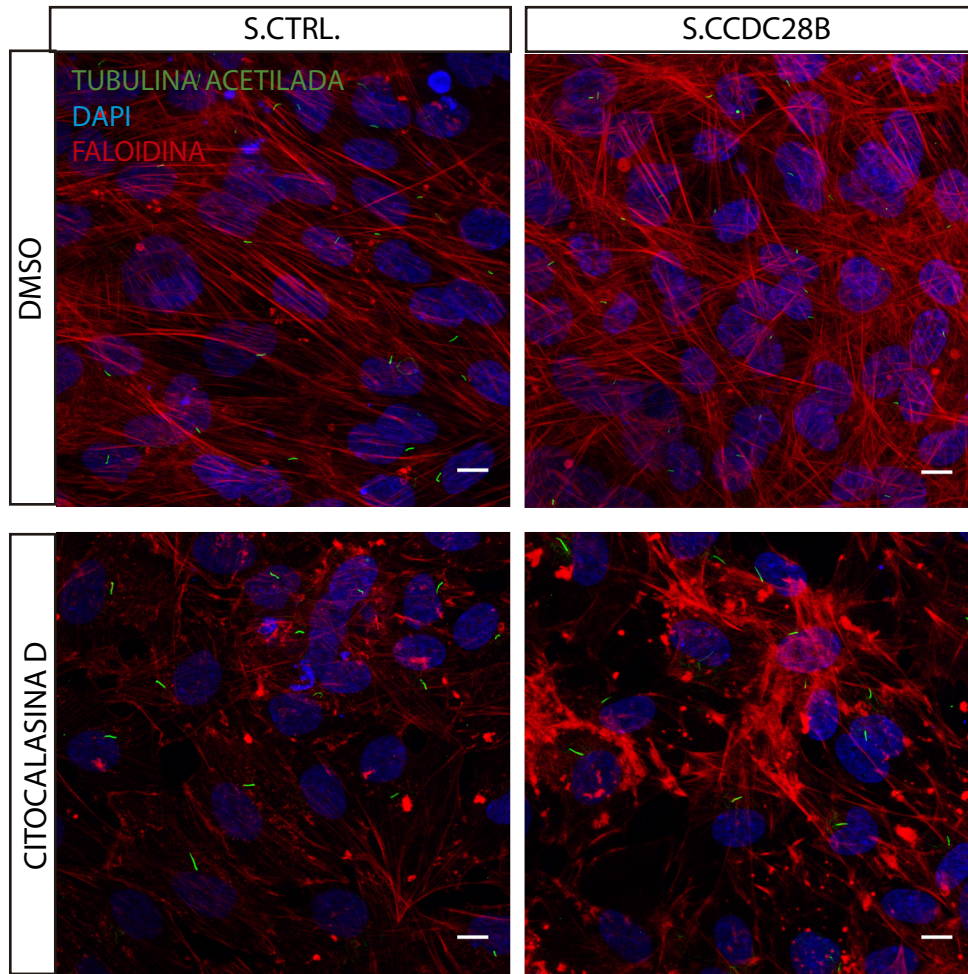


Nuestros datos por lo tanto sugerían que el remodelado del esqueleto de actina pudiera estar causalmente involucrado en el defecto ciliar que observamos en nuestros mutantes. Como primera aproximación para testear esta posibilidad intentamos rescatar el fenotipo de acortamiento de cilias en las células depletadas de CCDC28B modificando farmacológicamente la polimerización de actina. Para esto utilizamos una droga depolimerizante de actina como lo es la citocalasina D (194,195). Encontramos que un tratamiento con 5 μ M citocalasina durante 6 horas resultó en la desestabilización del esqueleto de actina en las células depletadas de CCDC28B, cambio que fue suficiente para restaurar el largo de las cilias y la proporción de células ciliadas en estas células (**Figura 34 A y B**).

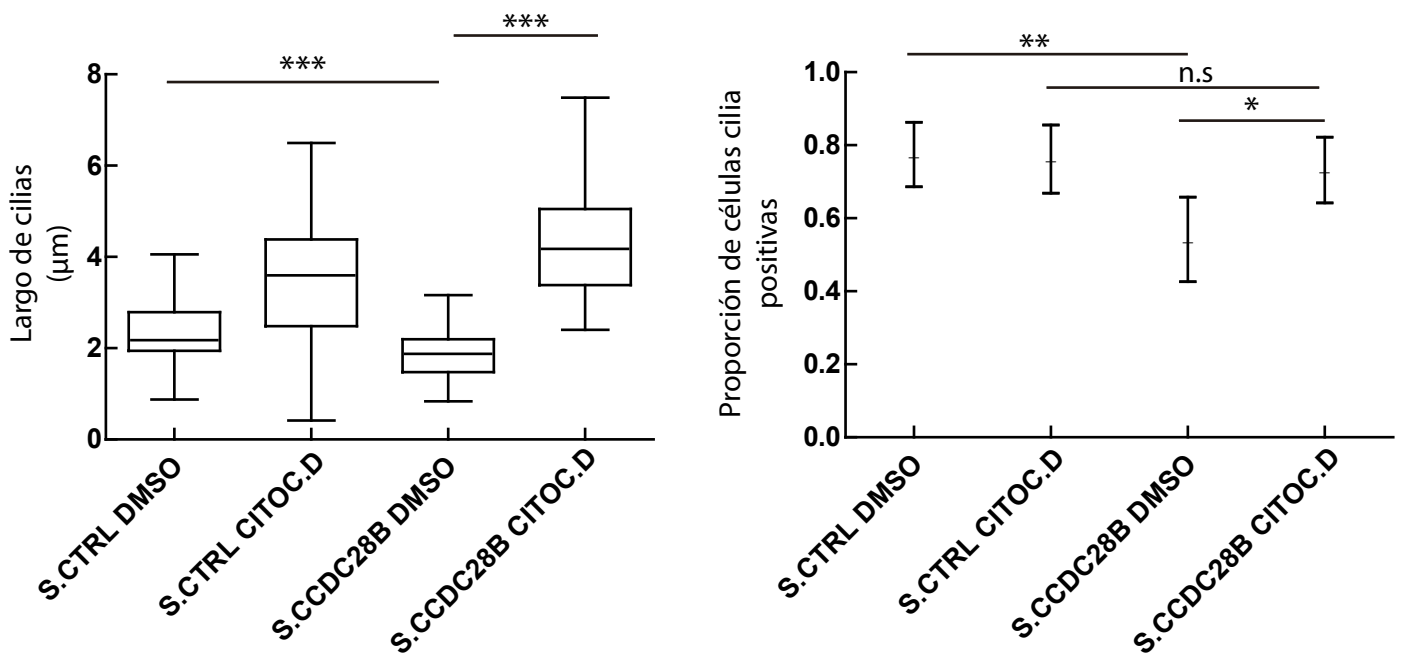
Estos resultados apoyan la idea de que el defecto ciliar que observamos en las células depletadas de CCDC28B depende, al menos en parte, de la modulación del esqueleto de actina.

Figura 34 | Rescate del fenotipo ciliar de células depletadas de CCDC28B luego de la despolimerización del esqueleto de actina. **A.** hTERT-RPE transfectadas con stealth control o de CCDC28B tratadas con DMSO como control o con 0,5 μ M de Citocalasina D durante 6 horas. En las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas con microscopía confocal se marca la actina fibrilar con Faloidina y se evidencia su despolimerización luego del tratamiento con Citocalasina D. La barra de escala corresponde a 10 μ m. **B.** A la izquierda representación gráfica de la cuantificación del largo de cilias en células control (S.CTRL) y depletadas de CCDC28B (S.CCDC28B) tratadas con DMSO y citocalasina D. El tratamiento con citocalasina D en células depletadas de CCDC28B rescata el acortamiento observado en células no tratadas (S.CTRL DMSO 2,4 μ m \pm 0,7; S.CTRL CITOC.D 3,4 μ m \pm 1,8; S. CCDC28B DMSO 1,9 μ m \pm 0,7, S.CCDC28B CITOC.D 4,5 μ m \pm 1,5; one-way ANOVA *** p<0,0005). A la derecha representación gráfica de la cuantificación de la proporción de células ciliadas. No hay aumento en la proporción de células ciliadas en los controles luego del tratamiento con citocalasina D, sin embargo las células S.CCDC28B recuperan los niveles de las células control luego del tratamiento (S.CTRL dms0 0,8; S.CTRL CITOC.D 0,8; S.CCDC28B DMSO 0,5; S.CCDC28B CITOC.D 0,7; test de hipótesis de proporciones * p < 0,05 , **p < 0,005 , n.s; no significativo).

A.



B.



CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

7.1 Relación entre CCDC28B, la vía de las MAPK, citoesqueleto y cilia

CCDC28B es una proteína de 200 aminoácidos que se caracteriza principalmente por presentar un dominio coiled coil en su extremo C-terminal. Dado que este es un motivo involucrado en la interacción entre proteínas, hipotetizamos que la función de CCDC28B podría tener que ver con mediar o regular la función de las proteínas que físicamente interactúan con ella, por ejemplo las proteínas BBS y SIN1 (97,134). Los datos de nuestro laboratorio indican que por lo menos parte del rol de CCDC28B en la regulación de las cilia se basa en su interacción con SIN1, quien estaría río abajo en el mecanismo (138). Sin embargo, no sabemos como SIN1 regula la cilia. SIN1 fue originalmente descrita como un inhibidor de MAPKs (148,178) y esta vía de señalización ha sido vinculada al proceso de ciliogénesis. A su vez, CCDC28B presenta un dominio de unión a MAPK que abre la posibilidad de que CCDC28B medie la interacción de SIN1 con las quinasas MAP. CCDC28B, mediante su interacción con SIN1, podría entonces estar regulando las cilia a través de modular la señalización por MAPKs. De manera interesante en este trabajo encontramos que células hTERT-RPE depletadas de CCDC28B o SIN1, así como también la línea hTERT-RPE CRISPR CCDC28B (Clon B1), presentan niveles aumentados de ERK1/2 fosforilado (activo). A su vez, en el Clon B1 logramos rescatar parcialmente el fenotipo ciliar inhibiendo los niveles de activación de ERK1/2 con la droga U0126. Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo indican que el defecto ciliar en mutantes de CCDC28B es mediado, al menos en parte, por la vía de las MAPK, más específicamente por ERK1/2.

Este resultado abre importantes posibilidades tanto río arriba como río abajo de ERK, las cuales deberán ser exploradas para entender el rol biológico de CCDC28B en profundidad.

Río arriba, será interesante comprender en mayor profundidad el mecanismo por el cual CCDC28B y SIN1 regulan la activación de ERK. En este contexto, será importante demostrar si CCDC28B y SIN1 regulan ERK a través de una vía común. El hecho de que CCDC28B y SIN1 afecten el estado de activación de ERK1/2 en el mismo sentido es compatible con la posibilidad de que el efecto de CCDC28B dependa de su interacción física con SIN1. Dado los datos previos del laboratorio que sitúan a SIN1 por debajo de CCDC28B en una vía común, surge entonces la posibilidad de que

CCDC28B sea quien regule a SIN1 y ésta última, a su vez, la que module la actividad de ERK. De ser así surge entonces la pregunta de cómo es que CCDC28B regula a SIN1. Basados en los datos de nuestro trabajo y el descubrimiento de la interacción CCDC28B-kinesina 1, una posibilidad es que CCDC28B/kinesina 1 regulen la función de SIN1, por ejemplo, a través de modular su localización subcelular. A futuro, será interesante evaluar el impacto de depletar CCDC28B y/o kinesina 1 en la localización y función de SIN1, como se discute en la siguiente sección

La otra gran interrogante que surge a partir de nuestros resultados se centra en entender el mecanismo río abajo de ERK: comprender cómo esta MAPK es capaz de regular el largo de las cilias. En referencia a esto último, en todos los experimentos realizados observamos que el rescate del fenotipo ciliar ocurrió en un tiempo igual o incluso posterior al momento de mayor inhibición de los niveles de fosforilación de ERK. Este desfase entre el efecto bioquímico sobre ERK y el celular sobre las cilias, sugiere que el mecanismo por el cual ERK afecta las cilias posiblemente involucre cambios en la célula que no son inmediatos, como por ejemplo la activación de otras vías, cambios en la transcripción génica o remodelado del citoesqueleto. En este sentido, por ejemplo se ha reportado que la inhibición de ERK1/2 reduce los niveles de la proteína YAP lo cual resulta en una disminución en la expresión de los genes blancos de la vía de Hippo (196). A su vez la vía de Hippo, en particular a través de modular la actividad de YAP, se ha visto que puede regular la cilia. El rol de YAP en cilia depende de su localización nuclear y por tanto de su actividad transcripcional, ya que la exclusión de YAP del núcleo resulta en un aumento en el número de cilias (83). Considerando estos datos, sería interesante estudiar si los niveles y/o localización de YAP y la consecuente expresión de sus genes blanco (efectores en cilia) están alterados en mutantes de CCDC28B y de ser así, analizar si el rescate del fenotipo ciliar observado con U0126 se debe a la restauración del efecto sobre esta vía.

Otro trabajo sugiere que ERK regula la estabilidad de algunas de las proteínas IFT claves como IFT88/Polaris pudiendo afectar la homeostasis ciliar de esta manera (197). En este contexto, analizar si los niveles de alguna de estas proteínas están afectadas en células depletadas de CCDC28B/SIN1 también podría ser informativo para esclarecer el mecanismo.

Por último, un aspecto que nos pareció particularmente interesante, dado otros resultados de esta tesis, surge de un trabajo mostrando un vínculo directo entre la actividad de ERK, el remodelado del citoesqueleto de actina, y la regulación de las cilias. En este trabajo Abdul y colaboradores reporta que la activación de la vía de Raf/MEK/ERK se acompaña de una reorganización del citoesqueleto de actina a través de la activación de Cofilin (un regulador esencial de la dinámica de actina) que de esta forma regularía el largo de las cilias. A su vez, apoyando el vínculo entre ERK y actina, un trabajo reciente ha demostrado que ERK1/2 físicamente interactúa con RhoA (remodelador clave del citoesqueleto de actina) y la fosforila en la S88 y T100 aumentando así su actividad y mediando la formación de fibras de estrés (198). En nuestro trabajo encontramos que la depleción tanto de SIN1 como de CCDC28B en células hTERT-RPE resulta en cambios en el citoesqueleto con marcado aumento en la señal de actina fibrilar y mayor abundancia de fibras de estrés en comparación a células control. Se sabe que la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés actúan como un regulador negativo de las cilias, inhibiendo su formación o extensión, mientras que un esqueleto de actina depolimerizada genera el efecto contrario (88). Nuestros resultados, por lo tanto, están en concordancia con estos datos. A su vez logramos rescatar el fenotipo ciliar revirtiendo el efecto de la depleción de CCDC28B sobre el esqueleto de actina mediante el uso de citocalasina D. Esto nos sugiere que los cambios en la actina están, al menos en parte, relacionados con el defecto ciliar de los mutantes de CCDC28B. Dado estos resultados y el vínculo reportado entre la vía de ERK-actina y cilia, una posibilidad que combinaría el conjunto de nuestros resultados es que CCDC28B/SIN1 regulen cilia a través de la modulación del citoesqueleto de actina en forma ERK dependiente. Se requerirá más estudio para analizar esta posibilidad pero de manera preliminar hemos obtenido datos que apoyarían esta posibilidad y que describimos en la siguiente y última sección de esta tesis (ver capítulo: A futuro: datos preliminares).

Un aspecto que podrá brindar información crítica para entender el mecanismo de acción de CCDC28B es evaluar el impacto de la depleción de CCDC28B/SIN1 en los reguladores directos del citoesqueleto de actina, las pequeñas GTPasas Rho. Tanto RhoA (que anteriormente mencionamos por su vínculo con ERK), como Rac y Cdc42

que son claves en el ensamblado y la organización del esqueleto de actina (199,200) y que además, para el caso de RhoA y Cdc42, distintos trabajos vinculan con la regulación de las cilias. Resulta interesante que uno de estos trabajos muestra que las proteínas vinculadas al Síndrome de Bardet Biedl: BBS4, BBS6 y BBS8 afectan las cilias inhibiendo la polimerización de actina a través de modificar particularmente la actividad de RhoA que es la principal responsable de la formación de fibras de estrés. A su vez, la actividad de RhoA también se ha visto que es necesaria para la formación de la red de actina apical requerida para el anclaje del cuerpo basal durante las primeras etapas del proceso de ciliogénesis (129). Por otro lado varios trabajos muestran el vínculo entre Cdc42 y las cilias. En unos de ellos se muestra que Cdc42 promueve la formación de la cilia primaria en células MDCK y en células del conducto renal en ratones *Hoxb7-cre; Cdc42 fl/fl* (201,202). A su vez CDC42 se ha visto que se localiza en el cuerpo basal de varios tipos celulares desde donde recluta distintos reguladores del citoesqueleto de actina (203). Por ejemplo, directamente promueve la nucleación de actina mediada por N-WASp/Arp3 e indirectamente afecta la función de N-WASp a través de Toca-1 (204,205). En un trabajo más reciente se muestra que CDC42 recluta a los reguladores de actina PKC y Missing-in-Metastasis (MIM) al cuerpo basal para mantener la polimerización de actina y restringir la frecuencia de células ciliadas y el largo del axonema (206). Dado estos datos, será interesante evaluar si el fenotipo de actina causado por la depleción de CCDC28B involucra una actividad alterada de alguna de estas RHOs GTPAasas. Por ejemplo, CCDC28B podría afectar la función/localización de Cdc42 en el cuerpo basal, donde potencialmente podrían estar interactuando, o podría regular la actividad de RhoA junto con BBS4, 6 y 8 con las cuales sabemos que CCDC28B interactúa (97). En este último caso, CCDC28B podría regular la actividad de las proteínas BBS y de esa manera afectar RhoA, inclusive en forma independiente de ERK. Alternativamente, CCDC28B podría estar río abajo de las BBS y ser un efector de las mismas. En otras palabras, las proteínas BBS podrían afectar RhoA a través de modular la actividad del eje CCDC28B/SIN1/ERK. Hacia el final de este trabajo de tesis realizamos un primer intento para determinar si hay cambios en la activación de las GTPAasas Rho. No pudimos extraer conclusiones por falta de tiempo

y reactivos por lo que más trabajo será necesario a futuro para poder evaluar este tema en profundidad (los datos preliminares obtenidos se muestran en la siguiente sección).

7.2 Relación de CCDC28B con kinesina 1 en la regulación de las cilias

La identificación y caracterización de nuevas proteínas que interactúen físicamente con CCDC28B fue planteada originalmente como una herramienta para entender su función celular y su mecanismo de acción. En este trabajo identificamos un vínculo novedoso entre CCDC28B y el motor molecular kinesina 1, que no solo nos aportó información para entender un poco más acerca de la función de CCDC28B sino que nos permitió vincular por primera vez una de los principales motores moleculares de la célula con la regulación del largo de las cilias.

Como mencionamos en la introducción, la kinesina 1 está compuesta por dos cadenas pesadas y dos livianas. Las cadenas pesadas están codificadas por tres genes diferentes: KIF5A, KIF5B y KIF5C. Nuestros datos demostraron que KIF5B es la cadena pesada principalmente involucrada en esta función relacionada a las cilias, al menos en células hTERT- RPE. Encontramos que KIF5A no se expresa, o lo hace en un nivel bajo en esta línea celular, y la depleción de KIF5C no fue suficiente para afectar las cilias por sí sola. Sin embargo, sí observamos que modificando los niveles de KIF5C potenció levemente el efecto de KIF5B cuando se las depletaba en combinación. Por lo tanto, nuestros datos no nos permiten descartar que KIF5C tenga un rol, aunque sea menor, en la regulación del largo de las cilias. Es posible que la contribución de las diferentes cadenas pesadas en el proceso de regular el largo de cilias varíe según el tipo celular, un aspecto que será interesante estudiar para comprender más profundamente el rol de este motor molecular en la regulación del largo de las cilias.

Nuestros resultados a su vez agregan un nuevo integrante a una lista creciente de kinesinas que ya han sido reportadas con un rol en el control del largo de las cilias. Sin embargo, nuestros datos muestran que kinesina 1 regularía las cilias por un mecanismo diferente. Por ejemplo, kinesina 13 (KIF24, KIF2A), kinesina 4 (KIF7) y kinesina 8 (KIF19A) afectan cilias al modular la dinámica de los microtúbulos de los cuerpos basales, del axonema o del citoplasma, actividades que requieren de la localización del motor molecular en dichas estructuras. En el caso de la kinesina 1,

nuestros resultados mostraron una localización de cuerpo basal para KLC1 y KIF5B pero no fuimos capaces de documentar su presencia dentro de las cilias. Si bien es difícil concluir a partir de resultados negativos, esto implicaría que kinesina 1 no cumpliría su rol en cilia a través de modular la dinámica de los microtúbulos del axonema. Apoyando esta idea, al depletar los componentes de la kinesina 1 tampoco observamos defectos estructurales o alteraciones en el patrón de acetilación que si son característicos en cilias anormalmente alargadas por defectos en kinesinas que promueven la depolimerización de microtúbulos del axonema, como por ejemplo KIF7 (189). En relación a la localización centrosómica/cuerpo basal de KLC1 y KIF5B, se demostró que KIF2A por ejemplo depolimeriza los microtúbulos del centrosoma y de esta forma promueve el desensamblado de la cilia (162). Sin embargo, no está reportado que la kinesina 1 presente actividad depolimerizadora de microtúbulos. Por el contrario, un trabajo muestra que estimula la elongación de microtúbulos citoplasmáticos a través de modular la vía JNK (207).

Por lo tanto, nuestros resultados sumados a reportes de la literatura indicarían que kinesina 1 regularía cilia por un mecanismo diferente al identificado para otras proteínas motoras. En este contexto, nuestro estudio de interacción génica demostró que el efecto de la kinesina 1 sobre la regulación del largo de las cilias depende, al menos en parte, de su interacción con CCDC28B. Demostramos que estas proteínas pueden interactuar físicamente y los estudios de interacción génica sugieren que la kinesina 1 y CCDC28B regulan el largo de las cilias a través de una vía en común. Usando nuestra línea celular hTERT-RPE CRISPR CCDC28B fuimos capaces de demostrar que el aumento en el largo de las cilias causado por la depleción de KLC1 o KIF5B requiere de la presencia de CCDC28B. Como control, depletar KIF7, que se sabe afecta la dinámica de los microtúbulos del axonema, resultó en el alargamiento de las cilias independientemente de CCDC28B.

En suma, reportamos un rol nuevo para la kinesina 1 en la regulación del largo de las cilias que depende, al menos en parte, de su interacción con CCDC28B. Esta interacción entre CCDC28B y un motor molecular asociado a microtúbulos como lo es la kinesina 1 nos da un nuevo punto sobre el cual profundizar para ganar información acerca del mecanismo a través del cual CCDC28B regula el largo de las cilias.

El conjunto de los resultados presentados apoyan un modelo donde la función de la kinesina 1 es inhibir el rol pro-ciliogénico de CCDC28B, proteína que actuaría río abajo en una vía celular común. Dado el rol funcional conocido de la kinesina 1 como motor molecular, pensamos que podría afectar la función de CCDC28B al modular su localización subcelular. De manera interesante, encontramos que la depleción de KLC1 y de KIF5B resulta en cambios en su localización subcelular, generando que la proteína se acumule dentro del núcleo.

La importación al núcleo requiere que las proteínas sean dirigidas hacia la envoltura nuclear. Es importante destacar que este proceso muchas veces depende de la red de microtúbulos y de la asociación estrecha que existe entre la región pericentriolar/centrosoma, principal organizador de microtúbulos de la célula, y el núcleo. En células ciliadas se demostró que la cadena liviana de la kinesina 1 interactúa con rootletina. Esta proteína es el componente principal del **ciliary rootlet**, una estructura formada por una red de fibras que se propone funciona como un sitio donde la kinesina 1 se une a sus cargos (158). En este contexto, KLC1 podría encargarse de cargar CCDC28B a KIF5B en la región pericentriolar para luego ser transportado por este motor molecular. Una posibilidad por lo tanto sería que el rol de la kinesina, que se mueve hacia el extremo positivo de los microtúbulos, sea el de transportar CCDC28B fuera de la región centrosómica, regulando negativamente su capacidad de ingresar al núcleo. Este tipo de efecto ya ha sido reportado para otros cargos de la kinesina 1 como DISC1 (disrupted in schizophrenia), una proteína centrosómica que requiere de la kinesina 1 para ser translocada desde la región pericentriolar hacia el axón de las neuronas (208–210). De ser así, se podría haber esperado que la señal centrosómica de CCDC28B también se afecte con la depleción de kinesina 1. Si bien no pudimos observar este efecto tampoco lo podemos descartar ya que podría deberse por ejemplo, a una rápida translocación de CCDC28B al núcleo que no permitiera su acumulación. Por lo tanto, no podemos descartar que la depleción de kinesina 1 resulte en otros cambios en la localización subcelular de CCDC28B, más sutiles, en el citoplasma o en el centrosoma que podrían ser fisiológicamente relevantes (discutido más abajo) pero difíciles de observar y cuantificar.

Dado el cambio de localización principalmente observado, decidimos evaluar si efectivamente la entrada de CCDC28B al núcleo es relevante para su rol en la regulación de las cilias. Para esto nos enfocamos en estudiar en profundidad la funcionalidad del dominio NLS predicho en el extremo N-terminal de CCDC28B humana y conservado en el pez cebra. Razonamos que eliminando este motivo en CCDC28B, podríamos generar una proteína con función disminuída o eventualmente nula. Efectivamente, al deletar este motivo en el ortólogo de CCDC28B en pez cebra observamos que se comportaba como un mutante nulo en nuestros experimentos de rescate *in vivo*. Eliminar los aminoácidos 4-10 que comprenden la NLS podría resultar en una *ccdc28b* nula porque impide su translocación al núcleo o por otros mecanismos que todavía no podemos descartar. Por ejemplo podría estar afectando el plegamiento correcto de la proteína y de esa forma afectar su función. Al menos para CCDC28B humana, nuestros resultados mostrando que la mutante NLS mantiene su capacidad de interactuar con KLC1 sugieren que este no sería el caso. A su vez la delección de los residuos 4-10 podría impactar en la habilidad de CCDC28B de localizarse en la base de la cilia, esta es una posibilidad que no podemos descartar dada la dificultad técnica de determinar la localización luego de sobre-expresar la proteína. Por último, la delección podría estar afectando algún motivo funcional de la proteína que sea relevante para la regulación del largo de las cilias. Por lo tanto, otros estudios serán necesarios para terminar de entender la contribución de este motivo NLS.

Nuestros resultados plantean la posibilidad de que CCDC28B tenga un rol vinculado a la cilia dentro del compartimento nuclear. Esto nos lleva a preguntarnos si los interactores de CCDC28B, distintas proteínas BBS o SIN1 también tienen una función relevante dentro del núcleo. En este sentido, en el laboratorio hemos demostrado que BBS7, que interactúa con CCDC28B (97) es capaz de entrar al núcleo y modular la transcripción génica a través de su interacción con RFN2, un miembro del complejo polycomb de remodelación de la cromatina (211). Este hallazgo fue recientemente reforzado por un reporte mostrando que BBS6 es activamente translocado entre el citoplasma y el núcleo donde interactúa con la proteína remodeladora de cromatina SMARCC1 afectando así la transcripción génica (128). En el caso de SIN1, la otra proteína reportada como interactora de CCDC28B y vinculada a

la regulación del largo de las cilias (138), existen por lo menos cinco isoformas producidas por procesamiento alternativo de su ARNm que presentan una localización sub-celular dinámica encontrándose en la membrana plasmática, el citoplasma, el núcleo y en el caso de SIN1 γ , en el cuerpo basal (149,212,213). Una posibilidad que esto nos permite especular es que CCDC28B, junto con la kinesina 1 podría modular la localización subcelular y así la función de SIN1 o las proteínas BBS. En relación a esta última posibilidad, es interesante que experimentos preliminares realizados por la Dra. Magdalena Cárdenas muestran que en ausencia de CCDC28B, SIN1 queda retenida dentro del núcleo. De esta forma CCDC28B podría estar regulando la disponibilidad de SIN1 para interactuar con la MAPK ERK. Será necesario retomar esa línea de trabajo para confirmar esa observación y analizar si es dependiente de kinesina 1.

Si el modelo es correcto y la ausencia de KLC1/KIF5B resulta en una acumulación nuclear de CCDC28B porque no permite sacar a esta proteína de la región centrosómica, esperaríamos que la delección de KLC1/KIF5B resulte no solo en un aumento de CCDC28B en el núcleo sino, como mencionábamos más arriba, también en un aumento de CCDC28B en la región pericentriolar. Sin embargo esto último no fue evidente. Este resultado podría esperarse si CCDC28B rápidamente se translocara desde la región centrosómica hacia dentro del núcleo dificultando la visualización del efecto completo. De ser así, la kinesina 1 podría regular los niveles de CCDC28B tanto en el núcleo como en la región pericentriolar. Es interesante que CCDC28B interactúa con BBS4, una proteína que se localiza principalmente en la región pericentriolar (99) y datos preliminares del laboratorio indican que en células depletadas de CCDC28B mediante ARNi, se pierde la localización de BBS4 en esta región. Son datos que deberán confirmarse con más experimentos pero resultan interesantes dado que se ha postulado que modular los niveles de BBS4 en la región pericentriolar podría representar una forma de regular la formación del BBSoma, el complejo de proteínas BBS que juega un rol crítico en la formación, mantenimiento y función de las cilias (102,214,215).

Analizar el efecto de depletar CCDC28B sobre varias proteínas BBS así como evaluar la estabilidad del BBSoma en ausencia de CCDC28B eran parte de los objetivos que inicialmente nos planteamos para esta tesis, pero debido a que los anticuerpos para

estas proteínas no son buenos no pudimos concluirlo. Para resolver esta dificultad e independizarnos de los anticuerpos actualmente en el laboratorio se está trabajando en generar líneas estables que expresen alguna de las proteínas BBS fusionada a un fluoróforo. En resumen, se necesitará más investigación para resolver la pregunta de si CCDC28B, a través de la kinesina 1, puede de hecho regular la distribución subcelular y la función de proteínas BBS interactoras, tanto en el núcleo como en el citoplasma, y si esto de alguna forma es parte de su rol en la regulación de las cilias.

Otra posibilidad es que la interacción de CCDC28B con el BBSoma o con alguna de las proteínas BBS, jueguen un rol en la llegada y localización de CCDC28B en el centrosoma desde donde se facilitaría su llegada al núcleo. Esto podría ocurrir por ejemplo a través de su interacción con BBS4 que se sabe que interactúa con dineína para transportarse al centrosoma y funciona como adaptador para llevar a PCM1 (pericentriolar material 1 protein) a la región pericentriolar (99). Hicimos un primer intento de estudiar esta posibilidad, analizando cambios en la localización centrosómica de CCDC28B entre células MEFs provenientes de ratones salvajes y Knockout BBS4 y no encontramos diferencias. De todas formas será interesante en un futuro evaluar si hay cambios en la localización/función de CCDC28B en ausencia de otras proteínas BBS.

CONCLUSIONES

El trabajo presentado en esta tesis nos permite sacar las siguientes conclusiones:

- Se demostró por primera vez un vínculo entre el motor molecular kinesina 1 y el proceso de regulación de las cilias.
- Encontramos que kinesina 1 interactúa físicamente con CCDC28B y el rol del motor molecular sobre las cilias depende, al menos en parte, de esta interacción.
- kinesina 1 modifica la localización subcelular de CCDC28B, inhibiendo su entrada al núcleo, proceso que sería importante para su función en la regulación de la cilia. Es decir que actuaría inhibiendo el rol pro-ciliogénico de CCDC28B.
- Parte del rol de CCDC28B en la cilia es mediado por cambios en la actividad de la vía de las MAPKs ERK1/2 ya que restaurar sus niveles rescata parcialmente el fenotipo ciliar.
- CCDC28B afecta las cilias, al menos en parte, a través de la remodelación del citoesqueleto de actina.

Seguimos sin conocer el mecanismo completo a través del cual CCDC28B modifica las cilias pero el trabajo de esta tesis suma información importante en este sentido indicando que tanto la vía de las MAPK ERK1/2 como el esqueleto de actina juegan un rol, ya que ambos se encuentran alterados en mutantes de CCDC28B y revertir sus defectos rescata parcialmente el fenotipo ciliar (ver esquema ilustrativo en **Figura 35**). Dado el conjunto de nuestros resultados, y sumado a lo reportado en la literatura, una posibilidad es que estas modificaciones de CCDC28B sobre la vía de ERK y el esqueleto de actina formen parte de un mecanismo común en la regulación de las cilias. En este sentido proponemos un modelo en donde la kinesina 1, modificando la localización subcelular de CCDC28B, regularía la actividad de SIN1 (y posiblemente otros interactores relevantes como las BBS). CCDC28B a través de su interacción con SIN1, mediaría la activación de la vía de ERK1/2 que resultaría en el remodelado del esqueleto de actina (a través de la activación de RhoA o de otras proteínas remodeladoras de actina) y la subsecuente regulación del largo de las cilias (ver en

esquema de **Figura 36**). Este es un posible mecanismo para CCDC28B que surge del conjunto de nuestros resultados y la literatura, pero en la discusión fuimos mencionando otros escenarios posibles que también será interesante analizar en un futuro (esquema **Figura 36**).

Figura 35| Esquema ilustrativo de los resultados obtenidos en el trabajo de esta tesis.

Encontramos que kinesina 1 interactúa físicamente con CCDC28B y el rol del motor molecular sobre las cilia depende, al menos en parte, de esta interacción. Kinesina 1 actuaría inhibiendo el rol pro-ciliogénico de CCDC28B. A su vez, parte del rol de CCDC28B en cilia es mediado por cambios en la actividad de la vía de las MAPK ERK1/2 y por el remodelado del citoesqueleto de actina, ya que ambos se encuentran alterados en mutantes de CCDC28B y revertir sus defectos rescata parcialmente el fenotipo ciliar. En el caso de la vía MAPK ERK1/2, CCDC28B actúa como un inhibidor de la actividad de ERK, posiblemente a través de su interacción con SIN1, y esto favorece la función ciliar. En el caso de la actina, CCDC28B favorece el remodelado de actina inhibiendo la formación de fibras de estrés lo cual también favorece la formación de la cilia.

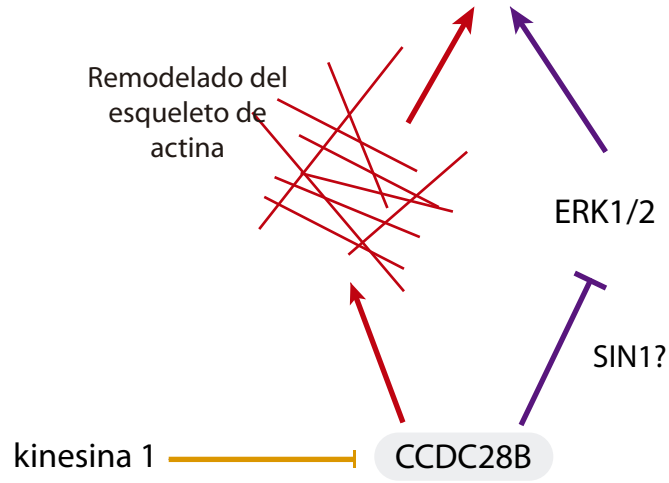
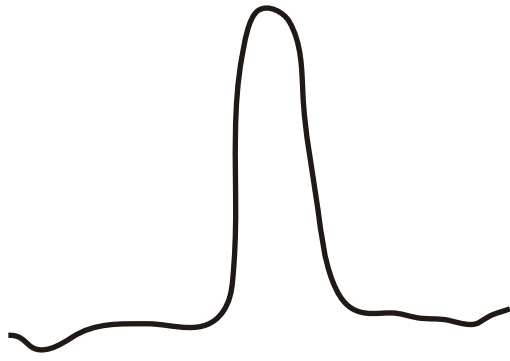
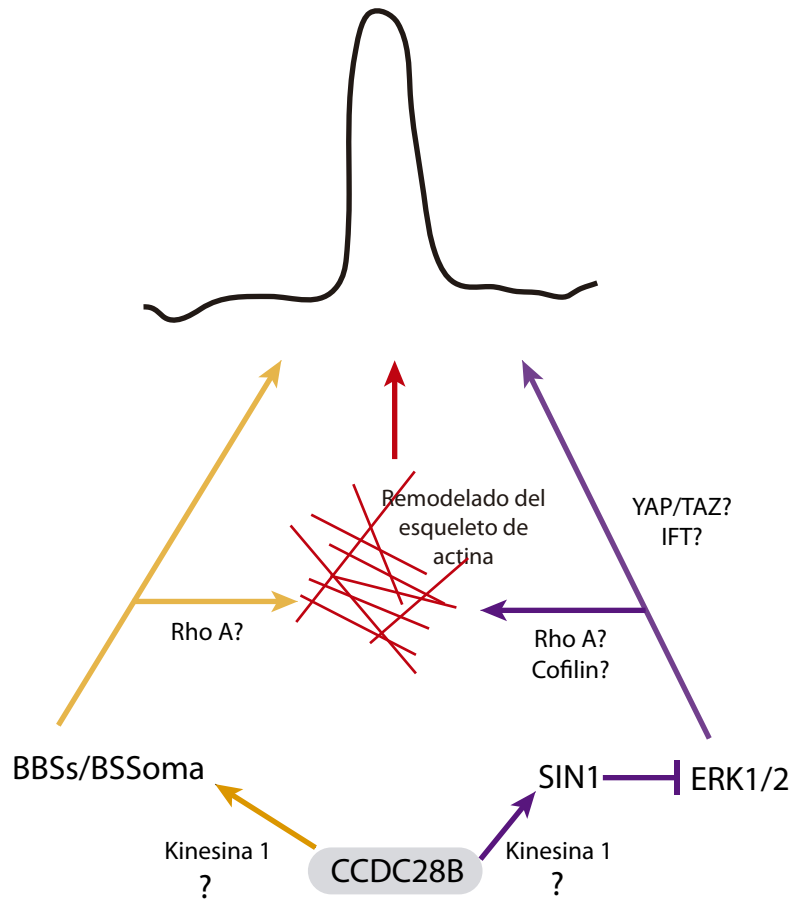


Figura 36 | Esquema ilustrativo de posibles mecanismos a través de los cuales CCDC28B mediante su interacción con kinesina 1 podría estar mediando cambios en la función de sus interactores y de esta forma regular cilia.



CAPITULO VIII

A FUTURO: DATOS PRELIMINARES

Como se discutió en el capítulo anterior, el conjunto de resultados de esta tesis aportó datos novedosos acerca de la biología de CCDC28B y proteínas asociadas que a la vez generan una serie de nuevas interrogantes y líneas de investigación interesantes para continuar disecando el rol de CCDC28B en la regulación del largo de las cilias. En esta sección mencionaremos algunos datos preliminares que podrían servir de base para futuros proyectos del laboratorio.

8.1 Análisis del vínculo CCDC28B-ERK-ACTINA-CILIA

Uno de los aportes de esta tesis fue la identificación de un rol importante del citoesqueleto de actina en la regulación del largo de las cilias por parte de CCDC28B. A su vez, obtuvimos otros datos que posiblemente sean relevantes en este contexto. Por ejemplo, sabemos que CCDC28B interactúa y regula a SIN1, y tanto CCDC28B como SIN1 regulan la actividad de ERK, una MAPK que se sabe puede regular la dinámica de actina. Por lo tanto, de nuestro trabajo surgen un número de interrogantes que apuntan a entender tanto el mecanismo por el cual CCDC28B/SIN1 regulan ERK así como para comprender los eventos río abajo de ERK que determinan cambios en el largo de las cilias.

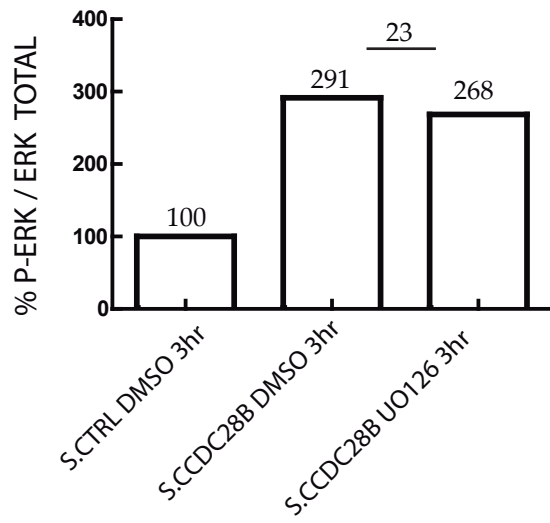
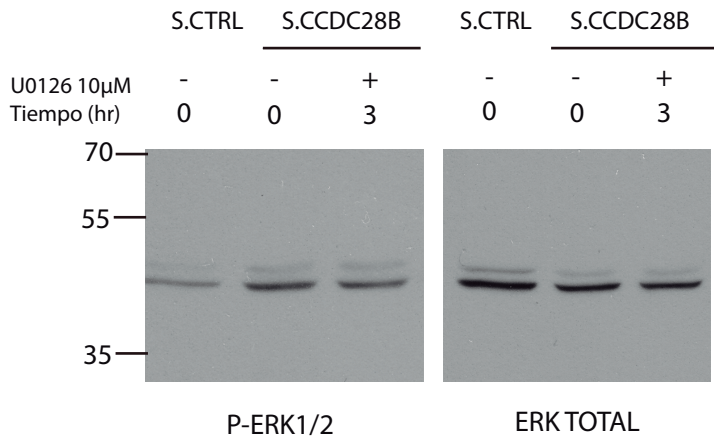
Dado el fenotipo de actina que observamos en nuestros mutantes de CCDC28B y el vínculo reportado entre la vía de ERK y el citoesqueleto, se abre la posibilidad de que el rescate del fenotipo ciliar en células depletadas de CCDC28B que observamos al inhibir la activación de ERK este mediado por un efecto directo de esta MAPK sobre el esqueleto de actina. Para abordar esta posibilidad empezamos por intentar determinar si el rescate del fenotipo ciliar que observábamos con la inhibición de ERK mediante la droga U0126 en células depletadas de CCDC28B se acompañaba de una reducción en la polimerización de actina (disminución de fibras de estrés). Dado que el fenotipo de actina resulta menos robusto y evidente en la línea hTERT-RPE CRISPR CCDC28B (Clon B1) decidimos hacer el primer análisis en células hTERT-RPE depletadas de CCDC28B por ARNi mediante la transfección con nuestro stealth. Transfectamos células con el stealth de CCDC28B y como primera aproximación realizamos dos pruebas tratándolas con U0126 (10 μ M) por 3 y 6 horas. Seleccionamos estos tiempos basándonos en los tiempos donde observamos inhibición de los niveles de activación

de ERK y rescate del fenotipo ciliar respectivamente en el Clon B1. Analizamos por western blot los niveles de activación de ERK y por inmunofluorescencia el efecto del tratamiento sobre el fenotipo ciliar y el esqueleto de actina marcando la actina fibrilar (F-actina) con Faloidina. El principal defecto ciliar de las células depletadas de CCDC28B mediante la transfección con stealth, como ya fue mencionado previamente, es el acortamiento de las cilias por lo que este fue el fenotipo que cuantificamos, en lugar de la proporción de células ciliadas.

En la evaluación a las 3 horas (**Figuras 37 y 38**) observamos primero, como esperabamos, que la transfección de células hTERT-RPE con el stealth de CCDC28B (tratadas con DMSO como control) comparado con el stealth control (también tratado con DMSO) produce un aumento en los niveles de ERK fosforilado (**Figura 37A**), un acortamiento estadísticamente significativo del largo de las cilias (**Figura 37B**), y un incremento en la cantidad de actina polimerizada y formación de fibras de estres (en **Figura 38** comparar paneles A y B cuantificados en D). El tratamiento con U0126 luego de 3 horas no fue suficiente para restaurar los niveles de fosforilación de ERK (**Figura 37A**) y por tanto no resultó en un rescate del largo de las cilias (**Figura 37B**) ni encontramos diferencias significativas en el esqueleto de actina en estas condiciones (**Figura 38** comparación entre paneles B y C cuantificados en D). Basado en estos datos, decidimos cambiar el protocolo y aumentar el tiempo de tratamiento con U0126 ya que tres horas de tratamiento no fueron suficientes para alcanzar el pico de inhibición de ERK.

Figura 37 | Células hTERT-RPE depletadas de CCDC28B tratadas con U0126 por 3 horas y análisis del efecto sobre los niveles de activación de ERK y el fenotipo ciliar. **A.** Arriba western blot de ERK1/2 activo (P-ERK1/2) en células control (S.CTRL) y depletadas de CCDC28B (S.CCDC28B) tratadas con DMSO como control o con U0126 (10 μ M) durante 3 horas. Abajo la cuantificación del blot, donde se ve una inhibición de 23% en la activación de ERK en las células transfectadas con S.CCDC28B y tratadas con el inhibidor. **B.** Cuantificación de largo de cilias. La transfección con el stealth de CCDC28B resulta en cilias significativamente más cortas comparado con el stealth control tanto cuando se trata las células con U0126 como con DMSO como control (one way ANOVA , *** $p < 0,005$).

A.



B.

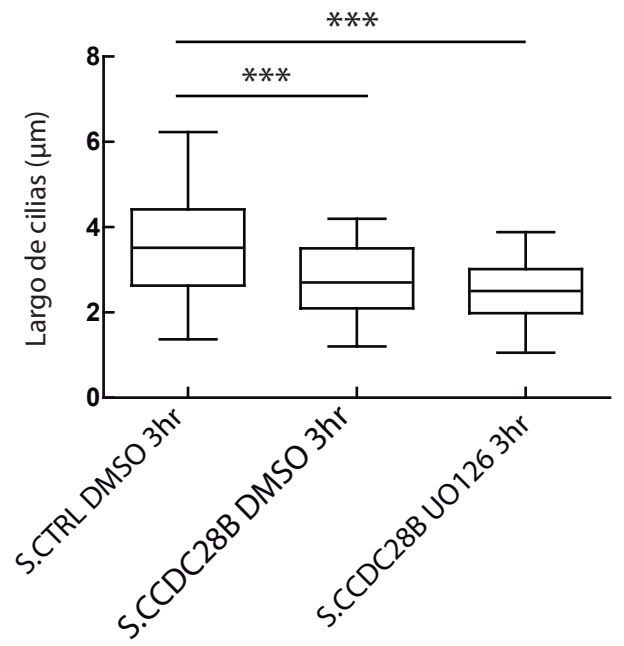
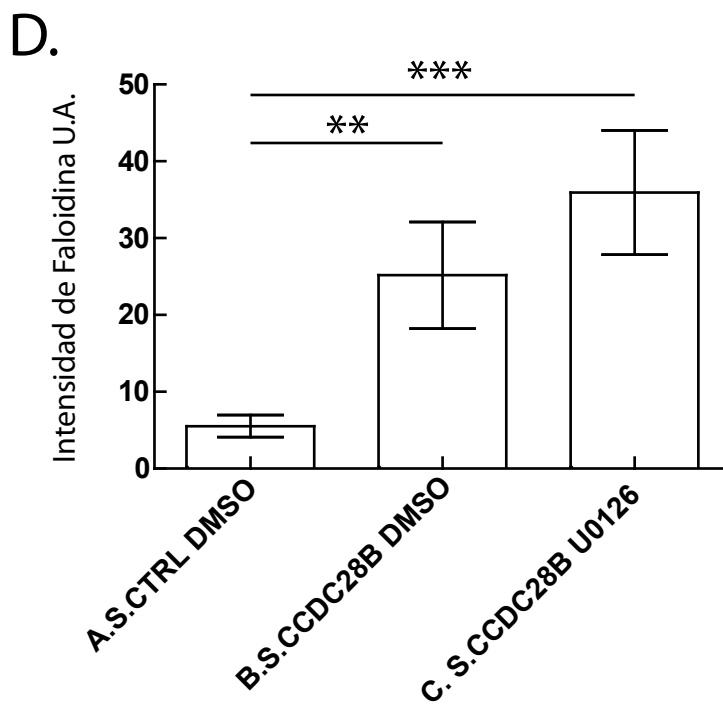
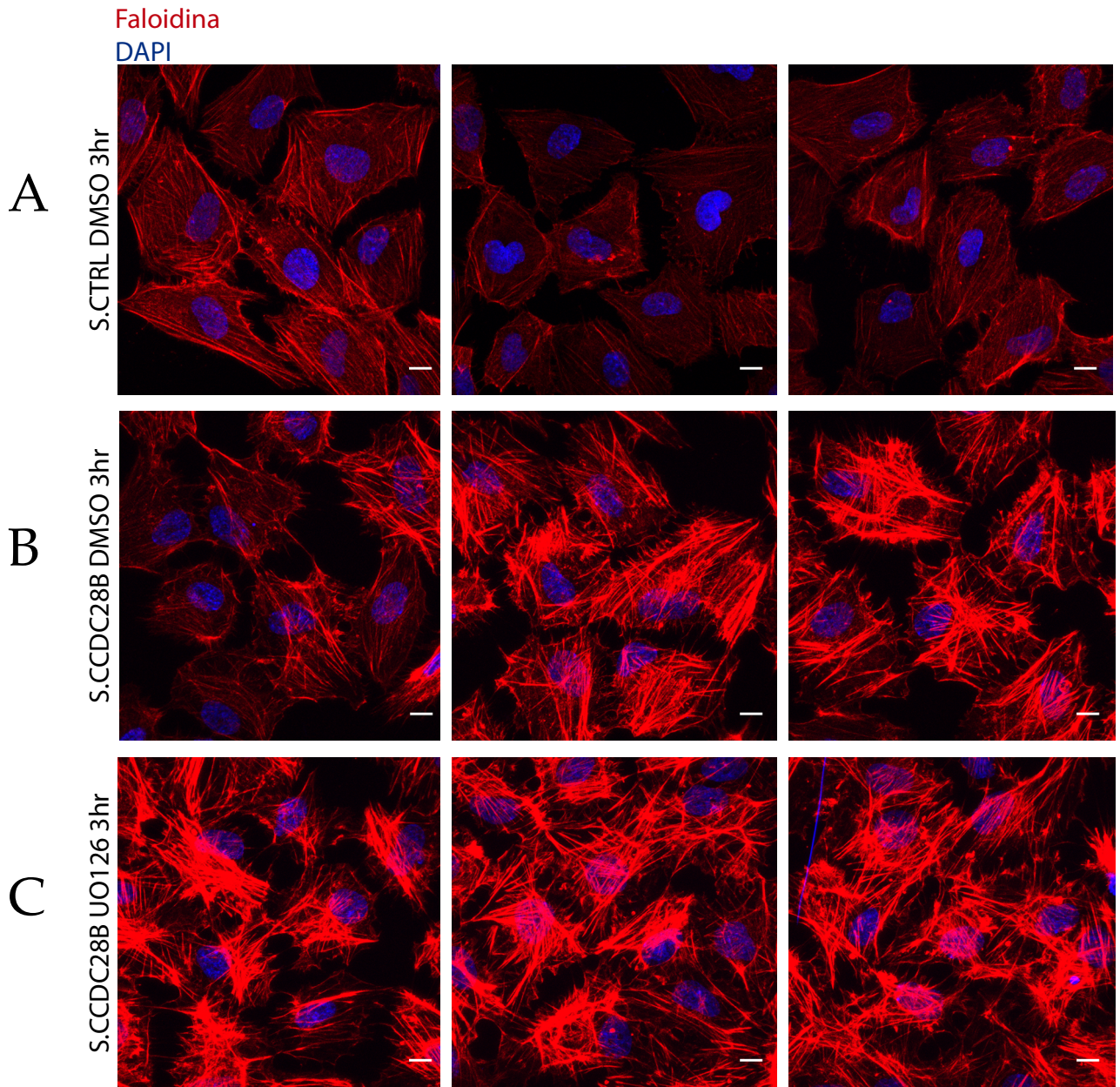


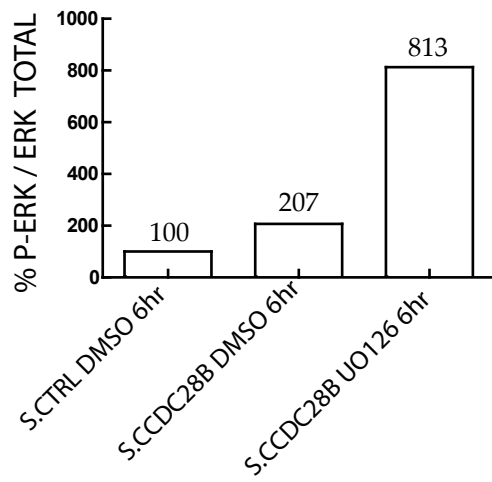
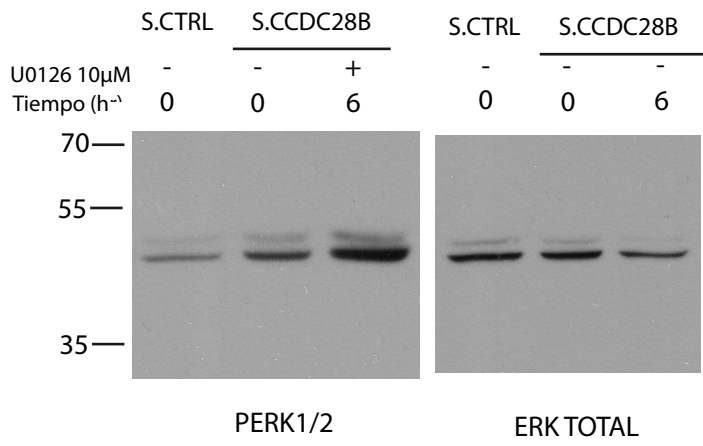
Figura 38 | Análisis del esqueleto de actina en hTERT-RPE depletadas de CCDC28B y tratadas con U0126 por 3 horas. A, B y C muestran un panel de 3 imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopía confocal donde se compara el esqueleto de actina marcado con Faloidina (F-actina) entre 3 condiciones distintas: células transfectadas con S.CTRL tratadas con DMSO (A), S.CCDC28B DMSO (B) y S.CCDC28B tratadas con U0126 10 μ M (C) por 3 horas. Las barras de escala representan 10 μ m **D.** Cuantificación de la intensidad de Faloidina de las inmunofluorescencias mostradas en A,B y C donde vemos un aumento significativo en la intensidad de actina fibrilar en las células transfectadas con el stealth de CCDC28B respecto a las células control (A) (one way ANOVA ** $p < 0,05$, *** $p < 0,005$). No encontramos diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento con U0126.



Repetimos el experimento esta vez realizando el análisis a las 6 horas de tratamiento con U0126 (**Figuras 39 y 40**). En este caso encontramos niveles de activación de ERK aumentados con el tratamiento con respecto a la situación control (S.CTRL. DMSO) e incluso a las transfectadas con el stealth de CCDC28B y tratadas con DMSO como control (**Figura 39A**). Esto indicaría que a las 6 horas de tratamiento posiblemente ya ocurrió el pico de inhibición y lo que observamos fue el efecto de compensación que, como vimos en el Clon B1, tiende incluso a superar los niveles basales de activación. En línea con esta posibilidad, el análisis del esqueleto de actina si mostró que el tratamiento con U0126 resultó en una disminución en la cantidad de fibras de estrés respecto a las S.CCDC28B tratadas con DMSO (en **Figura 40** comparar paneles B y C y ver cuantificación en D). Es decir que observamos un rescate parcial del fenotipo de actina a las 6 horas de tratamiento con U0126 en células depletadas de CCDC28B. Sin embargo, no pudimos correlacionar este efecto con el fenotipo de largo de cilias ya que las células control en ese experimento (células tratadas con stealth de CCDC28B) no presentaron el acortamiento típico en el largo de cilias (**Figura 39B**).

Figura 39 | Células hTERT-RPE depletadas de CCDC28B tratadas con U0126 por 6 horas y análisis del efecto sobre los niveles de activación de ERK y el fenotipo ciliar. **A.** Arriba western blot de ERK1/2 activo (P-ERK1/2) en células control (S.CTRL) y depletadas de CCDC28B (S.CCDC28B) tratadas con DMSO como control o con U0126 (10 μ M) durante 6 horas. Abajo la cuantificación del blot, donde se ve el aumento en la activación de ERK en las células transfectadas con S.CCDC28B y tratadas con U0126. **B.** Cuantificación de largo de cilias. La transfección con el stealth de CCDC28B resulta en cilias significativamente más cortas comparado con el stealth control cuando se trata las células con U0126 (one way ANOVA , *** $p < 0,005$).

A.



B.

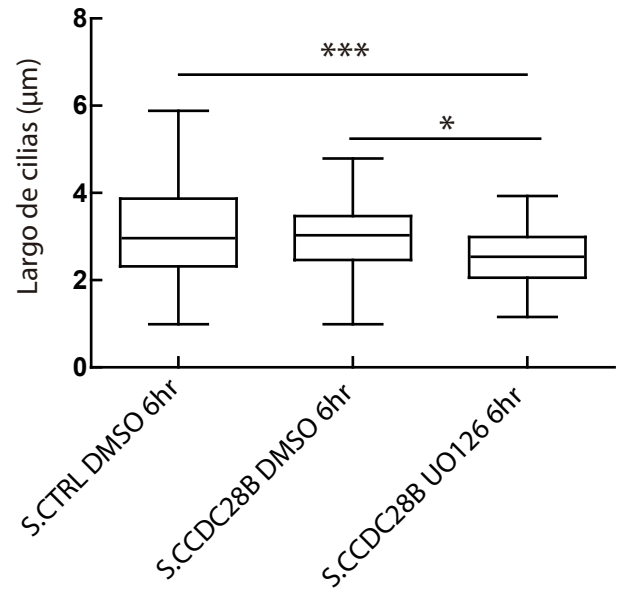
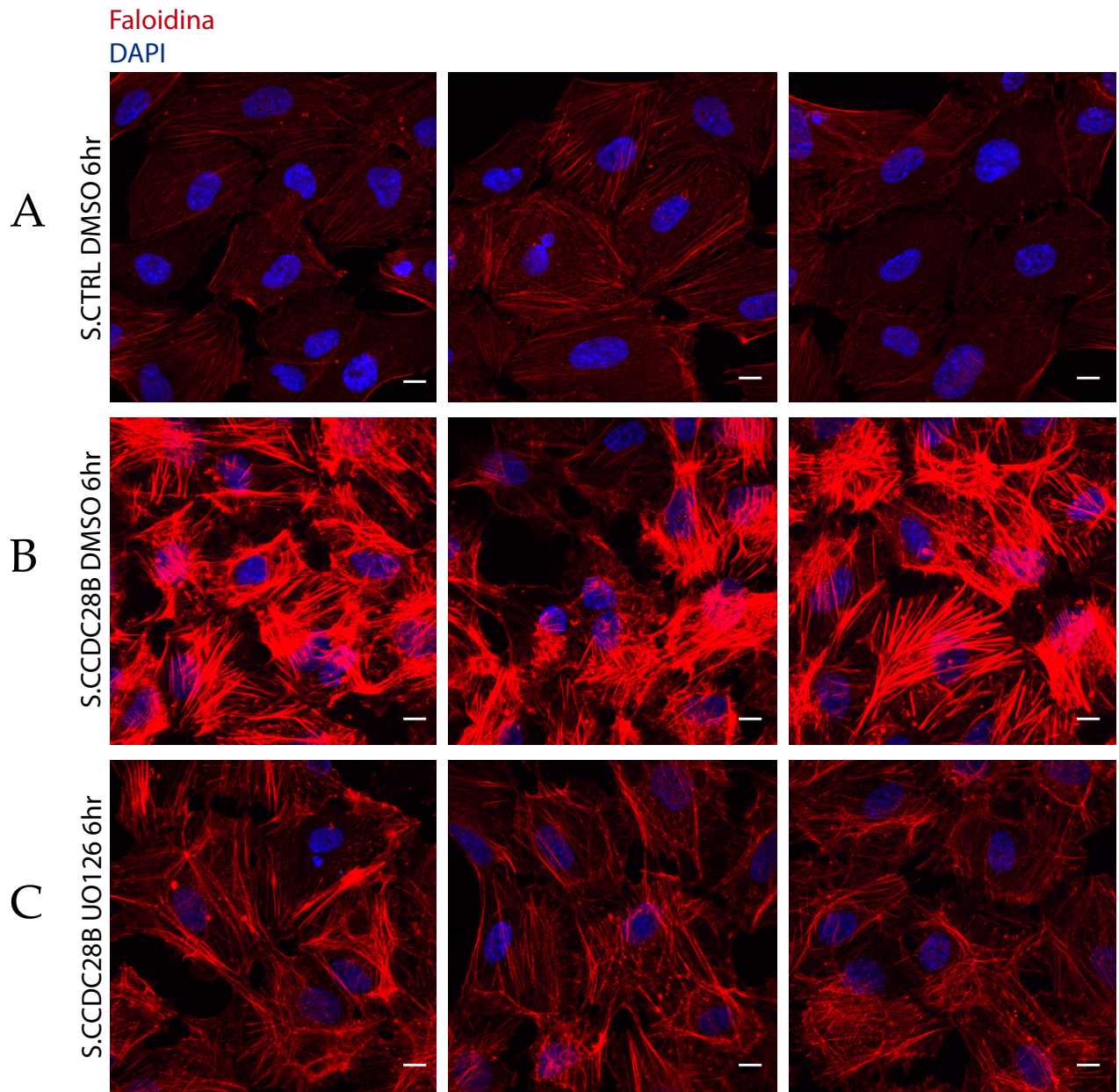
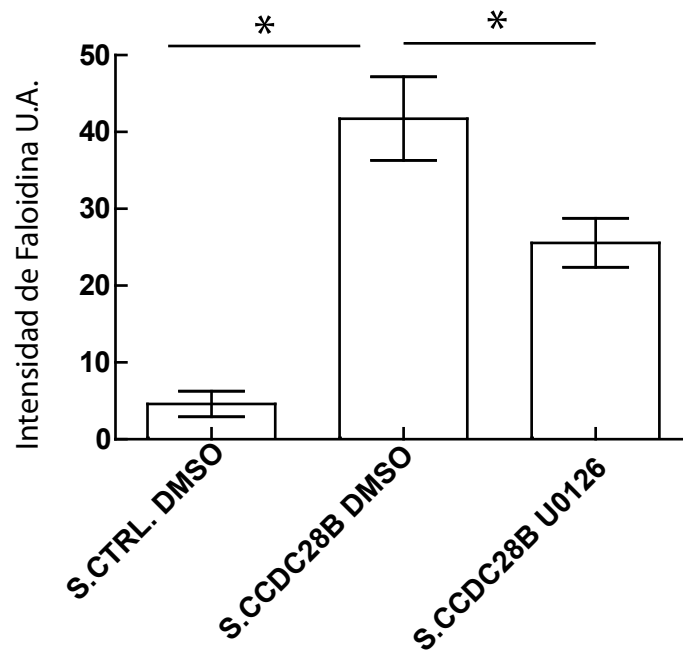


Figura 40 | Análisis del esqueleto de actina en hTERT-RPE depletadas de CCDC28B y tratadas con U0126 por 6 horas. A, B y C muestran un panel de 3 imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopía confocal donde se compara el esqueleto de actina marcado con Faloidina (F-actina) entre 3 condiciones: células transfectadas con S.CTRL tratadas con DMSO (A), S.CCDC28B DMSO (B) y S.CCDC28B tratadas con U0126 10 μ M (C) por 6 horas. Las barras de escala representan 10 μ m **D.** Cuantificación de la intensidad de Faloidina de las inmunofluorescencias mostradas en A,B y C donde vemos un aumento significativo en la intensidad de actina fibrilar en las células transfectadas con el stealth de CCDC28B DMSO respecto a las células control (A) (Kruskal Wallis * $p < 0,05$) que disminuye significativamente en las tratadas con U0126 (Kruskal Wallis * $p < 0,05$).



D.



En suma, nuevos experimentos serán necesarios para poder establecer la relación ERK, citoesqueleto de actina y cilia pero el resultado del tratamiento de ERK sobre el esqueleto de actina resulta auspicioso en este contexto. Será importante evaluar otros tiempos de tratamiento con U0126 dada la posibilidad de que en células depletadas de CCDC28B con ARNi, el efecto más agudo del tratamiento (comparado con la línea CRISPR de CCDC28B) tenga como consecuencia que el tiempo en el que ocurre el rescate del fenotipo ciliar presente un desfase aún mayor con el pico de inhibición de ERK que lo que ocurre en el Clon B1.

8.2 Evaluación del estado de activación de las Rho GTPasas RhoA, Cdc42 y Rac1 en mutantes de CCDC28B

También mencionábamos en la discusión que otro aspecto a determinar en relación al fenotipo de actina es si la depleción de CCDC28B resulta en cambios a nivel de los efectores principales en el remodelado del citoesqueleto de actina: las pequeñas GTPasas RhoA, Cdc42 o Rac1 (216). CCDC28B podría regular actina modulando estas GTPasas a través de ERK, quien se sabe regula la actividad de RhoA (198), o podría hacerlo por otros mecanismos. Por ejemplo, se ha reportado que algunas proteínas BBS pueden modular actina a través de la GTPasa RhoA (129). En este contexto, nos propusimos comenzar a evaluar el estado de activación de RhoA, Cdc42 y Rac1 en células depletadas de CCDC28B.

Para evaluar el estado de activación de las diferentes Rho GTPasas utilizamos un kit comercial de la compañía Abcam: RhoA/Rac1/Cdc42 Combo Activation Assay Kit (ab211168) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este kit se basa en una serie de inmunoprecipitaciones. Como otras pequeñas GTPasas, RhoA, Rac1 y Cdc42 regulan eventos moleculares ciclando entre una forma inactiva GDP y una forma activa GTP. En su estado activo GTP, RhoA se une específicamente al dominio de unión de Rho (RBD) de la proteína Rhotekin y Rac1 o CDC42 se unen específicamente al dominio p21 (PBD) de p21 activated protein kinase (PAK) para controlar diferentes cascadas de señalización. Este Kit de Abcam utiliza esferas de Agarosa fusionadas a Rhotekin RBD y PAK1 PBD para selectivamente inmunoprecipitar la forma activa de Rho/Rac/Cdc42 de lisados celulares. Luego los

niveles de GTP-Rho, Rac o Cdc42 son evaluados por western blot usando anticuerpos contra RhoA, Rac o Cdc42.

El protocolo del kit menciona que tener la cantidad suficiente de lisado al momento de realizar la inmunoprecipitación es crítico para que el experimento sea exitoso. Por eso sugieren que antes de hacer la inmunoprecipitación, se realice un western blot directo probando diferentes cantidades de lisado de proteínas totales (sin inmunoprecipitar), para luego usar 100 veces más de la cantidad de lisado que de una banda clara de las GTPasa en el western blot. Esto es importante para asegurarnos poder detectar la forma activa ya que es significativamente menos abundante que la inactiva.

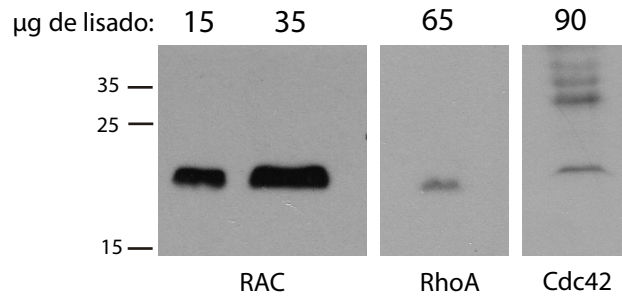
Comenzamos entonces por definir la cantidad de lisado de células hTERT-RPE que deberíamos utilizar para inmunoprecipitar cada una de las GTPasas realizando pruebas de western blot directo con los anticuerpos contra RhoA, Rac y Cdc42 en diferentes cantidades de lisado. Finalmente para Rac encontramos que 15 μg de lisado de proteínas totales era suficiente para detectarla sin dificultad. Sin embargo, RhoA y Cdc42 parecen ser bastante menos abundantes en esta línea celular dado que fueron necesarios 65 y 90 μg de lisado respectivamente para detectarlas por western blot (**Figura 41A**). Esto representó una dificultad importante para realizar su inmunoprecipitación dado que no pudimos utilizar 100 veces más de esta cantidad de lisado como nos sugería el Kit para asegurar su eficiencia. Técnicamente resultó complicado y sobre todo costoso por la cantidad de placas de células que implicaba transfectar por condición (control y depletadas de CCDC28B).

Para el análisis de la actividad de Rac, transfectamos 2 placas de 100 mm de células hTERT-RPE con stealth control o stealth de CCDC28B y a las 48 horas levantamos y lisamos las células (juntando las células de ambas placas para cada condición) para realizar las inmunoprecipitaciones seguido de western blot con el anticuerpo contra Rac. A pesar de que en los lisados pareció haber mayor cantidad de RAC total en las células transfectadas con el stealth de CCDC28B, en las inmunoprecipitaciones no observamos diferencias en la cantidad de la forma activa (GTP-RAC) entre las células control (S.CTRL) y las depletadas de CCDC28B (S.CCDC28B) (**Figura 40B**).

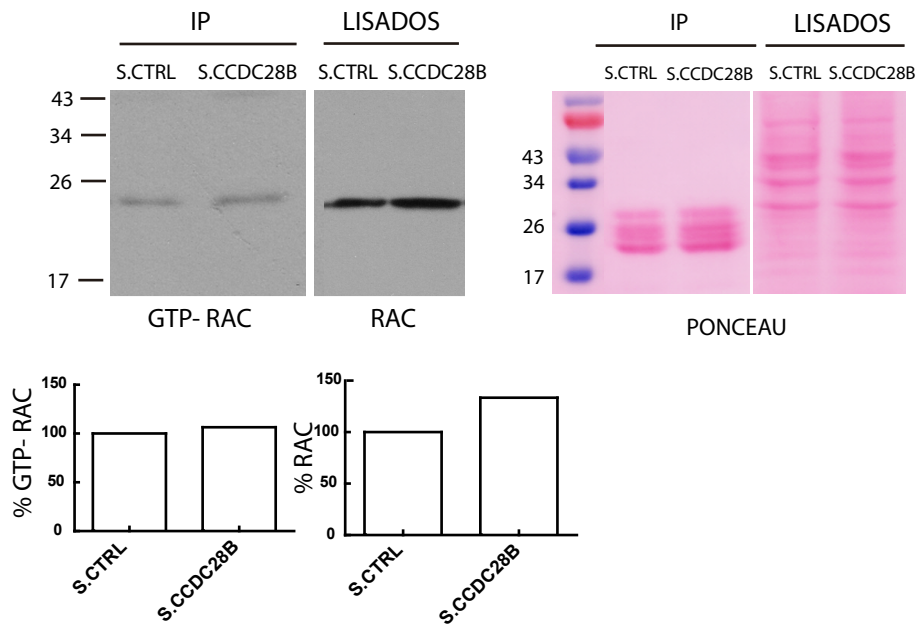
Para RhoA y Cdc42 intentamos la inmunoprecipitación con la mayor cantidad de lisado que pudimos obtener transfectando con stealth control o stealth de CCDC28B 2 placas de 100 mm de cada condición y lisándolas juntas (0,7 mg). No pudimos detectar estas proteínas en ninguna de las condiciones, posiblemente debido a que la cantidad de lisado de proteínas total de la que partimos no fue suficiente. Como observación general, en los lisados totales pareció haber menos expresión de ambas proteínas que en las células depletadas de CCDC28B (**Figuras 41 C y D**).

Figura 41 | Evaluación del estado de activación de las GTPasas Rac, RhoA y Cdc42 en células depletadas de CCDC28B. **A.** Western blot de Rac, RhoA y Cdc42 en diferentes cantidades de lisado de proteínas totales de células hTERT-RPE. Cargar 15 μ m de lisado total fue suficiente para detectar Rac sin dificultad, mientras que 60 y 90 μ m fueron necesarios para detectar una banda tenue de RhoA y Cdc42 respectivamente. **B.** Estado de activación de Rac en células depletadas de CCDC28B mediante ARNi. Se muestra el western blot realizado con el anticuerpo anti Rac de las inmunoprecipitaciones y de los lisados totales con la cuantificación de intensidad de bandas debajo expresada en %. Las imágenes de las mismas membranas usadas en el western blot previamente teñidas con Ponceau se utilizaron para normalizar la cuantificación de bandas. No se ven diferencias en la cantidad de Rac activa entre células control y células depletadas de CCDC28B aunque parece haber mayor cantidad de proteína total en los lisados de estas últimas. **C y D.** Western blot para detectar forma activa de RhoA y Cdc42 respectivamente con sus anticuerpos específicos en lisados inmunoprecipitados y totales. En ambos casos, solo pudimos detectar proteína en los lisados totales pero no logramos inmunoprecipitar la forma activa.

A.

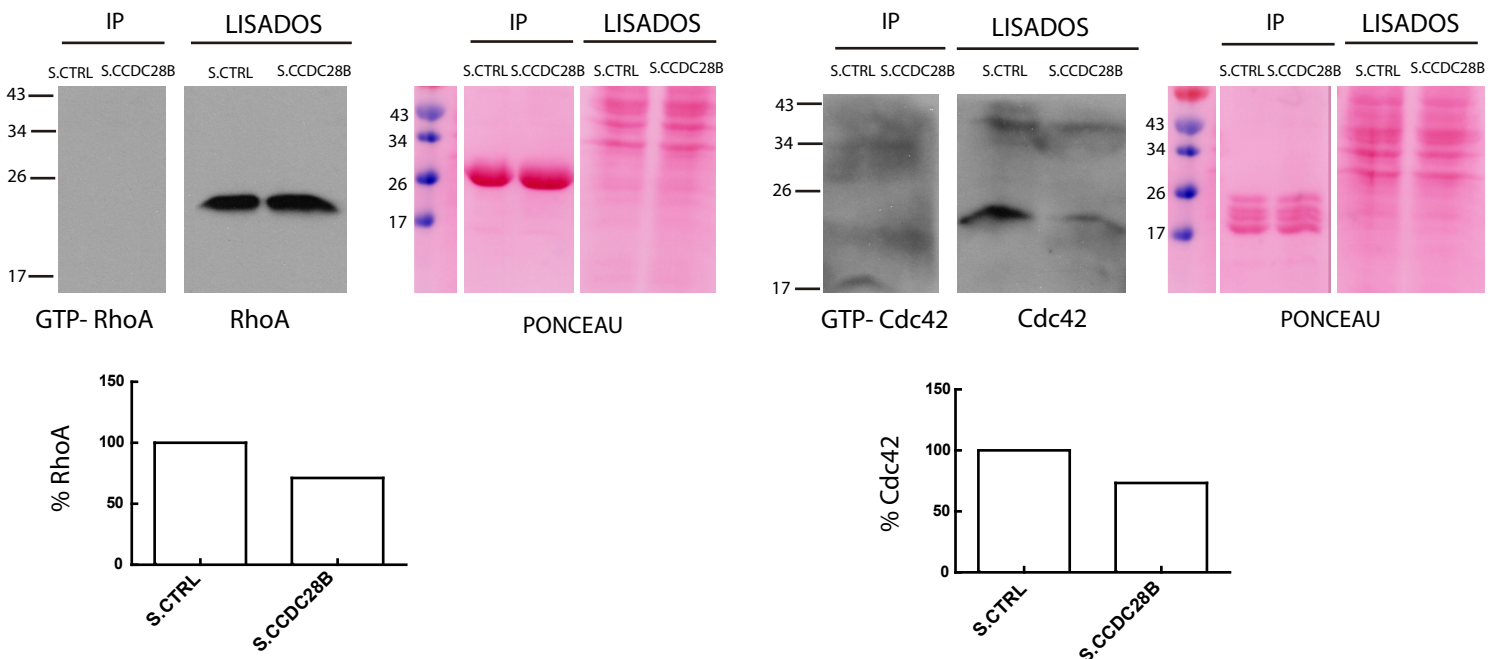


B.



C.

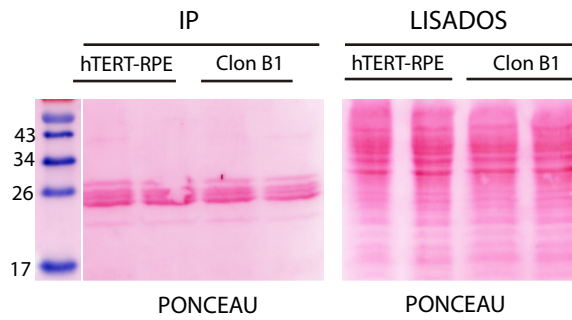
D.



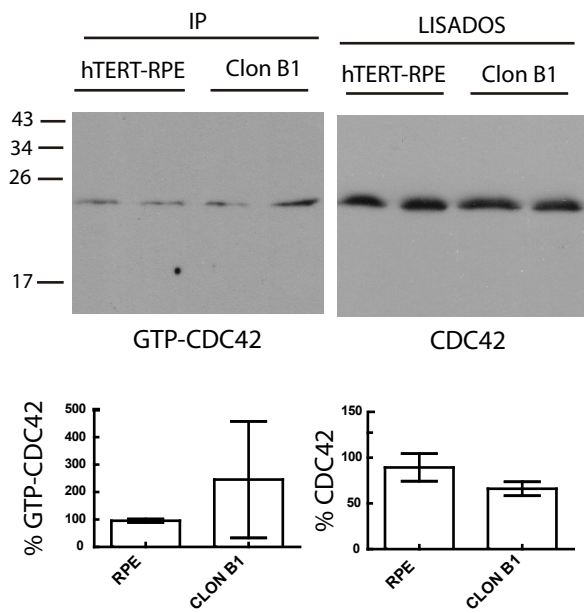
Dada las dificultades técnicas mencionadas, decidimos repetir estos experimentos esta vez utilizando el ClonB1, comparando con células hTERT-RPE como control, en un experimento en duplicado. Al evitarnos la transfección pudimos lisar juntas las células obtenidas de 5 placas de 100 mm para usar en las inmunoprecipitaciones de cada réplica (2,2 mg de proteína total) (**Figura 42A**). Esta vez, la cantidad de lisado utilizada en las inmunoprecipitaciones fue suficiente para detectar tanto RAC como Cdc42 activa (**Figuras 42B y C** respectivamente). Sin embargo nuevamente no logramos detectar RhoA activa (solo RhoA total se muestra en el western blot de los lisados en **Figura 42D**). A pesar de contar con réplicas biológicas en esta oportunidad, tampoco pudimos concluir sobre estos resultados porque en los tres casos, tanto para Rac, como para Cdc42 y RhoA total, las réplicas mostraron una variabilidad importante. Idealmente hubiéramos realizado estos experimentos con triplicados biológicos pero teníamos una limitante de reactivos con el Kit que solo nos permitió realizar duplicados. Para poder concluir será necesario comprar un nuevo Kit y repetir estos experimentos con triplicados biológicos.

Figura 42 | Evaluación del estado de activación de las GTPasas Rac, RhoA y Cdc42 en la línea hTERT-RPE CRISPR para CCDC28B (Clon B1). **A, B y C.** Estado de activación de Rac y Cdc42 en hTERT-RPE y el Clon B1. **A.** Tinción con Ponceau de la membrana de las inmunoprecipitaciones realizadas con las esferas de agarosa fusionadas a PAK1 PBD para inmunoprecipitar Rac y Cdc42 activas y de los lisados totales. Esta tinción se utilizó para normalizar la cuantificación de bandas. **B.** Western blot realizado con el anticuerpo anti Cdc42 de las inmunoprecipitaciones y de los lisados totales con la cuantificación de intensidad de bandas debajo expresada en %. **C.** Se stripeo la membrana y realizó un nuevo western blot con el anticuerpo anti Rac. Debajo se muestra la cuantificación de la intensidad de bandas. **D.** Western blot realizado con el anticuerpo anti RhoA de las inmunoprecipitaciones realizadas con las beads fusionadas a RBD y de los lisados totales con la cuantificación de intensidad de bandas debajo expresada en %.

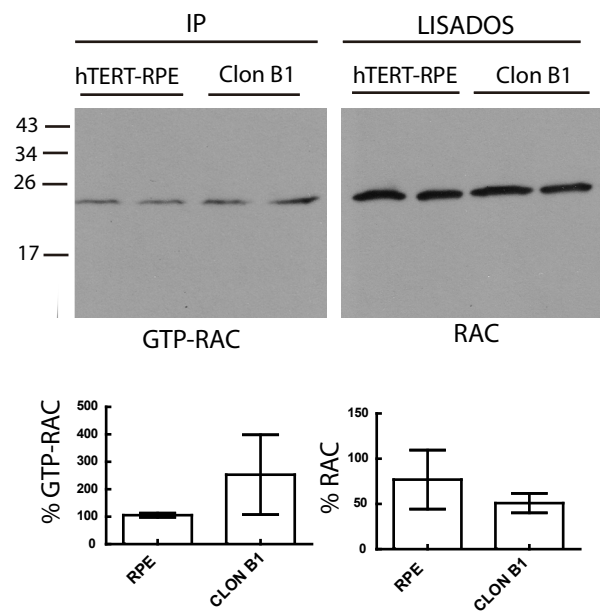
A.



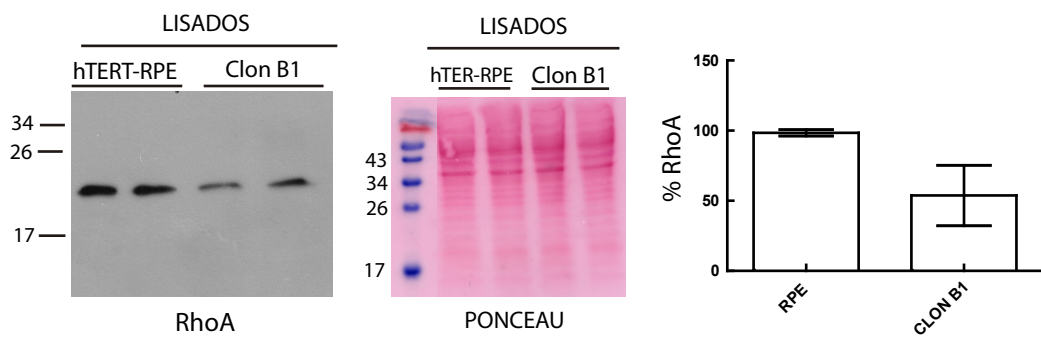
B.



C.



D.

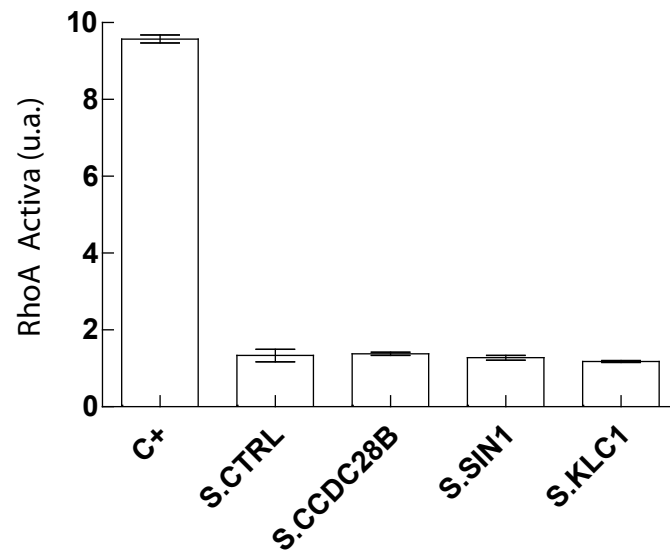


Como mencionamos anteriormente, RhoA era de particular interés dado que es la GTPasa principalmente involucrada en la formación de fibras de estrés, sus niveles se encuentran aumentados en ausencia de otras proteínas BBS (129), y existen reportes de ERK regulando su actividad. Dado que no pudimos detectar RhoA activa con el kit anterior, decidimos probar su detección utilizando un Kit de Cytoskeleton: G-LISA® RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (Cat# BK124-S). Brevemente, el kit contiene la proteína de unión a Rho GTP unida a los pocillos de una placa de 96. La forma activa de RhoA, RhoA-GTP, presente en un lisado celular se une a los pocillos mientras que la forma inactiva RhoA-GDP es removida en sucesivos pasos de lavado. RhoA activa y unida a los pocillos de la placa es detectada con un anticuerpo específico contra RhoA. El grado de activación es determinado comparando las lecturas de absorbancia hechas por espectrometría en los lisados de las diferentes condiciones y el kit a su vez incluye un control positivo que consiste en RhoA-GTPpurificada. Realizamos una primera prueba en células hTERT-RPE transfectadas con el stealth de CCDC28B y decidimos incorporar al análisis también a SIN1 y KLC1 transfectando células con sus stealths respectivos, todos por duplicado. No encontramos diferencias en la cantidad de RhoA activa en ninguna de las condiciones cuando las comparamos con las células de la situación control (células transfectadas con stealth control) (**Figura 43A**). La proteína activa purificada nos sirvió como control general de que el protocolo estaba funcionando correctamente. Para asegurarnos que la sensibilidad del Kit fuera suficiente para detectar cambios quizás sutiles en las cantidades de RhoA activa, decidimos repetir el experimento esta vez incorporando como segundo control positivo células transfectadas con stealths control y tratadas con la droga citocalasina D que se ha reportado puede activar RhoA (217). Dada la limitante de reactivos que proporciona el kit, para poder incluir este control y mantener el experimento con duplicados para cada condición, sacamos del análisis las células depletadas de SIN1 y mantuvimos las transfectadas con stealth de CCDC28 y KLC1 que esperábamos presentaran diferencias en los niveles de RhoA que explicaran su fenotipo de actina opuesto. En esta oportunidad encontramos que tanto las células transfectadas con stealth de CCDC28B como KLC1 presentan mayores niveles de RhoA activada que las células control (S.CTRL), sin embargo no vemos diferencias cuando comparamos estas condiciones

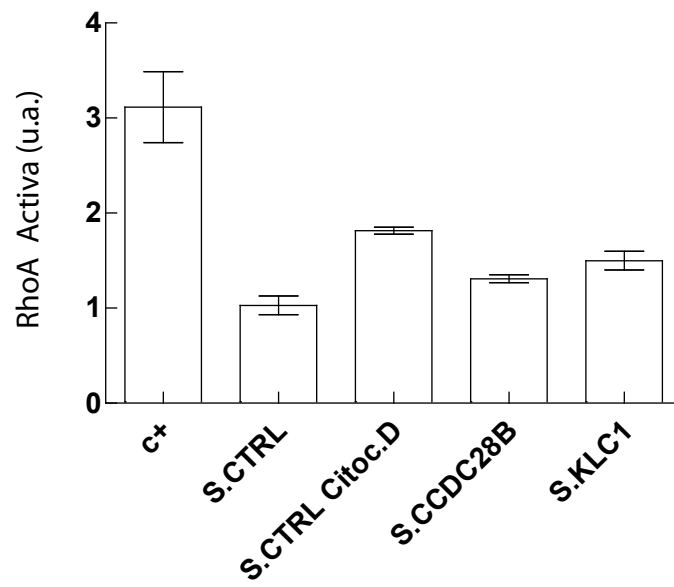
entre sí (**Figura 43B**). Dado que CCDC28B y KLC1 presentan fenotipos de actina opuesto pero parecen cambiar en el mismo sentido la actividad de RhoA, estos resultados indicarían que RhoA no sería un mediador directo de los cambios observados en el esqueleto de actina. Sumado a esto, la citocalasina D también aumenta la actividad de RhoA mostrando que no necesariamente las fibras de estrés son un indicador de la actividad de esta GTPasa. Dicho esto, se ha reportado que la actividad de RhoA puede intervenir tanto para inhibir la elongación de las ciliias como para facilitar su formación (218) por lo que tampoco podemos descartar que de confirmarse estos resultados, puedan ser funcionalmente relevantes.

Figura 43 | Evaluación del estado de activación de la GTPasa RhoA en células hTERT-RPE transfectadas con nuestros stealths de interés. A. Cuantificación de la activación de RhoA comparando las lecturas de absorbancia hechas por espectrometría en los lisados de las diferentes condiciones (C+: control positivo; células transfectadas con: S.CTRL., S.CCDC28B, S.SIN1 y S.KLC1). B. Cuantificación de la activación de RhoA comparando las lecturas de absorbancia hechas por espectrometría en un nuevo experimento donde sustituimos la condición de células transfectadas con S.SIN1 por un control positivo de activación adicional: células transfectadas con S.CTRL y tratadas con citocalasina D. u.a.: unidades arbitrarias.

A.



B.



8.3 Análisis transcriptómico de células depletadas de CCDC28B

Por último, como mencionábamos en la discusión, un dato interesante surgido en el transcurso de esta tesis es que kinesina 1 regula la localización subcelular de CCDC28B inhibiendo su entrada al núcleo. A su vez demostramos que la capacidad de CCDC28B de entrar al núcleo es importante para su función. No conocemos cuál es el rol de CCDC28B en el núcleo, pero una posibilidad es que regule la actividad de SIN1, ya que datos preliminares del laboratorio muestran que en ausencia de CCDC28B, SIN1 queda retenida en el núcleo. Por otro lado, algunas de las proteínas BBS con las que CCDC28B interactúa se ha visto que son capaces de entrar al núcleo y regular la transcripción génica a través de su interacción con factores de transcripción. Dado esto, una posibilidad interesante es que a través de su localización nuclear CCDC28B module la actividad de factores de transcripción que por ejemplo regulen la expresión de genes relacionados con el remodelado del esqueleto de actina o con ciliogénesis en general. En este sentido pensamos que un análisis transcriptómico comparativo (ARN-seq) entre células control y células depletadas de *ccdc28b*, podría aportarnos información relevante.

En colaboración con el Dr. Santhosh Girirajan de Pennsylvania State University realizamos un primer análisis transcriptómico comparativo entre células hTERT-RPE y nuestra línea hTERT-RPE CRISPR CCDC28B (Clon B1). En este análisis se encontraron 618 genes expresados de manera diferencial en la línea hTERT-RPE CRISPR CCDC28B respecto a células de la línea hTERT-RPE. De estos 618, se encontraron 464 genes sub-expresados y 154 sobre-expresados (ver sección materiales y métodos por detalle de como se generaron estos datos). Al total de genes expresados diferencialmente en el Clon B1 se le realizaron distintos análisis ontológicos utilizando la base de datos PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (219) para encontrar procesos biológicos y vías que pudieran estar enriquecidas. Se encontró que la mayor cantidad de genes diferencialmente expresados forman parte de la vía de señalización por cadherina y, seguido en orden de enriquecimiento, genes que forman parte de la vía de WNT (**Figura 44A**). Si hacemos este mismo análisis diferenciado para la lista de genes sub-expresados y sobre-expresados, siguen apareciendo estas vías entre las más representadas en ambos casos (**Figura 44 B y C**), es decir que hay cambios

en la expresión de genes que participan en estas vías en ambos sentidos (sub y sobre expresión). Dado esto es difícil predecir si estas vías se encuentran más o menos activas en el Clon B1 porque va a depender del rol que cumplan cada uno de los genes modificados en la funcionalidad de estas vías.

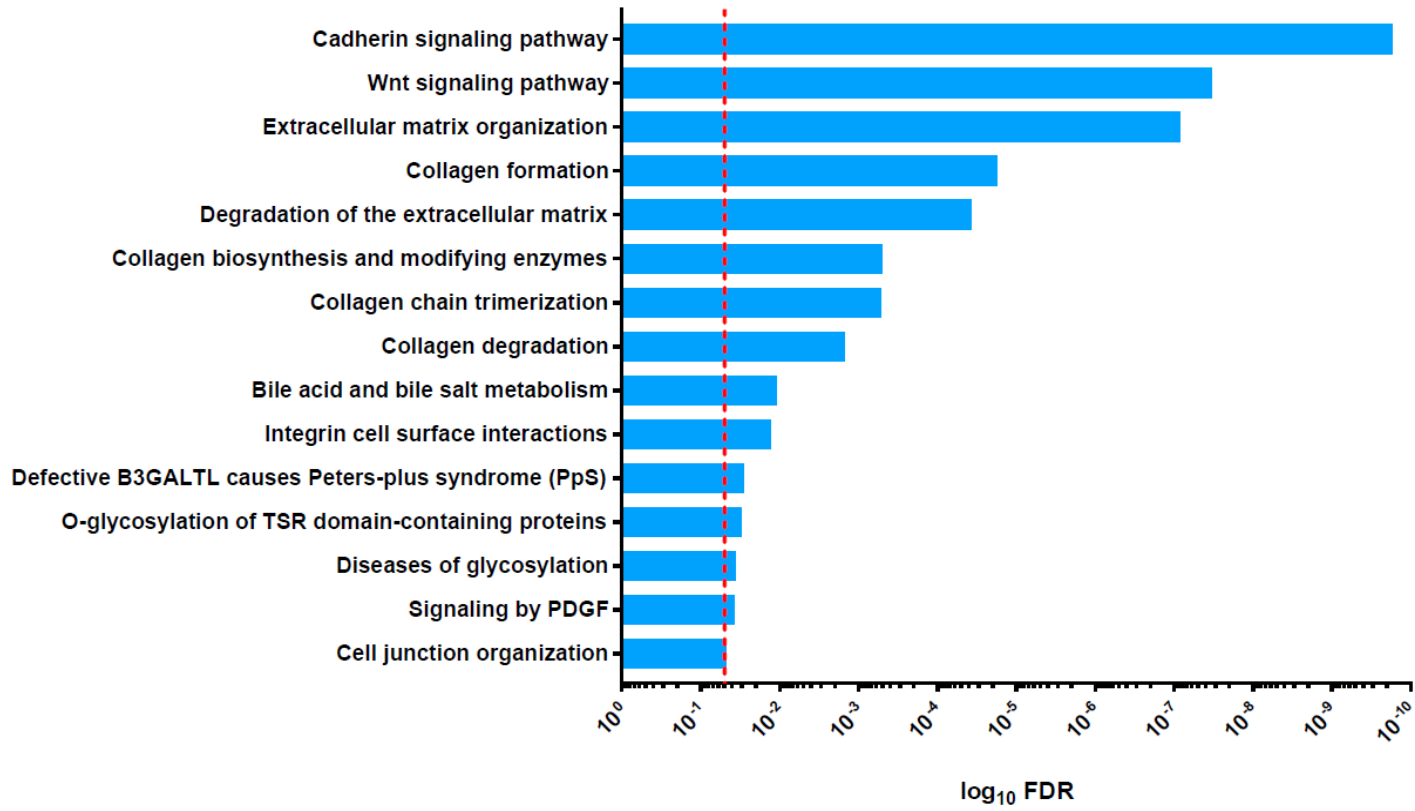
Es interesante que el complejo E cadherina impacta en muchas vías intracelulares entre las que se encuentran las Rhos GTPasas (220) sugiriendo que esta vía podría estar alterada en células depletadas de CCDC28B. A su vez entre los 614 genes con expresión diferencial, encontramos de manera interesante algunos vinculados al remodelado de actina como ARPIN (proteína de inhibición de la proteína relacionada a actina ARP1/2) que se encuentra sub-expresada en el Clon B1.

Este primer experimento exploratorio nos ha dado por lo tanto una lista de genes que resulta interesante y que servirá de base para futuros proyectos del laboratorio que apunten a seguir disecando el mecanismo por el cual CCDC28B regula las cilias.

Figura 44 | Análisis ontológicos de los resultados obtenidos en estudio transcriptómico de células depletadas de CCDC28B (Clon B1) utilizando la base de datos PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) para identificar vías y procesos biológicos enriquecidos. **A.** Se muestra el análisis ontológico de vías enriquecidas para el total de los genes diferencialmente expresados. **B.** Análisis ontológico de vías enriquecidas para los genes que se encontraron sub-expresados y sobre-expresados en el Clon B1 respectivamente. En ambos casos la vía de las cadherinas se encuentra sobre-representada en el conjunto de genes expresados de manera diferencial.

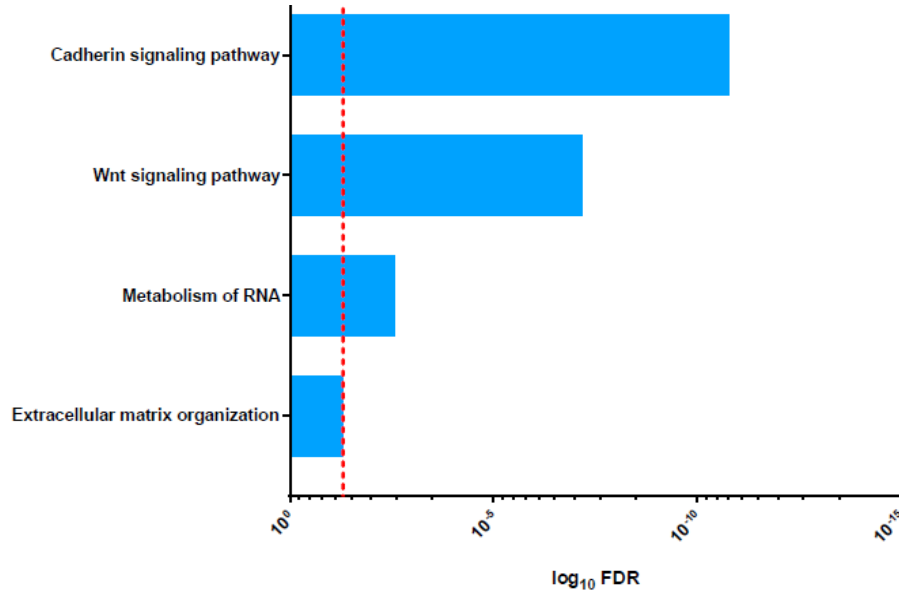
A.

VÍAS ENRIQUECIDAS DEL TOTAL DE GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL

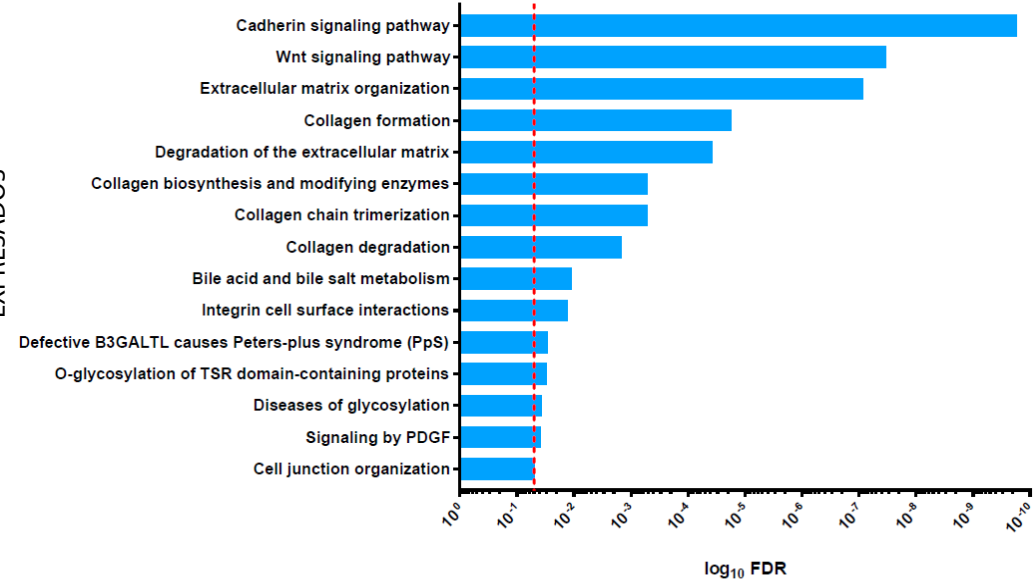


B.

VÍAS ENRIQUECIDAS ENTRE LOS GENES SUB-EXPRESADOS



VÍAS ENRIQUECIDAS ENTRE LOS GENES SUB-EXPRESADOS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Irigoien F, L. Badano J. Keeping the Balance Between Proliferation and Differentiation: The Primary Cilium. *Current Genomics*. 2011 Jun 1;12(4):285–97.
2. Marshall WF. Basal bodies platforms for building cilia. *Curr Top Dev Biol*. 2008;85:1–22.
3. Szymanska K, Johnson CA. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia*. 2012 Jul 2;1(1):10.
4. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep*. 2012 Jul;13(7):608–18.
5. Gilula NB, Satir P. The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol*. 1972 May;53(2):494–509.
6. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011 Apr;12(4):222–34.
7. Sung C-H, Leroux MR. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15(12):1387–97.
8. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci*. 2010 May 15;123(10):1785–95.
9. Benmerah A. The ciliary pocket. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013 Feb 1;25(1):78–84.
10. Ye F, Breslow DK, Koslover EF, Spakowitz AJ, Nelson WJ, Nachury MV. Single molecule imaging reveals a major role for diffusion in the exploration of ciliary space by signaling receptors. Malhotra V, editor. *eLife*. 2013 Aug 6;2:e00654.
11. Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol*. 2009 Nov 2;187(3):365–74.
12. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002 Nov;3(11):813–25.
13. Pedersen LB, Rosenbaum JL. Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT). In: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier; 2008. p. 23–61.
14. Pedersen LB, Mogensen JB, Christensen ST. Endocytic Control of Cellular Signaling at the Primary Cilium. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016 Sep;41(9):784–97.
15. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1533–43.

16. Ma M, Gallagher A-R, Somlo S. Ciliary Mechanisms of Cyst Formation in Polycystic Kidney Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Nov 1;9(11).
17. Gascue C, Katsanis N, Badano JL. Cystic diseases of the kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms. *Pediatr Nephrol.* 2011 Aug;26(8):1181–95.
18. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol.* 2001 Nov 1;184(1):71–9.
19. Praetorius HA, Spring KR. A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:515–29.
20. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol.* 2002 Jun 4;12(11):R378-380.
21. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Oct;13(10):2508–16.
22. Elias RV, Sezate SS, Cao W, McGinnis JF. Temporal kinetics of the light/dark translocation and compartmentation of arrestin and alpha-transducin in mouse photoreceptor cells. *Mol Vis.* 2004 Sep 15;10:672–81.
23. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy Research and Technique.* 1992;23(1):49–61.
24. Kulaga HM, Leitch CC, Eichers ER, Badano JL, Lesemann A, Hoskins BE, et al. Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):994–8.
25. Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature.* 1987 Feb 29;325(6103):442–4.
26. Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* 1990 Aug;9(8):2453–8.
27. Christensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P. Sensory Cilia and Integration of Signal Transduction in Human Health and Disease. *Traffic.* 2007 Feb 1;8(2):97–109.
28. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009 Nov 15;151C(4):263–80.
29. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010 May;11(5):331–44.
30. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980 Oct;287(5785):795–801.

31. Christensen ST, Morthorst SK, Mogensen JB, Pedersen LB. Primary Cilia and Coordination of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) and Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Jun 1;9(6).
32. Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, Pazour GJ, Hoffmann EK, Satir P, et al. PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol.* 2005 Oct 25;15(20):1861–6.
33. Christensen ST, Pedersen SF, Satir P, Veland IR, Schneider L. The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol.* 2008;85:261–301.
34. Schmid FM, Schou KB, Vilhelm MJ, Holm MS, Breslin L, Farinelli P, et al. IFT20 modulates ciliary PDGFR α signaling by regulating the stability of Cbl E3 ubiquitin ligases. *J Cell Biol.* 2018 Jan 2;217(1):151–61.
35. Wallingford JB. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Oct;22(5):597–604.
36. Johnson ML, Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Jun;7(0):41–9.
37. Henderson DJ, Phillips HM, Chaudhry B. Vang-like 2 and noncanonical Wnt signaling in outflow tract development. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Feb;16(2):38–45.
38. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, et al. Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet.* 2005 Oct;37(10):1135–40.
39. Blacque OE, Leroux MR. Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Sep;63(18):2145–61.
40. Morgan D, Eley L, Sayer J, Strachan T, Yates LM, Craighead AS, et al. Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 15;11(26):3345–50.
41. Watanabe D, Saijoh Y, Nonaka S, Sasaki G, Ikawa Y, Yokoyama T, et al. The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development.* 2003 May;130(9):1725–34.
42. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Krönig C, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):537–43.
43. Wallingford JB. Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R227-234.

44. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de S e. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling*. 2018 Mar 20;16(1):11.
45. Bangs F, Anderson KV. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 May 1;9(5).
46. Cohen MM. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*. 2003 Nov 15;123A(1):5–28.
47. Bak M, Hansen C, Tommerup N, Larsen LA. The Hedgehog signaling pathway-- implications for drug targets in cancer and neurodegenerative disorders. *Pharmacogenomics*. 2003 Jul;4(4):411–29.
48. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008 Sep 15;22(18):2454–72.
49. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1018–21.
50. Dummer A, Poelma C, DeRuiter MC, Goumans M-JTH, Hierck BP. Measuring the primary cilium length: improved method for unbiased high-throughput analysis. *Cilia*. 2016 Feb 11;5(1):7.
51. Resnick A, Hopfer U. Force-Response Considerations in Ciliary Mechanosensation. *Biophys J*. 2007 Aug 15;93(4):1380–90.
52. Pan J, Snell WJ. Organelle size: a cilium length signal regulates IFT cargo loading. *Curr Biol*. 2014 Jan 20;24(2):R75-78.
53. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem Jr KF, Kapoor TM, et al. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nature Cell Biology*. 2014 Jul;16(7):663–72.
54. Avasthi P, Marshall WF. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation*. 2012 Feb;83(2):S30-42.
55. Keeling J, Tsiokas L, Maskey D. Cellular Mechanisms of Ciliary Length Control. *Cells*. 2016 Mar;5(1).
56. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet*. 2011 Jul 3;43(8):776–84.
57. Patzke S, Redick S, Warsame A, Murga-Zamalloa CA, Khanna H, Doxsey S, et al. CSPP is a ciliary protein interacting with Nephrocystin 8 and required for cilia formation. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 1;21(15):2555–67.

58. Kim S, Zaghloul NA, Bubenshchikova E, Oh EC, Rankin S, Katsanis N, et al. Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):351–60.
59. Sharma N, Kosan ZA, Stallworth JE, Berbari NF, Yoder BK. Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Mol Biol Cell.* 2011 Mar 15;22(6):806–16.
60. Wang L, Piao T, Cao M, Qin T, Huang L, Deng H, et al. Flagellar regeneration requires cytoplasmic microtubule depolymerization and kinesin-13. *J Cell Sci.* 2013 Mar 15;126(6):1531–40.
61. Omori Y, Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, et al. Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Dec 28;107(52):22671–6.
62. Massinen S, Hokkanen M-E, Matsson H, Tammimies K, Tapia-Páez I, Dahlström-Heuser V, et al. Increased expression of the dyslexia candidate gene DCDC2 affects length and signaling of primary cilia in neurons. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e20580.
63. Pathak N, Obara T, Mangos S, Liu Y, Drummond IA. The pez cebr a fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4353–64.
64. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol.* 2014 Apr;16(4):335–44.
65. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1351–63.
66. Burghoorn J, Dekkers MPJ, Rademakers S, Jong T de, Willemsen R, Jansen G. Mutation of the MAP kinase DYF-5 affects docking and undocking of kinesin-2 motors and reduces their speed in the cilia of *Caenorhabditis elegans*. *PNAS.* 2007 Apr 24;104(17):7157–62.
67. Berman SA, Wilson NF, Haas NA, Lefebvre PA. A novel MAP kinase regulates flagellar length in *Chlamydomonas*. *Curr Biol.* 2003 Jul 1;13(13):1145–9.
68. Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 2005 Mar;55(5):1606–15.
69. Mirvis M, Stearns T, Nelson WJ. Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal.* 2018 Jul 31;475(14):2329–53.
70. Dawe HR, Farr H, Gull K. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of Cell Science.* 2007 Jan 1;120(1):7–15.

71. Vladar EK, Axelrod JD. Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends in Cell Biology*. 2008 Nov 1;18(11):517–20.
72. Farina F, Gaillard J, Guérin C, Couté Y, Sillibourne J, Blanchoin L, et al. The centrosome is an actin-organizing centre. *Nature Cell Biology*. 2016 Jan;18(1):65–75.
73. Kim J, Lee JE, Heynen-Genel S, Suyama E, Ono K, Lee K, et al. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature*. 2010 Apr;464(7291):1048–51.
74. Cao J, Shen Y, Zhu L, Xu Y, Zhou Y, Wu Z, et al. miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nat Cell Biol*. 2012 Jun 10;14(7):697–706.
75. Bershteyn M, Atwood SX, Woo W-M, Li M, Oro AE. MIM and Cortactin Antagonism Regulates Ciliogenesis and Hedgehog Signaling. *Developmental Cell*. 2010 Aug 17;19(2):270–83.
76. Pitaval A, Tseng Q, Bornens M, Théry M. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J Cell Biol*. 2010 Oct 18;191(2):303–12.
77. He Y, Ren Y, Wu B, Decourt B, Lee AC, Taylor A, et al. Src and cortactin promote lamellipodia protrusion and filopodia formation and stability in growth cones. *MBoC*. 2015 Jul 29;26(18):3229–44.
78. Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin Promotes Cell Motility by Enhancing Lamellipodial Persistence. *Current Biology*. 2005 Jul 26;15(14):1276–85.
79. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, et al. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal*. 2015 Nov 24;8(404):ra120–ra120.
80. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell*. 2007 Jul 20;27(2):197–213.
81. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1351–63.
82. Ran J, Yang Y, Li D, Liu M, Zhou J. Deacetylation of α -tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly. *Sci Rep*. 2015 Aug 6;5.
83. Kim J, Jo H, Hong H, Kim MH, Kim JM, Lee J-K, et al. Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking. *Nature Communications*. 2015 Apr 7;6:6781.
84. Yu F-X, Guan K-L. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*. 2013 Feb 15;27(4):355–71.

85. Yan X, Zhu X. Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation. *Experimental Cell Research*. 2013 Jan 15;319(2):147–51.
86. Wu C-T, Chen H-Y, Tang TK. Myosin-Va is required for preciliary vesicle transportation to the mother centriole during ciliogenesis. *Nature Cell Biology*. 2018 Feb;20(2):175.
87. Assis LHP, Silva-Junior RMP, Dolce LG, Alborghetti MR, Honorato RV, Nascimento AFZ, et al. The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L. *Sci Rep*. 2017 07;7:43692.
88. Kohli P, Höhne M, Jüngst C, Bertsch S, Ebert LK, Schauss AC, et al. The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia. *EMBO reports*. 2017 Sep 1;18(9):1521–35.
89. Badano JL, Mitsuima N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:125–48.
90. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol*. 2017 Jan;241(2):294–309.
91. Zaghoul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest*. 2009 Mar;119(3):428–37.
92. Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2013 Jan;21(1):8–13.
93. Carmi R, Elbedour K, Stone EM, Sheffield VC. Phenotypic differences among patients with Bardet-Biedl syndrome linked to three different chromosome loci. *Am J Med Genet*. 1995 Nov 6;59(2):199–203.
94. Riise R, Andreasson S, Borgstrom M, Wright A, Tommerup N, Rosenberg T, et al. Intrafamilial variation of the phenotype in Bardet-Biedl syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1997 May;81(5):378–85.
95. Heon E, Kim G, Qin S, Garrison JE, Tavares E, Vincent A, et al. Mutations in cause Bardet Biedl syndrome (BBS21). *Human Molecular Genetics*. 2016 Jun 1;25(11):2283–94.
96. Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, et al. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):628–33.
97. Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, May-Simera H, Lawson S, Lewis RA, et al. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*. 2006 Jan 19;439(7074):326–30.
98. Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, et al. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet*. 2004 Sep;36(9):989–93.

99. Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, et al. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nature Genetics*. 2004 May;36(5):462–70.
100. Kim JC, Ou YY, Badano JL, Esmail MA, Leitch CC, Fiedrich E, et al. MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci*. 2005 Mar 1;118(Pt 5):1007–20.
101. Loktev AV, Zhang Q, Beck JS, Searby CC, Scheetz TE, Bazan JF, et al. A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell*. 2008 Dec;15(6):854–65.
102. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1201–13.
103. Ou G, Blacque O, Snow JJ, Leroux MR, Scholey JM. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature*. 2005 Jul;436(7050):583–7.
104. Wei Q, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ling K, Hu J. The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nature Cell Biology*. 2012 Sep;14(9):950–7.
105. Jin H, White SR, Shida T, Schulz S, Aguiar M, Gygi SP, et al. The conserved Bardet-Biedl Syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1208–19.
106. Moritz OL, Tam BM, Hurd LL, Peränen J, Deretic D, Papermaster DS. Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic *Xenopus* rods. *Mol Biol Cell*. 2001 Aug;12(8):2341–51.
107. Berbari NF, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, Mykityn K. Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Mar 18;105(11):4242–6.
108. Zhang Q, Nishimura D, Seo S, Vogel T, Morgan DA, Searby C, et al. Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Dec 20;108(51):20678–83.
109. Klink BU, Zent E, Juneja P, Kuhlee A, Raunser S, Wittinghofer A. A recombinant BBSome core complex and how it interacts with ciliary cargo. *eLife*. 2017 Nov 15;6.
110. Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury MV, et al. A Novel Protein LZTFL1 Regulates Ciliary Trafficking of the BBSome and Smoothed. *PLOS Genetics*. 2011 Nov 3;7(11):e1002358.

111. Lechtreck KF, Brown JM, Sampaio JL, Craft JM, Shevchenko A, Evans JE, et al. Cycling of the signaling protein phospholipase D through cilia requires the BBSome only for the export phase. *J Cell Biol.* 2013 Apr 15;201(2):249–61.
112. Lechtreck K-F, Johnson EC, Sakai T, Cochran D, Ballif BA, Rush J, et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. *J Cell Biol.* 2009 Dec 28;187(7):1117–32.
113. Liew GM, Ye F, Nager AR, Murphy JP, Lee JS, Aguiar M, et al. The Intraflagellar Transport Protein IFT27 Promotes BBSome Exit from Cilia through the GTPase ARL6/BBS3. *Developmental Cell.* 2014 Nov 10;31(3):265–78.
114. Ye F, Nager AR, Nachury MV. BBSome trains remove activated GPCRs from cilia by enabling passage through the transition zone. *J Cell Biol.* 2018 May 7;217(5):1847–68.
115. Domire JS, Green JA, Lee KG, Johnson AD, Askwith CC, Mykytyn K. Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Sep 1;68(17):2951–60.
116. Nachury MV. The molecular machines that traffic signaling receptors into and out of cilia. *Current Opinion in Cell Biology.* 2018 Apr;51:124–31.
117. Nager AR, Goldstein JS, Herranz-Pérez V, Portran D, Ye F, Garcia-Verdugo JM, et al. An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell.* 2017 Jan 12;168(1–2):252–263.e14.
118. Aldahmesh MA, Li Y, Alhashem A, Anazi S, Alkuraya H, Hashem M, et al. IFT27, encoding a small GTPase component of IFT particles, is mutated in a consanguineous family with Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 15;23(12):3307–15.
119. Eguether T, San Agustin JT, Keady BT, Jonassen JA, Liang Y, Francis R, et al. IFT27 Links the BBSome to IFT for Maintenance of the Ciliary Signaling Compartment. *Developmental Cell.* 2014 Nov 10;31(3):279–90.
120. Zhang Q, Seo S, Bugge K, Stone EM, Sheffield VC. BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2012 May 1;21(9):1945–53.
121. Gerdes JM, Liu Y, Zaghoul NA, Leitch CC, Lawson SS, Kato M, et al. Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet.* 2007 Nov;39(11):1350–60.
122. Seo S, Baye LM, Schulz NP, Beck JS, Zhang Q, Slusarski DC, et al. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Jan 26;107(4):1488–93.
123. Novas R, Cardenas-Rodriguez M, Irigoín F, Badano JL. Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett.* 2015 Nov 14;589(22):3479–91.

124. Leitch CC, Lodh S, Prieto-Echagüe V, Badano JL, Zaghoul NA. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci.* 2014 Jun 1;127(Pt 11):2407–19.
125. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Activity and Regulation of the Centrosome-associated Proteasome. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Jan 7;275(1):409–13.
126. Liu YP, Tsai I-C, Morleo M, Oh EC, Leitch CC, Massa F, et al. Ciliopathy proteins regulate paracrine signaling by modulating proteasomal degradation of mediators. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2059–70.
127. Gascue C, Tan PL, Cardenas-Rodriguez M, Libisch G, Fernandez-Calero T, Liu YP, et al. Direct role of Bardet–Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation. *J Cell Sci.* 2012 Jan 15;125(2):362–75.
128. Scott CA, Marsden AN, Rebagliati MR, Zhang Q, Chamling X, Searby CC, et al. Nuclear/cytoplasmic transport defects in BBS6 underlie congenital heart disease through perturbation of a chromatin remodeling protein. *PLOS Genetics.* 2017 Jul 28;13(7):e1006936.
129. Hernandez-Hernandez V, Pravin Kumar P, Diaz-Font A, May-Simera H, Jenkins D, Knight M, et al. Bardet-Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 1;22(19):3858–68.
130. Alexiev BA, Lin X, Sun C-C, Brenner DS. Meckel-Gruber Syndrome: Pathologic Manifestations, Minimal Diagnostic Criteria, and Differential Diagnosis. :3.
131. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet.* 2008 Apr;40(4):443–8.
132. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, et al. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell.* 2004 May 14;117(4):541–52.
133. Gherman A, Davis EE, Katsanis N. The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):961–2.
134. Cardenas-Rodriguez M, Osborn DPS, Irigoín F, Graña M, Romero H, Beales PL, et al. Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet–Biedl syndrome. *Hum Genet.* 2013 Jan 1;132(1):91–105.
135. Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 2001 Feb;11(2):82–8.
136. Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol.* 2004 Mar 26;337(3):635–45.

137. Dinkel H, Michael S, Weatheritt RJ, Davey NE, Van Roey K, Altenberg B, et al. ELM--the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40(Database issue):D242-251.
138. Cardenas-Rodriguez M, Irigoín F, Osborn DPS, Gascue C, Katsanis N, Beales PL, et al. The Bardet–Biedl syndrome-related protein CCDC28B modulates mTORC2 function and interacts with SIN1 to control cilia length independently of the mTOR complex. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 15;22(20):4031–42.
139. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589–94.
140. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):274–93.
141. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.* 2011 Jul 15;10(14):2305–16.
142. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098–101.
143. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Apr 4;103(14):5466–71.
144. DiBella LM, Park A, Sun Z. Pez cebra Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb 15;18(4):595–606.
145. Yuan S, Li J, Diener DR, Choma MA, Rosenbaum JL, Sun Z. Target-of-rapamycin complex 1 (Torc1) signaling modulates cilia size and function through protein synthesis regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Feb 7;109(6):2021–6.
146. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Brecht S, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol.* 2010 Nov;12(11):1115–22.
147. Wilkinson MG, Pino TS, Tournier S, Buck V, Martin H, Christiansen J, et al. Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4210–21.
148. Schroder W, Bushell G, Sculley T. The human stress-activated protein kinase-interacting 1 gene encodes JNK-binding proteins. *Cellular Signalling.* 2005 Jun 1;17(6):761–7.
149. Schroder W, Cloonan N, Bushell G, Sculley T. Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene.* 2004 Sep 15;339:17–23.

150. Cheng J, Zhang D, Kim K, Zhao Y, Zhao Y, Su B. Mip1, an MEKK2-interacting protein, controls MEKK2 dimerization and activation. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul;25(14):5955–64.
151. Kesavan K, Lobel-Rice K, Sun W, Lapadat R, Webb S, Johnson GL, et al. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2004 Apr;199(1):140–8.
152. Schroder WA, Buck M, Cloonan N, Hancock JF, Suhrbier A, Sculley T, et al. Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell Signal.* 2007 Jun;19(6):1279–89.
153. Vaart A van der, Rademakers S, Jansen G. DLK-1/p38 MAP Kinase Signaling Controls Cilium Length by Regulating RAB-5 Mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics.* 2015 dic;11(12):e1005733.
154. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* 1985 Aug;42(1):39–50.
155. Hirokawa N, Noda Y. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev.* 2008 Jul;88(3):1089–118.
156. Woźniak MJ, Allan VJ. Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J.* 2006 Nov 29;25(23):5457–68.
157. Basten SG, Giles RH. Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. *Cilia.* 2013 Apr 29;2(1):6.
158. Yang J, Li T. The ciliary rootlet interacts with kinesin light chains and may provide a scaffold for kinesin-1 vesicular cargos. *Experimental Cell Research.* 2005 Oct 1;309(2):379–89.
159. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Oct;10(10):682–96.
160. Hirokawa N, Tanaka Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp Cell Res.* 2015 May 15;334(1):16–25.
161. Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD. Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell.* 2011 Jun 10;145(6):914–25.
162. Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, et al. The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Rep.* 2015 Feb 4;
163. Niwa S, Nakajima K, Miki H, Minato Y, Wang D, Hirokawa N. KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Developmental Cell.* 2012 Dec;23(6):1167–75.

164. Dawson SC, Sagolla MS, Mancuso JJ, Woessner DJ, House SA, Fritz-Laylin L, et al. Kinesin-13 Regulates Flagellar, Interphase, and Mitotic Microtubule Dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*. 2007 Dec 1;6(12):2354–64.
165. Piao T, Luo M, Wang L, Guo Y, Li D, Li P, et al. A microtubule depolymerizing kinesin functions during both flagellar disassembly and flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *PNAS*. 2009 Mar 24;106(12):4713–8.
166. Wang L, Piao T, Cao M, Qin T, Huang L, Deng H, et al. Flagellar regeneration requires cytoplasmic microtubule depolymerization and kinesin-13. *J Cell Sci*. 2013 Mar 15;126(6):1531–40.
167. Vasudevan KK, Jiang Y-Y, Lechtreck KF, Kushida Y, Alford LM, Sale WS, et al. Kinesin-13 regulates the quantity and quality of tubulin inside cilia. *MBoC*. 2014 Dec 10;26(3):478–94.
168. Schou KB, Mogensen JB, Morthorst SK, Nielsen BS, Aleliunaite A, Serra-Marques A, et al. KIF13B establishes a CAV1-enriched microdomain at the ciliary transition zone to promote Sonic hedgehog signalling. *Nature Communications*. 2017 Jan 30;8:14177.
169. Kanai Y, Wang D, Hirokawa N. KIF13B enhances the endocytosis of LRP1 by recruiting LRP1 to caveolae. *J Cell Biol*. 2014 Feb 3;204(3):395–408.
170. Lee KH, Johmura Y, Yu L-R, Park J-E, Gao Y, Bang JK, et al. Identification of a novel Wnt5a-CK1 ϵ -Dvl2-Plk1-mediated primary cilia disassembly pathway. *EMBO J*. 2012 May 18;31(14):3104–17.
171. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775–97.
172. Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G, González-Sapienza G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jul;1850(7):1397–404.
173. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676–82.
174. Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*. 2011 Sep 1;27(17):2453–4.
175. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the pez cebra. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3):253–310.
176. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin J-D, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Oct;12(10):982–8.

177. Jao L-E, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic pez cebra genome editing using a CRISPR nuclease system. *PNAS*. 2013 Aug 20;110(34):13904–9.
178. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, et al. mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*. 2006 Sep 19;16(18):1865–70.
179. Abdul-Majeed S, Moloney BC, Nauli SM. Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jan 1;69(1):165–73.
180. Stealth RNAi siRNAs | Thermo Fisher Scientific - UK Available from: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/rnai/synthetic-rnai-analysis/stealth-rnai-technology.html>
181. Villumsen BH, Danielsen JR, Povlsen L, Sylvestersen KB, Merdes A, Beli P, et al. A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. *EMBO J*. 2013 Nov 27;32(23):3029–40.
182. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017 Jul 13;13(7).
183. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015 Aug 13;524(7564):230–3.
184. Pubchem. Anisomycin. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/253602>
185. Kunova Bosakova M, Varecha M, Hampl M, Duran I, Nita A, Buchtova M, et al. Regulation of ciliary function by fibroblast growth factor signaling identifies FGFR3-related disorders achondroplasia and thanatophoric dysplasia as ciliopathies. *Hum Mol Genet*. 2018 Mar 15;27(6):1093–105.
186. Neugebauer JM, Amack JD, Peterson AG, Bisgrove BW, Yost HJ. FGF Signaling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature*. 2009 Apr 2;458(7238):651–4.
187. Pubchem. U0126 Ethanolate. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16220066>
188. Nagaria TS, Shi C, Leduc C, Hoskin V, Sikdar S, Sangrar W, et al. Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(46):80804–19.
189. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem Jr KF, Kapoor TM, et al. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nature Cell Biology*. 2014 Jun 22;16:663.
190. Davis EE, Katsanis N. The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2012 Jun 1;22(3):290–303.

191. Niwa S, Nakajima K, Miki H, Minato Y, Wang D, Hirokawa N. KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Developmental Cell*. 2012 Dec;23(6):1167–75.
192. Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB, Yost HJ. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the pez cebra embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*. 2005 Mar;132(6):1247–60.
193. Gakovic M, Shu X, Kasioulis I, Carpanini S, Moraga I, Wright AF. The role of RPGR in cilia formation and actin stability. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 15;20(24):4840–50.
194. Pubchem. Cytochalasin D. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5458428>
195. Casella JF, Flanagan MD, Lin S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*. 1981 Sep;293(5830):302.
196. You B, Yang Y-L, Xu Z, Dai Y, Liu S, Mao J-H, et al. Inhibition of ERK1/2 down-regulates the Hippo/YAP signaling pathway in human NSCLC cells. *Oncotarget*. 2015 Jan 23;6(6):4357–68.
197. Wang S, Wei Q, Dong G, Dong Z. ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1582–90.
198. Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z. Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. *PLOS ONE*. 2016 ene;11(1):e0147103.
199. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):509–14.
200. Aspenström P. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*. 1999 Jan 10;246(1):20–5.
201. Zuo X, Fogelgren B, Lipschutz JH. The Small GTPase Cdc42 Is Necessary for Primary Ciliogenesis in Renal Tubular Epithelial Cells. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):22469–77.
202. Elias BC, Das A, Parekh DV, Mernaugh G, Adams R, Yang Z, et al. Cdc42 regulates epithelial cell polarity and cytoskeletal function during kidney tubule development. *J Cell Sci*. 2015 Dec 1;128(23):4293–305.
203. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. GLI activation by atypical protein kinase C ι/λ regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature*. 2013 Feb 28;494(7438):484–8.
204. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, et al. The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):221–31.

205. Ho H-YH, Rohatgi R, Lebensohn AM, Ma L, Li J, Gygi SP, et al. Toca-1 Mediates Cdc42-Dependent Actin Nucleation by Activating the N-WASP-WIP Complex. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):203–16.
206. Drummond ML, Li M, Tarapore E, Nguyen TTL, Barouni BJ, Cruz S, et al. Actin polymerization controls cilia-mediated signaling. *The Journal of Cell Biology*. 2018 Sep 3;217(9):3255–66.
207. Daire V, Giustiniani J, Leroy-Gori I, Quesnoit M, Drevensek S, Dimitrov A, et al. Kinesin-1 Regulates Microtubule Dynamics via a c-Jun N-terminal Kinase-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Nov 13;284(46):31992–2001.
208. Miyoshi K, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Katayama T, Tohyama M, et al. DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004 May 14;317(4):1195–9.
209. Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet*. 2003 Jul 1;12(13):1591–608.
210. Taya S, Shinoda T, Tsuboi D, Asaki J, Nagai K, Hikita T, et al. DISC1 Regulates the Transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3 ϵ Complex through Kinesin-1. *J Neurosci*. 2007 Jan 3;27(1):15–26.
211. Gascue C, Tan PL, Cardenas-Rodriguez M, Libisch G, Fernandez-Calero T, Liu YP, et al. Direct role of Bardet–Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation. *J Cell Sci*. 2012 Jan 15;125(2):362–75.
212. Rosner M, Hengstschläger M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 1;17(19):2934–48.
213. Yuan Y, Pan B, Sun H, Chen G, Su B, Huang Y. Characterization of Sin1 Isoforms Reveals an mTOR-Dependent and Independent Function of Sin1 γ . *PLOS ONE*. 2015 ago;10(8):e0135017.
214. Jin H, White SR, Shida T, Schulz S, Aguiar M, Gygi SP, et al. The conserved Bardet-Biedl Syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell*. 2010 Jun 25;141(7):1208–19.
215. Stowe TR, Wilkinson CJ, Iqbal A, Stearns T, Zheng Y. The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *MBoC*. 2012 Jul 5;23(17):3322–35.
216. Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr*. 2011;5(2):170–80.
217. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J*. 1999 Feb 1;18(3):578–85.

218. Pan J, You Y, Huang T, Brody SL. RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *Journal of Cell Science*. 2007 Jun 1;120(11):1868–76.
219. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D183–9.
220. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):509–14.