

Universidad de la República
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
Área Biología

Tesis presentada para acceder al
Doctorado en Ciencias Biológicas

Caracterización del rol biológico de CCDC28B,
un modificador secundario del
síndrome de Bardet-Biedl

MSc. Magdalena Cárdenas Rodríguez

Laboratorio de Genética Molecular Humana
Institut Pasteur de Montevideo

Orientador:

Dr. José Luis Badano

Tribunal

Presidente: Dra. Silvia Schifflet

Vocales: Dra. Kathleen Whitlock
Dr. Flavio Zolessi

INDICE

- Resumen	1
- Introducción	4
- Cilias y Flagelos	5
- Estructura y Clasificación de Cilias	7
- Características del axonema	8
- Zona de transición	11
- Características de la membrana ciliar	13
- Ciliogénesis y estructura del centríolo/cuerpo basal	13
- Establecimiento y mantenimiento de la estructura ciliar: el Transporte Intraflagelar	17
- Mecanismos de transporte hacia la cilia y secuencias señal	21
- Secuencias señal	25
- Funciones asociadas con las cilias	26
- Funciones asociadas con el movimiento de las cilias	26
- Función sensorial de las cilias primarias: vías de señalización intracelular	32
- Vía de Hedgehog	32
- Vía de Wnt	36
- Vía de PDGF α	40
- mTOR: una nueva vía asociada a las cilias	41
- Generalidades sobre la vía de mTOR	41
- Complejo mTOR1 (mTORC1)	44
- Complejo mTOR2 (mTORC2)	45
- mTOR y cilias	46
- Consecuencias de la alteración funcional de las cilias: las ciliopatías	50
- Síndrome de Bardet-Biedl: un modelo de ciliopatía	53
- Función de las proteínas BBS	56
- Genes modificadores	60
- <i>CCDC28B</i>	61

- Objetivo General	64
- Objetivos específicos	64
- Resultados	65
- Parte A_ Estudios bioinformáticos de CCDC28B	66
- Estructura génica y transcritos	66
- Conservación entre especies	74
- Análisis de dominios proteicos	80
- Parte B_Relación entre CCDC28B y las cilias primarias	82
- La inhibición de la expresión de CCDC28B afecta ciliogénesis en células en cultivo	82
- Análisis de la función ciliar de CCDC28B <i>in vivo</i>	85
- Relación de CCDC28B y las cilias en el pez cebra: caracterización del ortólogo de CCDC28B en el pez cebra	85
- Puesta a punto de un morfolino y caracterización de los morfantes <i>ccdc28b</i>	88
- La inhibición de la expresión de <i>Ccdc28b</i> resulta en defectos a nivel de las cilias <i>in vivo</i>	92
- Parte C_ Entendiendo el rol biológico de CCDC28B a nivel celular y molecular: implicancias a nivel de las cilias	98
- Determinación de interactores de CCDC28B	98
- Ensayo de doble híbrido en levadura	98
- CCDC28B interactúa con SIN1 en células de mamíferos	101
- CCDC28B regula la actividad de mTORC2	105
- Efectos de la función reguladora de CCDC28B sobre mTORC2	111
- Mecanismo de regulación de CCDC28B sobre mTORC2	117
- Niveles de expresión de componentes mTORC	117
- Caracterización de la interacción CCDC28B con mTOR <i>in vivo</i>	120
- ¿CCDC28B regula el ensamblado o estabilidad del complejo mTOR2?	128
- ¿Cómo CCDC28B regula el ensamblado del complejo mTOR2?	130

- Parte D_Vinculando CCDC28B/SIN1 y ciliogénesis	133
- ¿CCDC28B afecta ciliogénesis a través de su interacción con SIN1 y la regulación de mTORC2?	133
- Experimentos con rapamicina	133
- Estudio de la relación CCDC28B/mTORC2/ciliogénesis: bloqueo específico de mTORC1 o mTORC2 en embriones de pez cebra ---	140
- Diseño y puesta a punto de las dosis de los morfolinos	140
- Evaluación de la ciliogénesis en los morfantes de <i>raptor</i> , <i>sin1</i> y <i>ricor</i>	144
- Parte E_Estudio de la localización de CCDC28B	159
- Producción de un suero inmune contra CCDC28B	161
- Producción de nuevos anticuerpos contra CCDC28B	168
- Puesta a punto de nuevos anticuerpos contra CCDC28B: Ensayos de Western Blot	170
- Puesta a punto de nuevos anticuerpos contra CCDC28B: Ensayos de inmunocitoquímica	184
- Parte F_Generación de una línea de ratón Knock-out para <i>Ccdc28b</i> ---	195
- Vector	195
- Generación y selección de clones de células ES modificadas ---	199
- Microinyección de células ES en blastocistos murinos. Generación de la Fo	206
- Análisis de la transmisión de la modificación genética a la descendencia. Generación de la F1	209
- Generación de la F2	211
- Discusión	212
- Vinculando a CCDC28B con la biología de las cilias: CCDC28B es una proteína conservada en los metazoos ciliados	213
- CCDC28B es una nueva proteína asociada a la regulación de la ciliogénesis	216
- Profundizando en el mecanismo por el cual CCDC28B regula el proceso de ciliogénesis	217

- Conclusiones y perspectivas	226
- Materiales y Métodos	230
- Búsqueda de secuencias y análisis filogenéticos	231
- Cultivos celulares	231
- Medios y condiciones de crecimiento	231
- Preparación a gran escala de plásmidos	232
- Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	232
- Purificación de plásmidos	232
- Geles de agarosa	233
- PCR (Polimerase Chain Reaction)	233
- Clonado en vectores de expresión	235
- Transfección transitoria con ADN plasmídico	235
- Inhibición de la expresión de genes en células de mamíferos	236
- Sistema pSUPER (OligoEngine)	236
- Sistema Stealth RNAi siRNAs de Invitrogen	236
- Sobre-expresión de genes en células de mamíferos	237
- Extracción de ARN y síntesis de ADN copia (ADNc)	238
- Extracción de ARN de células en cultivo (placa 35 mm)	238
- Síntesis de ADN copia (ADNc)	238
- Real-Time PCR (RT-PCR)	238
- Inmunocitoquímica (IC)	239
- Microscopía	240
- Cuantificación del largo de las cilias	240
- Procesamiento de imágenes	240
- Extracción de proteínas de cultivos celulares	241
- Dosificación de proteínas	241
- Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia	242
- Western Blot	242
- Identificación de proteínas por medio de MALDI-TOF-TOF	243
- Ensayo de doble híbrido en levaduras	244
- Inmunoprecipitaciones	245
- Ensayo de ciclo celular	245

- Ensayo de proliferación celular -----	246
- Ensayo de inhibición del proteasoma -----	246
- Cultivo, electroporación y selección de clones de células madre embrionarias de ratón -----	247
- Extracción de ADN de clones de células madre embrionarias de ratón -----	247
- Southern Blot -----	248
- Preparación de la sonda radioactiva -----	248
- Hibridación y autoradiografía -----	248
- Extracción de ADN genómico a partir de segmento de cola de ratón -	249
- Composición y preparación de soluciones utilizadas -----	249
- El pez cebra: un modelo animal para el estudio de las ciliopatías -----	252
- Inhibición de la expresión de genes en embriones de pez cebra -----	255
- Análisis de las ciliias en el pez cebra -----	259
- Vesícula de Kupffer -----	259
- Pronefros -----	260
- Cría, mantenimiento y obtención de embriones de pez cebra -	260
- Morfolinos utilizados -----	261
- Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra -----	261
- Extracción de ARN de embriones de pez cebra -----	262
- Síntesis de ADN copia (ADNc) -----	262
- Hibridación <i>in situ</i> en embriones del pez cebra -----	262
- Ensayo de funcionalidad de pronefros: inyección de dextrano de rodamina -----	264
- Inmunofluorescencia en embriones (<i>in toto</i> o “wholemout”) -----	264
- Tinción de cartílagos con Azul Alcian (Alcian Blue) -----	265
- Tinción de los filamentos de actina de las fibras musculares ---	266
- Extracción de proteínas de embriones de pez cebra -----	266
- Administración de Rapamicina a los embriones de pez cebra --	267
- Composición y preparación de soluciones utilizadas -----	267

- Metilcelulosa 3%-----	267
- PTU (1-phenyl 2-thiourea)-----	267
- Referencias Bibliográficas -----	268
- Agradecimientos -----	296
- Publicaciones científicas -----	297

Resumen

Las cilias primarias son organelos celulares, estructuralmente similares a los flagelos, que consisten de proyecciones a partir de la superficie celular, compuestas por un esqueleto de microtúbulos (denominado axonema ciliar) y rodeadas por una bicapa lipídica continua con la membrana plasmática. La formación de las cilias, proceso llamado ciliogénesis, ocurre a partir de un cuerpo basal, el cual consiste de un centríolo modificado proveniente del centrosoma y localizado en la base de las cilias. Debido a esto, las cilias presentan una estrecha asociación con el ciclo celular, siendo estructuras post-mitóticas que están presentes en células que se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo y que son reabsorbidas una vez que la célula comienza a ciclar. Su función principal es actuar como centros de sensado, recepción y transducción tanto de estímulos mecánicos y químicos así como de vías de señalización que son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos y órganos, tales como la vía de Hedgehog, Wnt, y PDGF α , entre otras. Este rol central en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, sumado al descubrimiento de que defectos en su ensamblaje o función provocan la aparición de un amplio espectro de enfermedades humanas colectivamente llamadas ciliopatías, ha determinado un aumento explosivo en el interés de la comunidad científica. Un modelo de ciliopatía es el síndrome de Bardet-Biedl (BBS), desorden humano pleiotrópico caracterizado principalmente por obesidad, polidactilia, retardo mental, degeneración de retina, y malformaciones renales. BBS es un trastorno genéticamente heterogéneo para el cual a la fecha se han identificado 17 genes causales. Si bien en general es heredado presentando un patrón compatible con el de una enfermedad autosómica recesiva, en algunas familias el síndrome se comporta como un rasgo oligogénico. En estas familias con patrones de herencia más complejos se ha visto que mutaciones en más de un gen pueden modular tanto la penetrancia como la expresividad del síndrome. A su vez, se han identificado modificadores secundarios para los cuales no hay evidencia de que sean suficientes para causar el síndrome pero sí modulan la expresividad de las distintas manifestaciones clínicas de BBS, lo que aumenta la complejidad genética que caracteriza a este síndrome. *CCDC28B* (*coiled coil domain containing 28B*) fue originariamente identificado como un modificador de BBS que

codifica para una proteína que interactúa con varias proteínas BBS pero cuya función es desconocida. Como objetivo de este trabajo nos propusimos caracterizar a CCDC28B para ganar información que nos permitiera entender su rol biológico, tanto en el contexto de las cilias como potencialmente fuera de estos organelos, y así comprender su relación con la etiología de BBS así como la base celular de su efecto modificador.

Para alcanzar este objetivo utilizamos una aproximación multidisciplinaria incluyendo tanto estudios *in vitro*, en cultivos celulares, análisis *in silico* así como modelos animales (pez cebra y ratón). Los resultados de esta tesis nos han permitido determinar que CCDC28B es una proteína que cumple un rol en el proceso de ciliogénesis, ya que la reducción de su expresión determinó la formación de cilias más cortas, tanto en células como *in vivo*, con la consecuente aparición de una serie de fenotipos en el pez cebra que son característicos de BBS y de otros mutantes ciliopáticos. Estos fenotipos incluyen hidrocefalia, defectos en la determinación del eje izquierda-derecha y una alteración de la función renal. En acuerdo con esta función biológica, nuestros análisis *in silico* nos permitieron determinar su origen evolutivo y su grado de conservación entre las especies, mostrando la presencia de secuencias homólogas CCDC28B solo en metazoos ciliados. Una vez establecido el vínculo entre CCDC28B y el proceso de ciliogénesis, nuestros experimentos *in vitro* y en células en cultivo, resultaron fundamentales para comenzar a entender el mecanismo por el cual CCDC28B participa en la formación o mantenimiento de las cilias. Mediante un ensayo doble híbrido en levaduras determinamos que CCDC28B interactúa con SIN1, una proteína de unión a MAP quinasas y miembro estructural del complejo mTORC2. La vía de mTOR media tanto procesos catabólicos como anabólicos dentro de la célula, controlando el crecimiento y el metabolismo celular frente a señales del entorno. Esta vía implica la participación de dos grandes complejos multiproteicos que participan en diferentes procesos celulares pero que están altamente regulados entre sí. Por un lado el complejo mTOR1 (mTORC1) promueve el crecimiento y la proliferación celular por medio de regular la síntesis de proteínas y de lípidos, mientras que por otro lado, el complejo mTOR2 (mTORC2) regula la reorganización del citoesqueleto de actina por medio de la activación de proteínas quinasas de la subfamilia AGC. Una serie de experimentos en células e *in vivo*, nos permitieron determinar que CCDC28B, a través de su interacción con SIN1, cumple un

importante rol a nivel de mTORC2, favoreciendo su formación o estabilidad, y por tanto comportándose como un regulador positivo de este complejo. Por otro lado, una serie de reportes en la literatura comenzaron a vincular directamente la vía de mTOR con las cilias. Estos estudios mostraron que la vía de mTOR, y en particular mTORC1, no solo participa en el proceso de ciliogénesis, sino que también es blanco de regulación del organelo. Si bien nuestros resultados indicaban que CCDC28B afecta únicamente a mTORC2, estos reportes estimularon nuestro interés en la relación entre CCDC28B, SIN1, mTORC2 y el proceso de ciliogénesis. Dada la compleja regulación cruzada de mTORC1 y mTORC2, la utilización del modelo de pez cebra resultó fundamental para poder disecar genéticamente el rol de estos complejos y sus proteínas participantes en la biología de las cilias. Mediante la inyección de morfolinis dirigidos contra miembros específicos de ambos complejos fuimos capaces de determinar que Sin1, al igual que Raptor (componente de mTORC1), participan en la regulación del largo de las cilias, aunque Sin1 lo hace en forma independiente al complejo mTORC2. Es importante resaltar que estos resultados también fueron recapitulados en células de mamíferos. En suma, el conjunto de nuestros resultados nos permitió identificar un rol de CCDC28B en la biología de las cilias y determinar que al menos parte de esta función implica una función hasta ahora no reportada de Sin1. A su vez, y en un rol que potencialmente excede al contexto de las cilias, identificamos en CCDC28B un regulador de la actividad del complejo mTORC2. Por lo tanto, los resultados de esta tesis nos permiten avanzar significativamente en nuestro entendimiento del rol biológico de CCDC28B brindando datos relevantes no solo para entender su rol como modificador secundario de BBS sino también para continuar disecando la base celular de esta ciliopatía.

Introducción

Cilias y Flagelos

Las cilias y flagelos son organelos celulares conservados evolutivamente que han sido caracterizados y estudiados durante más de 100 años (Zimmermann, 1898). Estas estructuras con forma de pelo o antena, consisten de proyecciones a partir de la superficie celular compuestas por un esqueleto de microtúbulos (denominado axonema ciliar) rodeado por una bicapa lipídica continua con la membrana plasmática. El estudio de estos organelos se vio enormemente enriquecido por el desarrollo de la microscopía electrónica, la cual permitió desde mediados del siglo XX determinar su ultraestructura y ahondar en el entendimiento de sus funciones.

Debido a la similitud en su composición y función, los términos cilia y flagelo se usan en la literatura de manera intercambiable y los estudios en uno u otro han permitido profundizar en el conocimiento general. Sin embargo, existen ciertas diferencias entre ellos que es importante mencionar. A modo general, se considera que los flagelos son estructuras más largas que las cilias (100-200 μm vs 5-10 μm), que están presentes uno o dos por célula y su función original ha sido asociada con el movimiento/traslación de células individuales. Claros ejemplos son el flagelo de los espermatozoides de mamíferos y el flagelo de muchos eucariotas unicelulares, tales como los protistas. Por el contrario, las cilias pueden o no ser móviles y se pueden encontrar en un número que varía de uno a cientos por célula. Su función principal ha sido clásicamente asociada con el movimiento de fluidos y más recientemente con funciones sensoriales. También se observan diferencias en el tipo de movimiento que realizan las cilias móviles y el flagelo. Los flagelos presentan un movimiento que generalmente consiste de sucesivas ondas que se originan en la punta o en la base del flagelo y se propagan a todo lo largo del mismo. Por el contrario, en el caso de las cilias móviles, éstas presentan un movimiento de tipo “batido”, similar al de un látigo, con un movimiento rápido inicial, seguido de una etapa de recuperación más lenta hacia la posición original (Satir & Christensen, 2007; **Figura 1**).

Figura 1_ Diferencias en el mecanismo del movimiento de las ciliias móviles y de los flagelos.

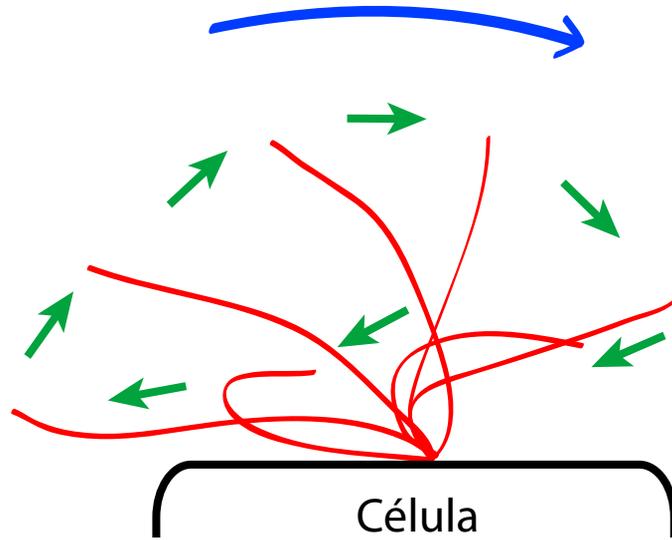
(A) Mecanismo del movimiento de una cilia móvil. (B) Mecanismo del movimiento de un flagelo. Las flechas celestes indican las etapas del movimiento y las flechas violetas indican la dirección final del movimiento del fluido.

Tomado de: Atlas de Histología Vegetal y Animal; Universidad de Vigo, España.

A

Cilia

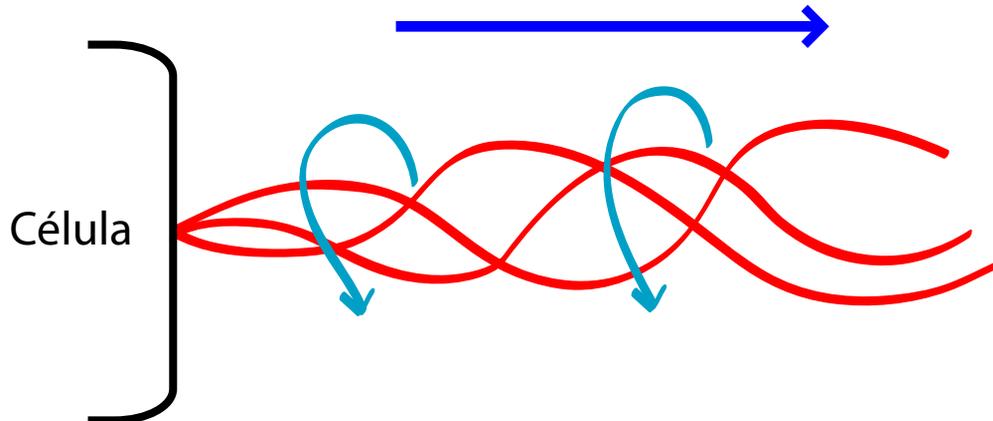
Dirección del movimiento del fluido



B

Flagelo

Dirección del movimiento del fluido



A pesar de las diferencias antes mencionadas, las cilia y los flagelos comparten un mismo origen evolutivo, son derivados de las mismas estructuras y como se mencionará en las siguientes secciones los mecanismos que determinan su formación, mantenimiento y función son muy similares. Es por esto que a lo largo de la presente tesis nos referiremos a los términos cilia y flagelo teniendo en cuenta las diferencias antes mencionadas, pero considerándolos como estructuras casi idénticas.

Estructura y Clasificación de Cilia

La mayoría de los organismos eucariotas, con la excepción de las plantas y hongos, presentan cilia. En el caso de los vertebrados están presentes en casi todos los tipos celulares, mientras que los invertebrados presentan cilia casi exclusivamente en las neuronas sensoriales (www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist). Debido a la caracterización del rol funcional que cumplen dentro de la célula, actualmente se considera que son verdaderos organelos celulares. Son estructuras altamente complejas, formadas por aproximadamente 1000 proteínas (ver páginas web: www.sfu.ca/~leroux/ciliome_database; v3.ciliaproteome.org/cgi-bin/index.php; labs.umassmed.edu/chlamyfp/protector_login.php) y que presentan una estrecha relación con el ciclo celular. Son estructuras post-mitóticas, ya que están presentes en células que se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo, y son reabsorbidas una vez que la célula comienza a ciclar (Irigoien & Badano, 2011). Las primeras cilia estudiadas fueron las cilia móviles, presentes en las células multiciliadas del tracto respiratorio, del epéndimo ventricular y del aparato reproductor. Su función fue asociada con su capacidad de movimiento ya que se demostró que son las encargadas de “mover” los fluidos extracelulares que recubren a determinados epitelios. Debido a que durante un largo tiempo éste fue el único tipo de cilia que se estudió, se planteó que ésta era su única función. Sin embargo, a finales del siglo XIX varios trabajos reportaron la presencia de un tipo de cilia solitaria, inmóvil, a la que se le atribuyó funciones sensoriales (Zimmermann, 1898). Sin embargo este tipo de cilia permaneció sin ser estudiada y fue considerada durante largo tiempo como un organelo vestigial. El término cilia primaria fue propuesto por Sorokin en 1968 (Sorokin, 1968) y fue en los últimos 15 años que ocurrió un explosivo

interés en este tipo de cilia. Esto se debió a la clara demostración de su función sensorial y principalmente a la observación de que defectos en su ensamblaje o función provoca la aparición de un amplio espectro de enfermedades humanas, colectivamente llamadas ciliopatías, cuya base celular hasta ese momento era desconocida (Bloodgood, 2010; Badano, 2006; Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009). Debido a la posterior demostración de que las ciliias móviles también actúan como quimiosensores (Shah, 2009), actualmente se considera que la función sensorial es una propiedad inherente a todos los tipos de cilia, independientemente de su capacidad de movimiento. Es por esto que la visión actual plantea que tanto las ciliias primarias como las ciliias móviles son organelos celulares que funcionan como centros de sensado, recepción y distribución de señales, lo que permite desencadenar diversas respuestas celulares frente a los diversos estímulos (Poole, 1985; Bloodgood, 2010).

Las ciliias pueden dividirse estructuralmente en varios subdominios. Si se las describe desde la zona más proximal al cuerpo celular, las ciliias están formadas por un cuerpo basal, una zona de transición, el axonema y una membrana ciliar que recubre a todo el organelo. A continuación se describirán las características estructurales y funcionales de cada uno de estos subdominios.

Características del axonema

El axonema ha sido el primer subdominio ciliar en ser descrito en detalle y según la ultraestructura que presenta se lo ha utilizado para clasificar a las ciliias en dos grandes grupos (**Figura 2**). Por un lado, las denominadas ciliias móviles que presentan un axonema formado por nueve dobletes de microtúbulos externos (llamados A y B) y un par de microtúbulos centrales. Este tipo configuración ha sido denominada “9+2”. Los microtúbulos A y B de cada par periférico se ubican de manera oblicua, de modo que el microtúbulo A está más próximo al centro del axonema. Cada microtúbulo A está formado por 13 protofilamentos mientras que el B es incompleto ya que comparte 3 con el microtúbulo A. Los dobletes de microtúbulos están unidos entre sí por fibras de la proteína nexina y son mantenidos en su posición por proyecciones proteicas radiales que se extienden hacia el centro del axonema. Este tipo de cilia también presenta estructuras

acesorias que están involucradas en el movimiento de batido, tales como los brazos internos y externos formados por la proteína dineína.

El otro grupo de cilias, las llamadas cilias inmóviles o primarias, presentan un patrón llamado “9 + 0”, en el cual el par central de microtúbulos está ausente. A su vez carecen de los brazos internos y externos de dineína y de otras proteínas asociadas con la capacidad de generar movimiento (**Figura 2**).

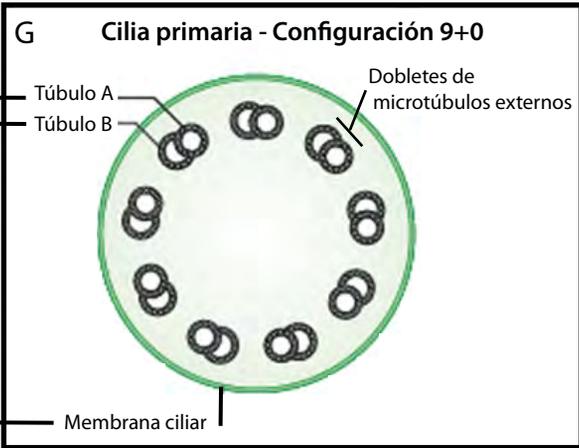
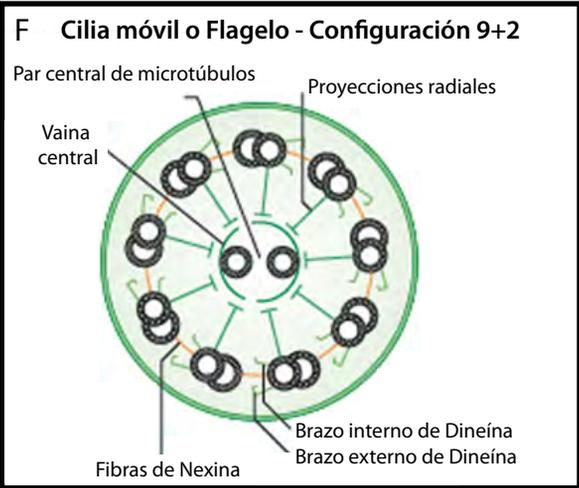
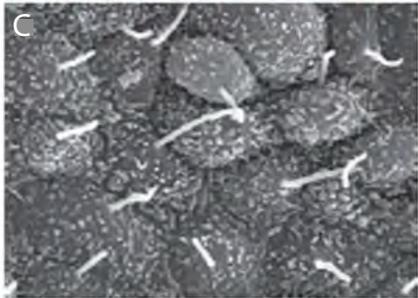
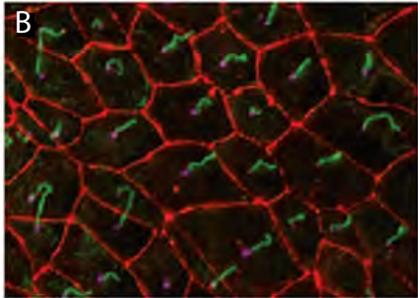
A pesar de que esta clasificación se mantuvo durante muchísimos años, actualmente se ha determinado que la misma es una clasificación simplista, ya que se han encontrado cilias móviles con un patrón 9 + 0, así como cilias 9 + 2 inmóviles. Un ejemplo son las cilias de las células del nodo embrionario de los mamíferos, las cuales presentan cilias móviles pero con un patrón “9+0”. Estas cilias rotan generando un flujo direccional a lo largo del nodo el cual es requerido para establecer el eje de simetría derecha-izquierda del embrión como se describirá más adelante (Nonaka, 1998; Basu & Brueckner, 2008). Otra variante se observa en las cilias de la placa de la notocorda de los embriones de conejo, las cuales son cilias móviles que pueden presentar una configuración 9+0, 9+2 o incluso 9+4. Por otro lado, el quincilio maduro de las células ciliadas del oído interno es una estructura no móvil pero que presenta un axonema “9+2”.

Figura 2_ Estructura de la cilia.

A) Microscopía electrónica de cilia primarias de células pigmentarias de la retina (RPE). B) Inmunofluorescencia de cilia primarias de células de renales (IMCD3). En verde axonema ciliar, en magenta cuerpo basal, en rojo uniones celulares. C) Microscopía electrónica de barrido de cilia del nodo embrionario de ratón. D) Microscopía electrónica de barrido de cilia móviles de la tráquea de ratón. E) Esquema de la organización de la cilia. F) Sección transversal del axonema de una cilia móvil o flagelo. G) Sección transversal del axonema de una cilia primaria.

Adaptado de: Ishikawa & Marshall, 2011.

Sección transversal del axonema

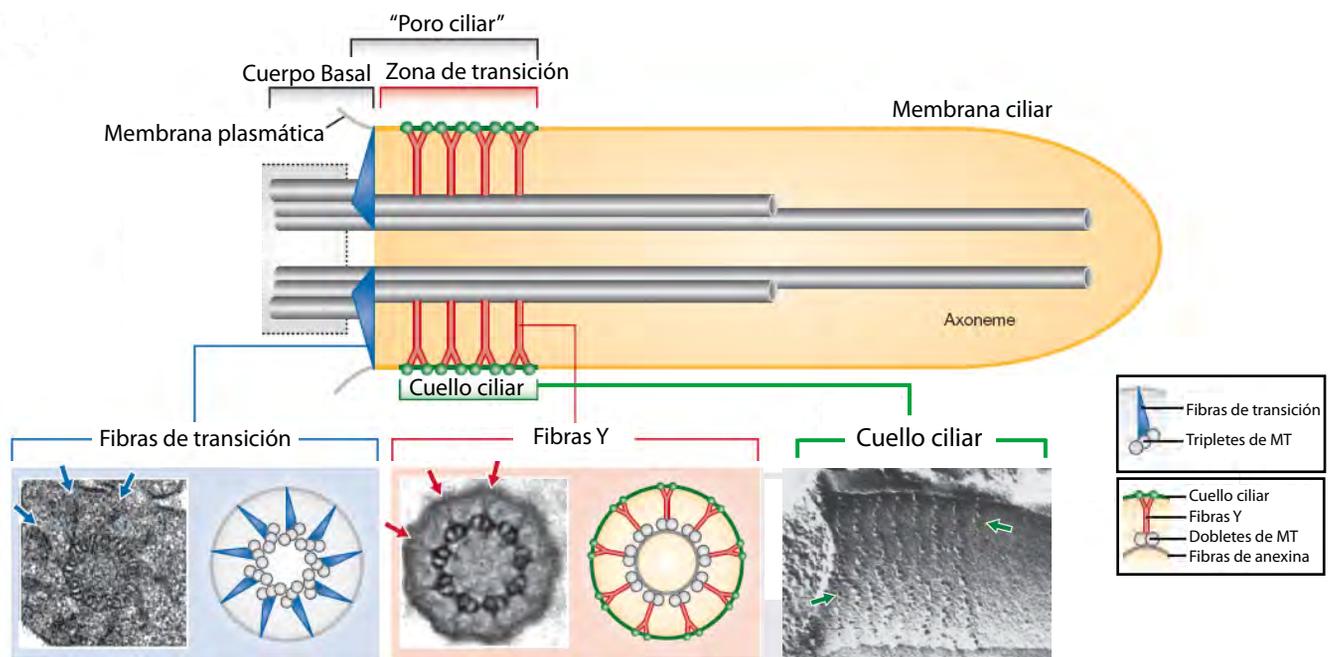


Zona de transición

El extremo más proximal del axonema se denomina zona de transición y presenta ciertas características que lo diferencian del resto del axonema. Es un subdominio ciliar conservado evolutivamente que se caracteriza por la presencia de fibras proteicas con forma de Y que conectan los dobletes de microtúbulos periféricos del axonema con la membrana ciliar (**Figura 3**). Actualmente, la zona de transición se la visualiza como la región que queda sin tinción cuando se utilizan marcadores para el axonema o el cuerpo basal (α -tubulina acetilada y γ -tubulina, respectivamente). Las fibras Y coinciden con un arreglo circunferencial en forma de espiral que se observa en la membrana ciliar, denominado cuello ciliar, el cual puede ser visualizado por medio de microscopía electrónica por criofractura y cuya función aún no ha sido determinada (**Figura 3**; Gilula & Satir, 1972). La composición bioquímica de la zona de transición se conoce parcialmente (revisado en (Reiter, 2012) y con la excepción de la caracterización de la presencia de la proteína CEP290/NPHP6 (Craigie, 2010), se desconoce la naturaleza de las fibras Y. Este dominio ha ganado mucha relevancia en los últimos años ya que muchos trabajos han demostrado que podría estar implicado en el control del transporte de proteínas hacia el interior de la cilia (ver sección “Mecanismos de transporte hacia la cilia y secuencias señal”; revisado en Reiter, 2012; Nachury, 2010).

Figura 3_ Esquema de la zona de transición.

Se puede apreciar las fibras con forma de Y y el cuello ciliar. Las micrografías electrónicas de las fibras de transición y la zona de transición corresponden a una cilia primaria del oviducto humano. El cuello ciliar se observa en una cilia primaria del tracto respiratorio del hamster por medio de microscopía electrónica por criofractura. Adaptado de: Reiter, 2012.



Características de la membrana ciliar

El axonema está cubierto por una membrana que a pesar de ser continua con la membrana plasmática, posee una composición proteica y lipídica particular. La dificultad de purificar las ciliias de células de mamíferos ha enlentecido el proceso de caracterización de la composición específica de las membranas ciliares y es por esto que mucho del avance en esta área se ha logrado utilizando el modelo de *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga verde unicelular biflagelada. En este sentido, se ha podido determinar que las membranas ciliares están enriquecidas en esteroides, gangliósidos, proteínas de unión al colesterol, así como presentan una mayor concentración de receptores, canales y sistemas de transducción (Chailley & Boisvieux-Ulrich, 1985; Kaneshiro, 1990; Janich & Corbeil, 2007). A pesar de que el interior y la membrana ciliar son continuos con el citosol y la membrana plasmática respectivamente, las ciliias son capaces de retener en su interior aquellas proteínas que han sido transportadas hacia este dominio. Se ha propuesto que en el caso de proteínas de membrana, esto se logra por medio del anclaje directo de las proteínas al axonema ciliar para impedir su difusión, o bien por medio de la presencia de barreras difusionales que aíslan la membrana ciliar del resto de la membrana plasmática (Pazour, 2005; Dentler, 1981; Bergman, 1975; Hunnicutt, 1990; Musgrave, 1986). Exactamente cuál es la base bioquímica y estructural de esta barrera no se conoce en completo detalle, pero el modelo que ha ganado más relevancia en los últimos años es que la zona de transición de las ciliias y las fibras distales del cuerpo basal serían quienes mediarían este proceso. La idea de la presencia de una puerta o poro ciliar será analizado en más detalle en la sección “mecanismos de transporte hacia la cilia y secuencias señal”.

Ciliogénesis y estructura del centríolo/cuerpo basal

La formación de las ciliias, proceso llamado ciliogénesis, ocurre a partir del cuerpo basal, el cual es un centríolo modificado proveniente del centrosoma y localizado en la base de la cilia. Cada centrosoma está formado por dos centríolos apareados perpendicularmente, llamados madre e hijo, y rodeados por una red proteica denominada matriz pericentriolar. Durante la fase S del ciclo celular, se forma un nuevo

centríolo (hijo) a partir del centríolo heredado (madre). En células en fase G₀ o G₁ del ciclo, el centríolo madre se mueve hacia la superficie celular donde actúa como un cuerpo basal para permitir la formación de las cilias. Luego, durante la mitosis, la cilia se reabsorbe y el cuerpo basal se mueve hacia el huso mitótico, donde pasa a ser llamado nuevamente centríolo y a cumplir un rol en la división celular.

El centríolo/cuerpo basal es una estructura cilíndrica, cuya estructura es muy similar a la del axonema, pero con la diferencia que presentan nueve *tripletes* de microtúbulos distribuidos periféricamente y ningún grupo de microtúbulos centrales (**Figura 4**). Cada triplete está formado por tres microtúbulos denominados A, B y C, siendo el A el más interno y el único formado por trece protofilamentos. Los microtúbulos B y C se ubican central y externamente, respectivamente, y se dice que son incompletos ya que comparten tres protofilamentos con el microtúbulo adyacente. En los centríolos/cuerpos basales los tripletes también están unidos entre sí por fibras de nexina, la cual conecta al microtúbulo A con el C del siguiente triplete. A partir de cada triplete se originan fibrillas radiales lo que determina una estructura llamada “rueda de carro” o también denominada 9+0 por tener nueve tripletes externos y ninguno central. Una modificación que adquieren los centríolos cuando funcionan como cuerpos basales en la base de la cilia es la presencia de dos tipos de apéndices o proyecciones proteicas laterales. En el extremo proximal (más cercano al citoplasma y núcleo) se encuentran los apéndices llamados subdistales y pies basales, cuya función es promover el anclaje y la nucleación de los microtúbulos. En el extremo distal se encuentran los apéndices distales, los cuales originarán o se transformarán en las llamadas fibras de transición, las cuales están implicadas en el anclaje del cuerpo basal a la membrana (ver **Figura 3**). Es importante mencionar que debido a que no se conoce con exactitud el origen de las fibras de transición, aún existe cierta discordancia en la literatura acerca de si las fibras de transición son parte del cuerpo basal o si se originan a partir de la zona de transición (revisado en Marshall, 2008).

A pesar de que este tipo de organización del cuerpo basal es la presente en la mayoría de los eucariotas, existen ciertas variantes. Una modificación se observa en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), el cual presenta centríolos que consisten de un disco fino formado por microtúbulos simples. Otra variante se observa en las moscas del

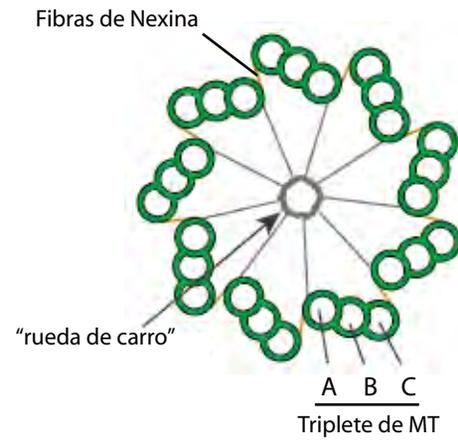
género *Drosophila*, las cuales presentan centríolos formados por anillos cortos de dobletes de microtúbulos. Como se verá a continuación, estas modificaciones podrían guardar alguna relación con el bajo número de células ciliadas que presentan estos grupos de invertebrados, ya que en el caso de *C. elegans* solo se observan cilia en las neuronas sensoriales y en *Drosophila* son las neuronas sensoriales y los espermatozoides los únicos tipos celulares que presentan cilia o flagelos (revisado en Marshall, 2008).

En los últimos años, se ha reforzado mucho la asociación que existe entre el centríolo/cuerpo basal y el proceso de ciliogénesis. Una importante observación es que los centríolos solo se encuentran en aquellas especies que tienen cilia en alguna etapa de su ciclo de vida y no se han caracterizado procesos de ciliogénesis sin la presencia de un cuerpo basal (Marshall, 2008). Se ha demostrado que esta asociación funcional se debe a que el cuerpo basal actúa como molde para la formación del axonema ciliar. A partir de estudios de microscopía electrónica, se puede observar que los dobletes externos de los microtúbulos del axonema son continuos con los microtúbulos A y B de los tripletes que forman el cuerpo basal, propagándose de este modo la simetría nonagonal del cuerpo basal hacia el axonema. La orientación que adopta el cuerpo basal en la base de la cilia también influye sobre el ángulo de inclinación que tendrá finalmente la cilia con respecto a la superficie celular. Esto tiene profundas implicancias biológicas ya que en el caso de las cilia móviles, el ángulo determinará la dirección del batido ciliar y por ende la dirección del movimiento de fluidos y morfógenos (ver sección “Funciones asociadas con el movimiento de las cilia”).

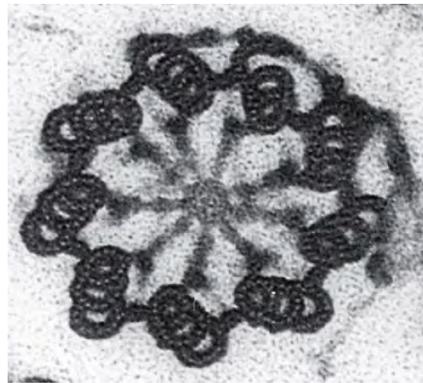
Figura 4_ Estructura del centríolo/cuerpo basal.

A y B) Esquema y microscopía electrónica de un corte transversal de un cuerpo basal donde se representan los nueve tripletes de microtúbulos (MT), las fibras radiales y la formación de la estructura en “rueda de carro”. C) Esquema de un cuerpo basal donde se indican los apéndices distales y subdistales. Adaptado de: Reiter, 2012; Biología Molecular de la célula, Alberts, 5^{ta} edición.

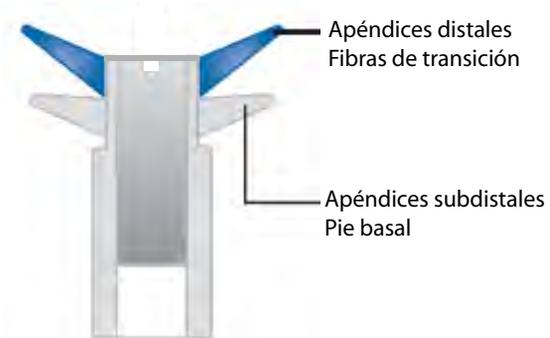
A



B



C



Establecimiento y mantenimiento de la estructura ciliar: el Transporte Intraflagelar

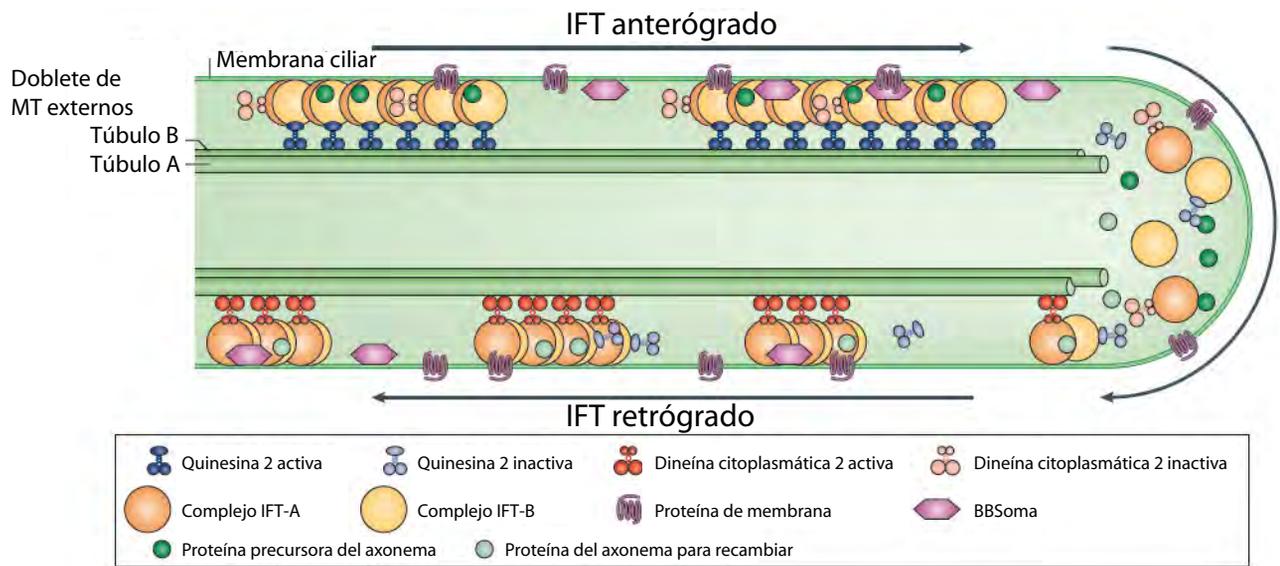
Debido a que las ciliadas carecen de la maquinaria necesaria para la síntesis proteica, las células han desarrollado un mecanismo especial, denominado Transporte Intraflagelar (IFT, del inglés *intraflagellar transport*), para la formación, mantenimiento y funcionalidad de las ciliadas. Este mecanismo fue descrito por primera vez en *Chlamydomonas reinhardtii* (Kozminski, 1993). El IFT fue descrito como un proceso de motilidad bidireccional, basado en los microtúbulos, en el cual grupos de complejos proteicos grandes (denominados partículas IFT) son transportados a lo largo de los dobletes externos de microtúbulos del axonema desde la base de la cilia hacia el extremo distal (anterógrado) y de vuelta al cuerpo celular (retrógrado). Estas partículas IFT actúan como proteínas adaptadoras entre el motor molecular y la carga que está siendo transportada (**Figura 5**). El movimiento anterógrado de las partículas desde la base hacia la punta de la cilia es realizado principalmente por la quinesina 2, un complejo heterotrimérico formado por dos subunidades motoras (KIF3A y KIF3B en vertebrados), y una subunidad no motora llamada KAP (Kozminski, 1995). El motor molecular responsable del movimiento retrógrado es la dineína citoplasmática 2, la cual está formada por al menos cuatro subunidades (cadenas pesadas, intermedias y livianas; Pazour, 1999; Porter, 1999). Durante el movimiento anterógrado, las proteínas precursoras del axonema se asocian con la maquinaria de IFT y son transportadas hacia el sitio de ensamblaje en el extremo distal de la cilia. Una vez allí, las proteínas precursoras son “descargadas” y las partículas IFT “vacías” se asocian con productos de degradación que serán transportados de manera retrógrada por la dineína citoplasmática 2, para su reciclaje en la base de la cilia (**Figura 5**; Qin, 2004).

Figura 5_Transporte intraflagelar (IFT).

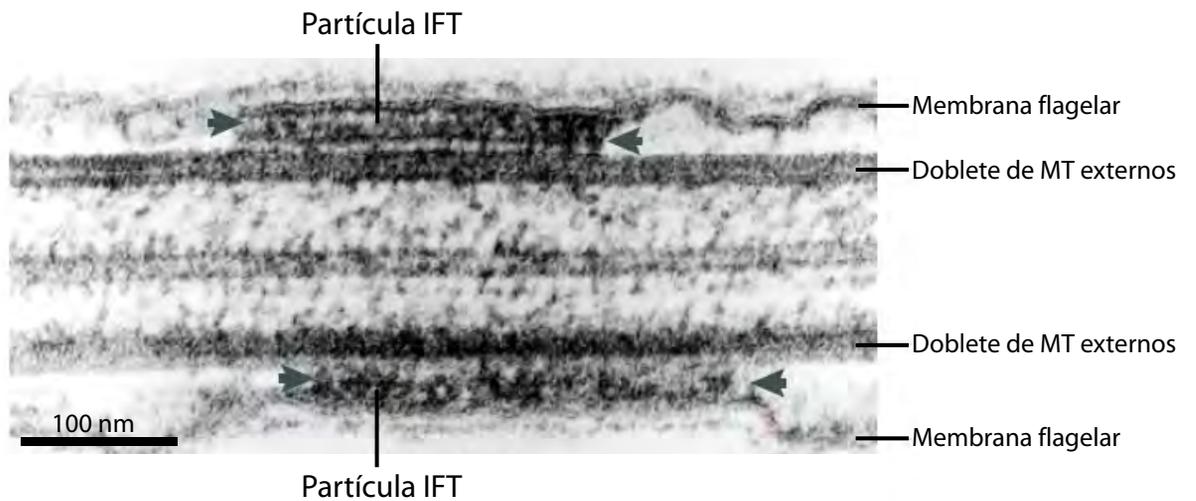
A) Esquema donde se representan los complejos A y B de las partículas IFT, los motores moleculares Quinesina 2 y Dineína citoplasmática 2 y proteínas transportadas hacia dentro y fuera de la cilia. B) Microscopia electrónica de una sección longitudinal del flagelo de *Chlamydomonas*, donde se visualizan las partículas IFT (cabeza de flecha) en estrecha asociación con los dobletes externos de microtúbulos (MT) y la membrana flagelar.

Adaptado de: Ishikawa & Marshall, *NatRevMolCellBiol* 2011;12(4):222-34 y Rosenbaum & Witman, *NatRevMolCellBiol*. 2002;(11):813-25.

A



B



Las partículas IFT consisten de dos complejos diferentes, llamados IFT-A e IFT-B, que contienen 6 y 14 proteínas cada uno, respectivamente (**Tabla 1**; Taschner, 2012).

A partir del análisis funcional de proteínas IFT individuales se demostró que los complejos IFT-A e IFT-B no solo representan entidades bioquímicas distintas, sino que también funcionan en diferentes aspectos del proceso de IFT. Las mutaciones en proteínas de IFT-B llevan a la ausencia de cilias o a la formación de cilias extremadamente cortas (Brazelton, 2001; Hou, 2007; Pazour, 2000), fenotipos similares a lo que se observa en los mutantes de quinesina 2 (Matsuura, 2002; Walther, 1994). Por otra parte, defectos en IFT-A resulta en cilias malformadas con prominentes engrosamientos o “bultos” conteniendo acúmulos de proteínas IFT (Iomini, 2009; Piperno, 1998), fenómeno también observado en presencia de mutaciones en la dineína citoplasmática 2 (Pazour, 1999; Pazour, 1998; Porter, 1999; Schafer, 2003). Es así como el conjunto de estos hallazgos demostraron que los complejos IFT-B e IFT-A están específicamente involucrados en el transporte anterógrado y retrógrado, respectivamente.

Sumado a su rol crítico en la formación y mantenimiento de las cilias, las proteínas IFT también se expresan en células no ciliadas y en los últimos años han sido implicadas en procesos tan diversos como en exocitosis y tráfico de vesículas, en la mitosis y en la formación de la sinapsis inmunitaria entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos (Follit, 2006; Follit, 2008; Robert, 2007; Delaval; Finetti, 2009).

Tabla 1_ Componentes del transporte intraflagelar.

Se indican los nombres de las proteínas de los complejos IFT-A e IFT-B y de las proteínas motoras en distintas especies. Adaptado de: Ishikawa & Marshall, 2011.

Componente del sistema IFT	Nombre mas usado	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Homo sapiens</i>	Otras especies
Quinesina 2	Heterotrimerica	FLA10 FLA8 FLA3	KLP-20 KLP-11 KAP-1	KIF3A KIF3B KAP3, KIFAP3	
Quinesina 2	Homodimerica	-	OSM-3, KLP-2	KIF17	Kin5
Dineína citoplasmática 2	cadena pesada cadena intermedia cadena intermedia liviana cadena liviana	DHC1B FAP133 D1BLIC LC8, FLA14	CHE-3 DYCI-1 D2LIC, XBX-1 DLC-1	DYNC2H1 WDR34 DYNC2LI1 DYNLL1	
Complejo IFT-A	IFT144 IFT140 IFT139 IFT122, IFT122A IFT121, IFT122B IFT43	IFT144 IFT140 IFT139 IFT122, FAP80 IFT121 IFT43	DYF-2 CHE-11 ZK328.7 DAF-10 IFTA-1 -	WDR19 IFT140 THM1, TTC21B IFT122, WDR10 WDR35 IFT43, C14orf179	
Complejo IFT-B	IFT172 IFT88 IFT81 IFT80 IFT74, IFT72 IFT70 IFT57 IFT54 IFT52 IFT46 IFT27 IFT25 IFT22 IFT20	IFT172 IFT88 IFT81 IFT80 IFT74, IFT72 IFT70, FAP259 IFT57 IFT54, FAP116 IFT52, BLD1 IFT46 IFT27 IFT25, FAP232 IFT22, FAP9 IFT20	OSM-1 OSM-5 IFT-81 CHE-2 IFT-74 DYF-1 CHE-13 DYF-11 OSM-6 DYF-6 - - IFTA-2 Y110A7A.20	IFT172 IFT88 IFT81 IFT80, WDR56 IFT74, IFT72 TTC30A, TTC30B IFT57 IFT54, TRAF3IP1, MIPT3 IFT52, NGD5 IFT46, C11orf60 IFT27, RABL4 IFT25, HSPB11 RABL5 IFT20	Tg737, Polaris Fleer Hippi Elipsa
Adaptador complejo IFT-A		TLP1	TUB-1	TULP3	
Adaptador complejo IFT-B		FAP22 DYF13	DYF-3 DYF-13	CLUAP1 TTC26	Qilin

Mecanismos de transporte hacia la cilia y secuencias señal

En los últimos años, importantes avances se han hecho en determinar cómo es el proceso de transporte de proteínas hacia la cilia y sus mecanismos de regulación. Sin embargo se está lejos de poder formular mecanismos generales para todas las proteínas que componen las cilia y definir si estos mecanismos son comunes a todos los tipos de células ciliadas presentes en un organismo. A pesar de que existe escasa evidencia, el modelo actual plantea que en el caso de proteínas de membrana éstas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, pasan luego al aparato de Golgi y finalmente son transportadas en vesículas derivadas del trans-Golgi hacia la zona de transición en la base de la cilia. Una vez allí estas vesículas se asocian con componentes del sistema IFT (Deane, 2001), se fusionan a la membrana adyacente a la zona de transición y son translocadas hacia el interior de las cilia por las partículas IFT. En apoyo a este modelo se ha demostrado que el espacio entre las fibras de transición en la base de las cilia no permite el pasaje de partículas mayores a 60 nm (Anderson, 1972), lo que implicaría que las vesículas estarían impedidas de entrar al compartimento ciliar y también explicaría el por qué no se observan estructuras vesiculares dentro de las cilia (Boquist, 1970; Reese, 1965). De ser así, esto determinaría que esta zona funcione de manera similar a un poro nuclear, siendo el sitio donde se clasifican y transportan las proteínas hacia el interior de las cilia. La idea de un poro ciliar, análogo al poro nuclear, ha sido formulada recientemente (Satir & Christensen, 2007) y se basa en reportes que demostraron la interacción, a través de secuencias de localización nuclear, entre proteínas ciliares y el complejo Importina β_2 /RanGTP en la base de las cilia (Dishinger, 2010; Hurd, 2011). En apoyo a esta propuesta, recientemente se ha demostrado la participación de nucleoporinas en el transporte de proteínas hacia el interior de las cilia (Kee, 2012).

Para el caso de proteínas solubles, Baldari & Rosenbaum han propuesto recientemente que éstas también entrarían a las cilia por un mecanismo similar (Baldari & Rosenbaum, 2010). El modelo plantea que las proteínas destinadas al interior de la cilia, serían sintetizadas en el citoplasma y luego serían transportadas hacia la zona de transición en

la base de la cilia, donde se asociarían con partículas IFT o con proteínas de membrana presentes en vesículas que están siendo transportadas hacia el interior de las cilias.

En apoyo a ambos modelos se ha determinado que algunas proteínas IFT podrían estar también involucradas en el transporte intracelular hacia la base de la cilia y mediar en este proceso. En las células de mamífero, todas las proteínas IFT, con la excepción de IFT20, se localizan principalmente en la cilia y en la base de la misma. IFT20 es una proteína IFT atípica, ya que se la puede detectar tanto en la cilia, como en el centrosoma y en el aparato de Golgi (Follit, 2006). En el trabajo de Follit y colaboradores, utilizando una proteína quimera IFT20-GFP observaron un movimiento activo de la proteína entre esos compartimentos. A partir de esos resultados, junto con otras evidencias de reducción parcial o total de la expresión de IFT20, se planteó que esta proteína funcionaría en el aparato de Golgi ensamblando a las proteínas destinadas a la membrana ciliar en vesículas de transporte específicas o bien en el envío de estas vesículas, una vez formadas, a la base de la cilia (Follit, 2006). Posteriormente buscando proteínas que interactúan con IFT20, se caracterizó a la proteína Elipsa la cual interactúa con la proteína reguladora de la endocitosis Rabaptin 5 y con la pequeña GTPasa Rab8 quien presenta localización ciliar. De este modo Elipsa actuaría uniendo al sistema IFT con complejos de proteínas que son transportados hacia la cilia (**Figura 6**; Omori, 2008).

Sumado al sistema IFT se han caracterizado otros grupos de proteínas que también participarían en el proceso de transporte hacia la cilia. Un ejemplo son las proteínas *polarity*, las cuales son proteínas implicadas en la formación y mantenimiento de la polaridad epitelial, de las cuales se ha determinado recientemente su localización ciliar y su participación en el proceso de ciliogénesis a través de su interacción con importina β (Sfakianos, 2007; Fan, 2007). Otro grupo de proteínas identificadas son las pequeñas GTPasas de las subfamilias Rab, Arf y Arl. Deretic y colaboradores (2006), estudiando los fotorreceptores identificaron una cascada de pequeñas GTPasas que regulan y participan en la gemación desde el aparato de Golgi de vesículas conteniendo rodopsina y la posterior fusión de las mismas en la base de la cilia conectora. Otro grupo de proteínas identificadas en el proceso de transporte hacia la cilia son las proteínas BBS cuyas funciones serán discutidas en siguientes secciones (ver sección “Función de las proteínas BBS”).

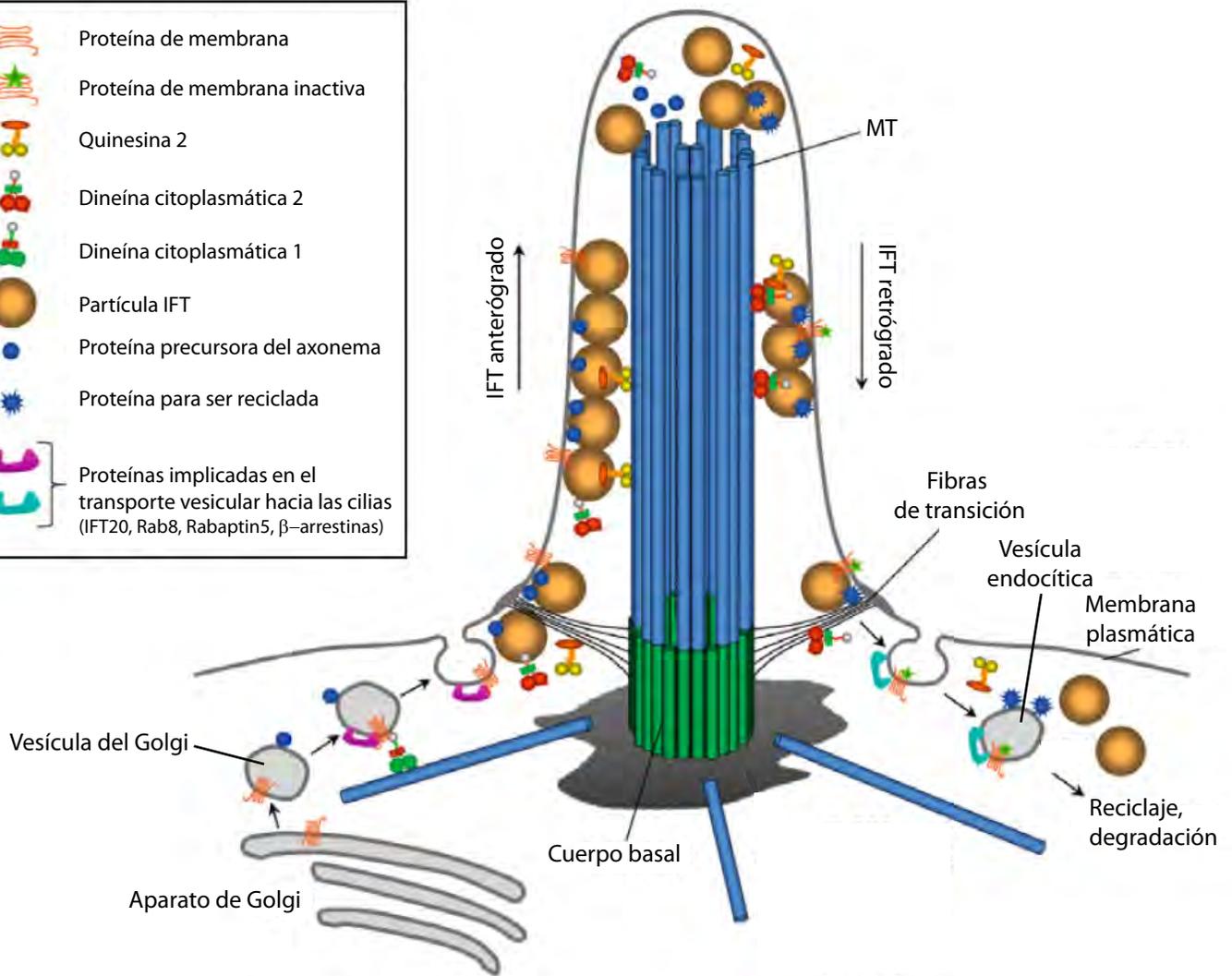
Cabe mencionar que también existen evidencias de que ciertas proteínas podrían ser enviadas a las cilias por un mecanismo diferente al antes mencionado. Tal es el caso de las proteínas de membrana aglutininas flagelares y Smoothened, para las cuales se ha determinado que su transporte a la membrana ciliar implica primero un mecanismo de inserción en la membrana plasmática y posteriormente un movimiento lateral hacia la membrana ciliar. Aún no se entiende cómo estas proteínas son capaces de atravesar la red proteica de la zona de transición (Hunnicut, 1990; Milenkovic, 2009). Recientemente también se ha reportado que algunas proteínas pueden ser específicamente excluidas de la membrana ciliar por medio de su interacción con proteínas accesorias de la familia NHERF (del inglés *Na⁺/H⁺ exchanger 3 regulator factor*) que las anclan al citoesqueleto de actina. Esta exclusión estaría mediada por “secuencias de retención” responsables de la interacción con las proteínas NHERF (Francis, 2011).

En resumen, y a pesar de lo parcial de la información disponible, puede considerarse que en las células coexisten más de un mecanismo que determina la compartimentalización del dominio ciliar, y estos mecanismos implicarían procesos de exocitosis dirigida, difusión lateral y retención selectiva (Nachury, 2010).

Figura 6_ Transporte intraflagelar y envío de proteínas hacia las cilias.

Las proteínas destinadas al compartimento ciliar son transportadas en vesículas derivadas del Golgi hacia la base de la cilia donde se asocian con las partículas IFT para ingresar a la cilia. Adaptado de: Pedersen & Rosenbaum, 2008.

-  Proteína de membrana
-  Proteína de membrana inactiva
-  Quinesina 2
-  Dineína citoplasmática 2
-  Dineína citoplasmática 1
-  Partícula IFT
-  Proteína precursora del axonema
-  Proteína para ser reciclada
-  Proteínas implicadas en el transporte vesicular hacia las ciliias (IFT20, Rab8, Rabaptin5, β -arrestinas)



Secuencias señal

Las proteínas que se localizan en un organelo particular generalmente contienen secuencias en *cis* que sirven como “marca” para dirigir las hacia ese organelo. Es por esto que se ha hecho mucho esfuerzo en determinar posibles secuencias que definen una localización ciliar (CTS, del inglés *ciliary targeting signals*). Sin embargo todavía se conoce muy poco y la mayor parte de la información disponible proviene de estudios realizados con proteínas ciliares transmembrana y parece aplicarse solo a casos particulares (Nachury, 2010). El CTS mejor caracterizado es el motivo VxPx el cual está presente en la policistina 2 (Geng, 2006), en los canales activados por nucleótidos cíclicos (Jenkins, 2006) y en la rodopsina (Tam, 2000; Mazelova, 2009). Otro CTS identificado es el motivo “caja AQ” presente en algunos receptores acoplados a proteína G que han sido identificados en la membrana ciliar, tal como el receptor 3 de somatostatina (SSTR₃), el receptor 6 de serotonina (5HT₆) y el receptor 1 de la hormona concentradora de melanocortina (MCHR1; Berbari, 2008). Sin embargo, existe menos información acerca de qué CTS utilizan las proteínas solubles para ser dirigidas a las cilias. Por medio del estudio de la proteína cistina se identificó un motivo AxEGG que junto con la miristilación de la Gly2 dirigen la proteína a la cilia (Tao, 2009). Es interesante que una modificación post traduccional (miristilación o palmitilación) también ha sido involucrada en la localización ciliar de otras proteínas, tal es el caso de calflagina en *Trypanosoma cruzi* (Godsel & Engman, 1999) o NPHP3 en células de ratón (Nakata, 2012). Se ha planteado que este tipo de modificación conduciría a las proteínas a balsas lipídicas, lo cual es coherente con la observación de que la membrana ciliar está enriquecida en componentes típicos de las balsas lipídicas (Janich & Corbeil, 2007). Además, también concuerda con resultados de análisis proteómicos de *Chlamydomonas* que han mostrado múltiples proteínas miristiladas en el flagelo, sugiriendo que la asociación de proteínas con balsas lipídicas puede ser un pre-requisito para el ingreso a la cilia (Diniz, 2012).

Funciones asociadas con las cilias

Como se mencionó previamente, el concepto actual plantea que la función principal de las cilias es actuar como “antenas sensoras” del espacio extracelular y desencadenar diversas respuestas celulares. La capacidad de movimiento se considera que puede haber sido o no una adquisición evolutiva posterior, que les permite a las cilias móviles sumar funciones extrasensoriales (Carvalho-Santos, 2011; Satir, 2008; Bloodgood, 2010). Por cuestiones históricas, a continuación se describirán primero las funciones que han sido asociadas con las cilias móviles y posteriormente las funciones de las cilias primarias (no móviles).

Funciones asociadas con el movimiento de las cilias

La importancia fisiológica de las cilias móviles en humanos ha sido clara desde mediados de 1970 cuando Bjorn Afzelius asoció los fenotipos presentes en pacientes portadores del síndrome de Kartagener, con defectos en el movimiento de las cilias. Este síndrome humano había sido definido por el médico polaco Manes Kartagener en 1933 como un síndrome que presenta la combinación de bronquiectasia (un tipo de obstrucción pulmonar crónica) con sinusitis crónica, esterilidad, hidrocefalia y reversión corporal de la asimetría derecha-izquierda (*situs inversus*). Afzelius determinó que las cilias móviles de estos pacientes no presentan los brazos de dineína, lo que determina que no tengan la capacidad de generar movimiento (Camner, 1975; Afzelius, 1976). Actualmente se conocen un gran número de mutaciones que son las causantes de estos fenotipos y se ha determinado que todas ellas están asociadas con genes que codifican para proteínas involucradas en la maquinaria que genera el movimiento ciliar. Un ejemplo son las mutaciones en los genes de las cadenas intermedias y pesadas de la dineína, tales como *DNAI1*, *DNAH5* y *DNAH11* (Pennarun, 1999; Olbrich, 2002), las cuales han sido detectadas en pacientes con este síndrome y con el síndrome de disquinesia ciliar primaria (PCD, del inglés *primary cilia dyskinesia*), el cual se diferencia con el síndrome de Kartagener en que los pacientes no presentan *situs inversus*.

Mientras que las alteraciones en el aparato respiratorio y la infertilidad eran consecuencias esperadas de la inmotilidad ciliar, explicar las alteraciones de la asimetría corporal que se observaba en estos pacientes fue más difícil. Sin embargo, la descripción

en 1998 por Nonaka y colaboradores de la presencia de un tipo de cilias primarias móviles en el nodo embrionario de ratón, permitió entender esta alteración. En ese trabajo demostraron que el nodo embrionario presenta un tipo de cilia 9+0 móvil, la cual es capaz de generar un tipo de movimiento de vórtice que determina un flujo del fluido extraembrionario que recubre al nodo, con una dirección de derecha a izquierda (Nonaka, 1998; Nonaka, 2002). Existen dos modelos para explicar cómo el fluido extraembrionario determina el quiebre de la simetría derecha-izquierda, pero ninguno es capaz de explicar por sí solo todo el mecanismo (**Figura 7**). Un modelo plantea que el flujo hacia la izquierda es sentido por cilias mecanosensoras presentes en el lado izquierdo del nodo, las cuales responden al flujo desencadenando una cascada de señalización mediada por Ca^{2+} que se traduce en una expresión diferencial de los genes *Nodal* y *Lefty* en el lado izquierdo del embrión. En apoyo a este modelo, se ha demostrado que existen dos tipos de cilias primarias en el nodo embrionario (McGrath, 2003). Por un lado, un grupo de cilias localizadas en el centro que serían las responsables de “moverse” y generar el flujo, y por otro lado un grupo de cilias primarias no móviles que serían quienes sienten el estímulo mecánico y desencadenan la respuesta celular. Recientemente se demostró que la localización ciliar del canal de Ca^{2+} policistina 2 es requerido para sentir el flujo de fluido extraembrionario y determinar una correcta asimetría derecha-izquierda (Yoshida, 2012).

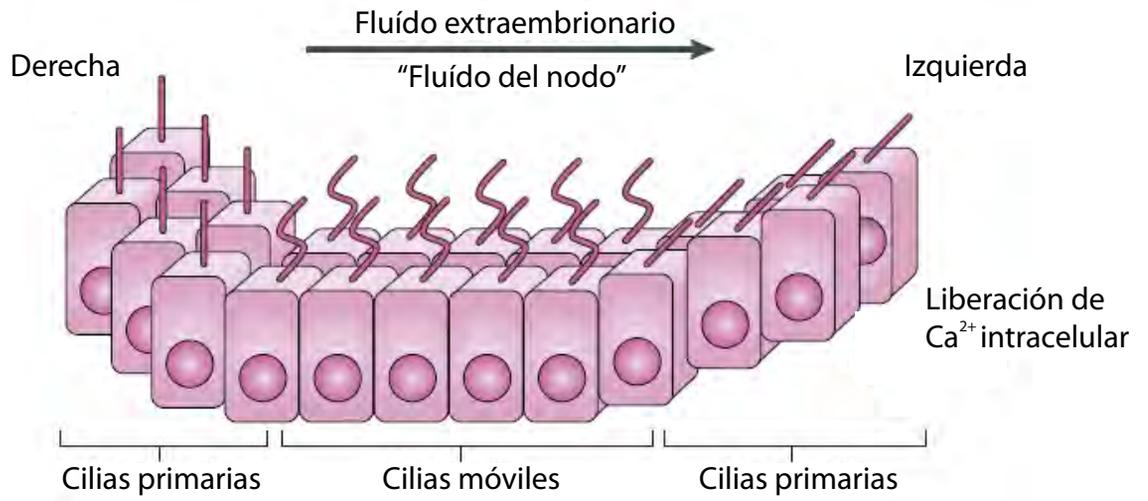
El otro modelo se basa en que el movimiento del fluido extraembrionario genera un gradiente de morfógenos que iniciaría la cascada de especificación de la asimetría derecha-izquierda. Interesantemente, ha sido reportado que la vía de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF del inglés *fibroblast growth factor*) puede regular la liberación de partículas membranosas, denominadas paquetes vesiculares nodales (NVPs del inglés *nodal vesicular parcels*) que contienen ligandos de vías de señalización que han sido asociadas con las cilias, como ser la vía de Sonic hedgehog y del ácido retinoico (ver sección “Función sensorial de las cilias primarias”). Estas NVPs serían transportadas por el flujo en el nodo y se plantea que liberarían su contenido en la zona izquierda del nodo para iniciar así la expresión de *Nodal* y *Lefty* (Tanaka, 2005). A pesar de que el mecanismo exacto no se conoce, la relación directa entre el movimiento de las cilias del nodo y la especificación de los ejes del embrión está muy bien establecida.

Posteriormente varios estudios en diversos embriones de vertebrados demostraron que el mecanismo de “flujo en el nodo” es un mecanismo conservado evolutivamente y que existe una estructura similar al nodo embrionario de ratón en casi todos los vertebrados. Es así como se caracterizó a un grupo de células en la vesícula de Kupffer en el pez cebra, en el piso de la placa del gastrocele en xenopus y en la notocorda posterior en conejos, que son esenciales para el desarrollo de la asimetría derecha-izquierda (Pagan-Westphal & Tabin, 1998; Essner, 2005; Kramer-Zucker, 2005; Schweickert, 2007; Blum, 2007). Se ha demostrado que todas estas estructuras expresan homólogos de proteínas y factores de crecimiento claves para este proceso, así como comparten la particularidad de presentar, en todos los casos, cilias primarias móviles inusualmente largas. Cabe mencionar que una excepción a este modelo podría ocurrir en los embriones de pollo, los cuales a pesar de que también presentan una estructura ciliada similar al nodo (llamada nodo de Hensen) podría no ser el movimiento de esas cilias las responsables de la especificación derecha-izquierda (Gros, 2009). A pesar de las diferencias que puedan existir, todo parece indicar que casi todos los vertebrados presentan un “centro de asimetría derecha-izquierda” en el cual las cilias juegan un rol en la determinación de los ejes corporales.

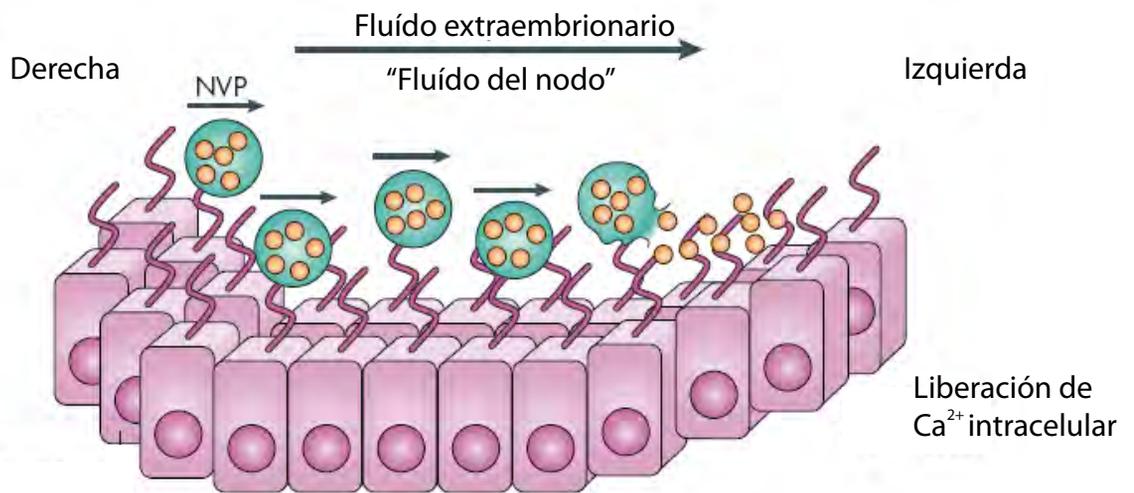
Figura 7_ Modelos para explicar la participación de las cilias del nodo embrionario en la generación de la asimetría corporal derecha-izquierda.

A) Modelo de presencia de dos tipos de cilias (primarias y móviles) distribuidas diferencialmente dentro del nodo. B) Modelo de paquetes vesiculares nodales (NVPs) conteniendo morfógenos. Adaptado de: Fliegauf, 2007.

A



B



La hidrocefalia es otro fenotipo que ha sido asociada con alteraciones en la función de las cilias móviles y clínicamente se la define como una expansión de los ventrículos del cerebro. Las células endociliares que tapizan los ventrículos del cerebro presentan cilias móviles 9+2 (Dalen, 1971), las cuales se mueven de manera sincronizada para mover el líquido cefalorraquídeo a través del sistema ventricular. El mecanismo exacto por el cual la pérdida del movimiento ciliar desencadena la aparición de hidrocefalia no se conoce en completo detalle. Sin embargo, basándose en modelos animales se ha planteado que la hidrocefalia puede ser causada principalmente por dos mecanismos. Por un lado, la presencia de mutaciones en proteínas de la maquinaria de movimiento de las cilias provocaría la inmovilidad de las cilias de las células endociliares. Esto determinaría una alteración del flujo del líquido cefalorraquídeo, provocando una excesiva acumulación de líquido y una expansión de los ventrículos, y la consecuente alteración del acueducto que conecta los ventrículos entre sí. Esto ha sido observado en ratones con mutaciones en las cadenas intermedias y pesada de la dineína (tales como *Dnai1*, *Dnahc5* o *Dnah11*), en proteínas del axonema (SPAG6 e Hdh) o en proteínas involucradas en ciliogénesis (IFT88 y FOXJ1; Pennarun, 1999; Ibanez-Tallon, 2004; Sapiro, 2002; Davy & Robinson, 2003; Banizs, 2005; Chen, 1998). Otra posibilidad es que la hidrocefalia sea consecuencia de una producción aumentada de líquido cefalorraquídeo. Este mecanismo fue propuesto estudiando la línea de ratón *orpk* (del inglés *Oak Ridge polycystic kidney*), la cual presenta una mutación en el gen *Tg737*, el cual es el gen ortólogo en ratón de la proteína implicada en el transporte intraflagelar, IFT88, de *Chlamydomonas* (Yoder, 1995; Pazour, 2000). En estos ratones se determinó que la aparición de hidrocefalia comienza en el día 1 postnatal y que la alteración del movimiento ciliar y del flujo del líquido cefalorraquídeo no serían los factores desencadenantes de la hidrocefalia. Sin embargo, se planteó que el defecto ciliar provoca una alteración del epitelio del plexo coroideo, el cual es el responsable de la producción del líquido cefalorraquídeo (Banizs, 2005). Posteriormente se observó que la alteración de estas cilias provoca un aumento de los niveles de AMPc, una alteración en la actividad de los transportadores de iones, una modificación del pH intracelular y cambios en la composición del líquido cefalorraquídeo secretado (Banizs, 2007). Estos hallazgos llevaron a postular que el factor desencadenante de la hidrocefalia puede ser un exceso en la producción de líquido

cefalorraquídeo, y que la alteración en el flujo y el bloqueo del acueducto provocarían el desarrollo de una hidrocefalia más severa en etapas posteriores.

Interesantemente, han surgido reportes que plantean la participación de las cilias no móviles en la etiología de la hidrocefalia. Recientemente, Carter y colaboradores reportaron que una población de células progenitoras neuronales de la región periventricular responden a los factores de crecimiento NG2 (del inglés *chondroitin sulfate proteoglycan*) y PDGFR- α (del inglés *platelet-derived growth factor receptor α*) a través de las cilias primarias. En ese trabajo plantearon que la activación de estas vías conduciría a la supervivencia y proliferación de las células progenitoras neuronales, lo cual es requerido para un correcto desarrollo del sistema ventricular. En este sentido, la ausencia o alteración de las cilias primarias determinaría una reducción de la proliferación y un aumento de la apoptosis de éstas células, desencadenando el desarrollo de la hidrocefalia como consecuencia de las alteraciones del desarrollo de los ventrículos (Carter, 2012).

Función sensorial de las cilias primarias: vías de señalización intracelular

Como se mencionó previamente, la función principal de las cilias primarias está asociada con su capacidad de actuar como sensores del espacio extracelular y de actuar como “centros integradores” de información proveniente del entorno. Se cree que la concentración de la maquinaria de transducción de señales en un espacio pequeño y bien definido, promueve una forma eficiente y rápida para interactuar y modificar proteínas de señalización en respuesta a una señal.

A continuación se describen brevemente algunas de las vías de señalización intracelular en las que se ha demostrado que las cilias primarias juegan un papel central y que son relevantes para los resultados de esta tesis. Como se verá a continuación el uso de modelos animales (principalmente ratón y pez cebra) fue extremadamente importante ya que permitió realizar asociaciones entre mutaciones en proteínas asociadas con las cilias y fenotipos relacionados con una alteración de cada una de las vías estudiadas.

Vía de Hedgehog

La vía de Hedgehog (Hh) es una vía de señalización intracelular que regula la morfogénesis, y el crecimiento de los órganos y tejidos. Fue descrita y caracterizada por primera vez en *Drosophila* (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980) y posteriormente se determinó que es una vía conservada tanto en los invertebrados como en los vertebrados. En los mamíferos, la vía de Hh comprende una familia de lipoproteínas de secreción formada por Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). Shh es un importante regulador del desarrollo embrionario así como de la homeostasis postnatal. Su rol más estudiado ha sido en la especificación del tubo neural y en el desarrollo de las extremidades. Ihh y Dhh participan en el desarrollo de los huesos y en la espermatogénesis, respectivamente (Eggenchwiler & Anderson, 2007).

La señalización por Hh comienza cuando uno de los ligandos se une a su receptor, llamado Patched (Ptc), el cual es un receptor atípico ya que su actividad es requerida para mantener a la vía apagada en ausencia de ligando. La función de Ptc consiste en inhibir la función de Smoothed (Smo), una proteína transmembrana que es un mediador

positivo central en la señalización por Hh (**Figura 8**). Tras la unión de Shh, el receptor patch1 (Ptc1) se inactiva, y esto libera a Smo quien una vez liberada regula la actividad de tres factores de transcripción de la familia Gli, llamados Gli1, Gli2 y Gli3. Estos factores pueden actuar como represores o activadores transcripcionales. Al activarse la vía, Smo bloquea tanto la degradación de Gli2 como el procesamiento de Gli3 hacia su forma represora (Gli3R). Esto permite que sean translocados al núcleo y actúen como fuertes activadores de muchos genes diana (Varjosalo & Taipale, 2008). Aunque no se comprende completamente el mecanismo, se ha determinado que la localización subcelular de los diferentes componentes de la vía es importante para su actividad y que la cilia primaria y el transporte intraflagelar son componentes claves en este proceso. La primera asociación entre la cilia primaria y la vía de Shh fue a partir de un ensayo de generación de ratones mutantes, en el cual se buscaba defectos en el tubo neural (Huangfu, 2003). De ese ensayo surgieron dos mutantes, llamados wimple (wim) y flexo (fxo), que presentaban defectos característicos de la vía Shh, tales como alteraciones del cierre del tubo neural y anomalías en el cerebro y en las extremidades. Curiosamente, se demostró que los fenotipos wim y fxo, eran causados por una mutación en el gen de IFT172 e IFT88, respectivamente (Huangfu, 2003). Este trabajo demostró por primera vez que el transporte intraflagelar es requerido para la correcta señalización por Shh y puso a la cilia primaria en el foco de estudio de esta vía. Fue así como trabajos posteriores demostraron que luego de la activación por Shh, la proteína Smo es translocada hacia la cilia y que esta localización es esencial para su actividad (ver **Figura 8**; Corbit, 2005; Aanstad, 2009). También se demostró que Ptc1 se localiza en la cilia e inhibe la actividad de Smo al evitar su acumulación en el compartimento ciliar. La unión de Shh determina que Ptc1 sea translocado fuera de la cilia y Smo sea capaz de entrar, en un proceso dependiente de las β -arrestinas y Kif3a (Rohatgi, 2007; Kovacs, 2008). Conjuntamente también se demostró que Gli1, Gli2 y Gli3 se localizan en las cilias y que la pérdida de IFT88 conduce a una alteración del procesamiento de Gli2 y Gli3 (Haycraft, 2005). El conjunto de estos resultados demostraron que la ciliogénesis y la correcta función ciliar, parecen ser críticos para mantener una correcta señalización por Hh. Esto fue enfatizado usando diversos modelos animales con mutaciones en proteínas del IFT, los cuales se caracterizan por presentar severas anormalidades del desarrollo, atribuibles todas a defectos en la vía Shh (Eggenchwiler & Anderson, 2007). Brevemente, mutaciones en

IFT139, mutada en el ratón *alien* (*aln*), da como resultado cilias primarias anormales y una sobre-activación de la vía Shh (Tran, 2008). Otro ejemplo son mutaciones en la proteína motora *Dnchc2* y en la proteína del cuerpo basal *Ftm1*, que resultan en un incorrecto procesamiento de Gli3 y en animales con defectos en el tubo neural, en la asimetría derecha-izquierda y en las extremidades (Vierkotten, 2007). Usando ratones mutantes condicionales, también ha sido demostrado que la reducción de *Kif3a* en los miembros en desarrollo provoca defectos en la señalización por Shh e *Ihh*, lo que resulta en polidactilia y en alteraciones en el patrón de formación de los dígitos (Haycraft, 2007). De manera similar, una reducción de *Kif3a* en los cartílagos resulta en alteraciones en la organización de las placas de crecimiento de los huesos, así como en una excesiva osificación intramembranosa, defectos que se correlacionan con alteraciones de la vía mediada por *Ihh* (Koyama, 2007).

También se demostró por medio de mutaciones en *Ift88* o *Kif3a* a nivel de diferentes poblaciones neuronales, que la vía de Shh es necesaria para mantener un grupo de células progenitoras neuronales, tanto a nivel del giro dentado como del cerebelo (Chizhikov, 2007; Han, 2008; Spassky, 2008). A nivel del cerebelo, se demostró que la vía de Shh mediada a través de las cilias, es necesaria para mantener y aumentar el grupo de células precursoras granulares. En este sentido, la mutación específica de *Ift88*, *Kif3a* o *Smo* en éstas células determina una reducción de la expansión de este grupo de células y una hipoplasia del cerebelo (Chizhikov, 2007; Spassky, 2008).

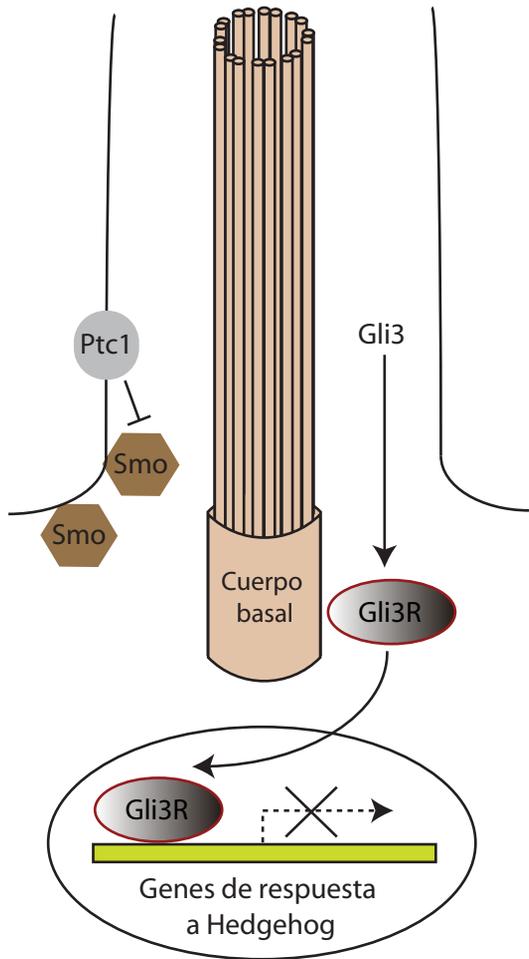
Es importante destacar que muchas de las alteraciones que se observan en los modelos animales antes mencionados, son características de las ciliopatías humanas como se verá más adelante. Es por esto que se han hecho considerables progresos para entender el rol de la vía de Hh en la patogénesis de estos síndromes.

Figura 8 _Vía de Sonic Hedgehog y su relación con las cilias primarias.

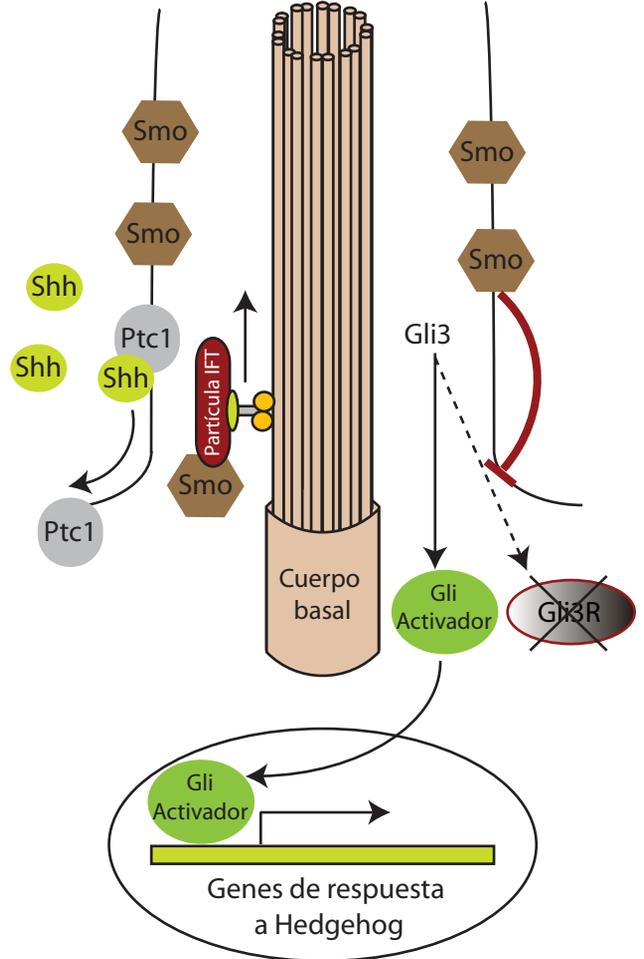
En ausencia de Shh (izquierda) el receptor *patched* (Ptc1) se localiza en la cilia, impidiendo la acumulación en la cilia de *smoothened* (Smo) y favoreciendo el procesamiento del factor de transcripción Gli3 hacia su forma represora (Gli3R). La unión del ligando Shh (derecha) determina que Ptc1 sea translocado hacia afuera del compartimento ciliar, lo que permite que Smo sea transportado por el mecanismo de IFT hacia el interior del compartimento ciliar. La acumulación dentro de la cilia de Smo inhibe el procesamiento de Gli3 hacia Gli3R y favorece el procesamiento hacia su forma activadora, controlando a nivel nuclear la expresión de los genes blancos de la vía.

Adaptado de: Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009.

Sin ligando Shh



Luego de la estimulación con Shh



Vía de Wnt

La vía de Wnt es una vía de señalización intracelular que participa en muchos procesos del desarrollo y en la homeostasis celular. Es una vía extremadamente conservada entre los invertebrados y vertebrados, y muy expandida en los mamíferos. Esta vía ha sido asociada con el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y con la generación de polaridad celular (Logan & Nusse, 2004). La vía de Wnt está dividida principalmente en dos subvías interconectadas (**Figura 9**). Por un lado, la vía canónica o dependiente de β -catenina, la cual está involucrada en la proliferación celular, diferenciación y desarrollo. Por otro lado, la vía no canónica o β -catenina independiente (también llamada PCP, del inglés *planar cell polarity*), que provee a las células de claves espaciales para el movimiento coordinado de células, como ocurre durante los movimientos de convergencia y extensión de la gastrulación y neurulación, y para la correcta organización de los tejidos. Las proteínas Wnt son una familia de factores de secreción (19 genes en humanos) que se unen a receptores de membrana, llamados Frizzled (Fz), en el espacio extracelular. Una proteína clave de esta vía es Disheveled (Dvl), quien actúa como un interruptor entre las dos subvías dependiendo de la localización subcelular en que se encuentre (Logan & Nusse, 2004; Gerdes & Katsanis, 2008; Park, 2005).

En la vía canónica o dependiente de β -catenina, la unión de un ligando Wnt a un receptor Fz determina que la proteína Dvl interactúe con la proteína Axina y la desplace del complejo citoplasmático que forma junto a APC (del inglés *Adenomatous poliposis coli*), GSK-3 β (del inglés *glycogen synthase kinase 3 β*) y CKI (del inglés *Casein kinase I*). Este complejo es el responsable de fosforilar constitutivamente a β -catenina, marcándola para ser reconocida y degradada por el proteasoma. La inhibición de este complejo y la consecuente estabilización de β -catenina, permite que ésta sea translocada al núcleo, donde actúa como un factor transcripcional de genes implicados en la progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación y desarrollo (Grigoryan, 2008).

En la vía no canónica de Wnt o PCP la unión de un ligando Wnt específico (Wnt5a, Wnt4 y Wnt11) hace que el complejo formado por el receptor Fz, junto a las proteínas Vangl2 y Celsr, recluten a la membrana al complejo proteico donde se encuentra la proteína Dvl unida a la proteína Prickle. Esta vía luego procede a través de varios efectores, como ser

PKC, CamKII y RhoGTPasas, quienes participan en la remodelación del citoesqueleto en procesos de polaridad y movimiento celular (McNeill & Woodgett, 2010).

Aún no se conoce completamente el proceso de regulación entre las subvías, pero se han caracterizado ligandos Wnt y receptores Fz específicos para cada subvía, así como se determinó la importancia de la localización subcelular de la proteína Dvl (en el citoplasma o en la membrana) en este proceso. A partir de modelos animales, también se determinó que la proteína Inversina actúa como un regulador, ya que marca a la proteína Dvl citoplasmática para ser degradada por el proteasoma, lo que desencadena una inhibición de la vía dependiente de β -catenina y un aumento de la vía PCP (Simons, 2005).

La relación entre la vía de Wnt y las cilias no es tan clara como en el caso de la vía de Hh y aún resta mucho por determinarse. Esto se debe a que a pesar de que en los últimos años han surgido un conjunto importante de datos que demuestran una participación de las cilias en esta vía, también existen datos contradictorios (Wallingford, 2010). Una de las primeras conexiones que se estableció entre las cilias y la vía de Wnt, fue analizando la base celular de la formación de quistes renales en varias patologías humanas, como ser poliquistosis renal y nefronoptisis. El estudio de la función de los genes/proteínas mutadas en estos síndromes permitió ligar a la disfunción ciliar con la patogénesis de los quistes renales (Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009; Gascue, 2010). Una contribución muy importante vino de los estudios de la proteína inversina, la cual está mutada en pacientes con nefronoptisis y de la cual se demostró que se localiza en la base de las cilias e interactúa físicamente con Dvl (Otto, 2003; Watanabe, 2003; Simons, 2005). Estos primeros resultados sugerían que procesos mediados por las cilias tenían un efecto inhibitorio sobre la vía canónica de Wnt. Esto fue apoyado posteriormente por varios trabajos donde demostraron que la ausencia de muchas otras proteínas asociadas con las cilias (como ser BBS1, BBS4, MKKS, Kif3a, OFD1, IFT88 y Chibby), determinan una hiperactivación de la vía canónica de Wnt (Gerdes, 2007; Corbit, 2008; McDermott, 2010; Voronina, 2009). Sin embargo, una observación que era difícil de explicar era la falta en estos animales de fenotipos asociados con un aumento de la vía canónica de Wnt o cambios en la expresión de genes blancos de β -catenina (Huang & Schier, 2009; Ocbina, 2009). No obstante, un dato que ayudó a comprender la relación entre las cilias y la vía de Wnt, fue la demostración de que la vía PCP es la responsable de determinar la orientación

de los cuerpos basales en la base de las cilias (Park, 2008; Mitchell, 2009; Borovina, 2010; Guirao, 2010; Tissir & Goffinet, 2010; Antic, 2010; Hashimoto & Hamada, 2010; Song, 2010). Esta orientación influye en la dirección del batido ciliar, lo cual tiene profundas consecuencias en el desarrollo embrionario y esto podría explicar porque estos modelos animales presentan fenotipos que están asociados con defectos en la vía PCP y no en la vía canónica, como ser defectos en el cierre del tubo neural, defectos en el cierre de los párpados y alteración de la distribución de los haces de esterocilias de la cóclea (Wallingford, 2006; McNeill & Woodgett, 2010). Es por esto que actualmente se considera que el verdadero rol de las cilias es modular el balance entre la vía canónica y no canónica de Wnt y que la proteína inversina jugaría un rol central en este proceso a través de su localización en la base de las cilias (**Figura 9**).

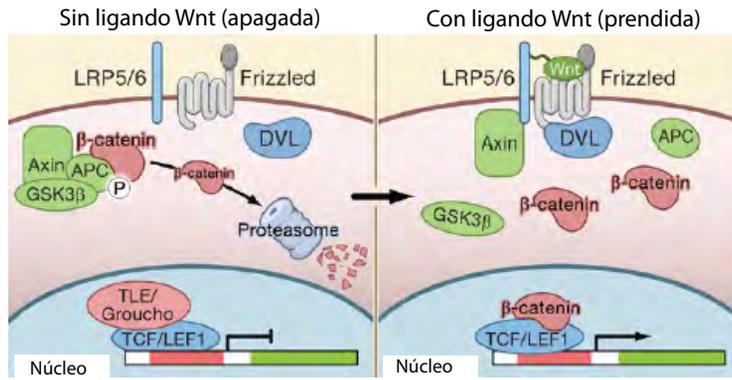
Figura 9_Vía de Wnt y su relación con las cilias.

A) Vía canónica o dependiente de β -catenina. En ausencia de Wnt (izquierda) β -catenina es constitutivamente fosforilada por el complejo formado por las proteínas Axin, APC y GSK3 β . Esa fosforilación la marca para ser reconocida y degradada por el proteasoma. Bajo esas condiciones la expresión de los genes blanco de Wnt es reprimida por el complejo TCF/LEF1 y TLE. En presencia de ligando Wnt (derecha), éste se une al complejo formado por el receptor *Frizzled* y el co-receptor LRP5/6. Este complejo recluta y une a las proteínas *Dishevelled* (Dvl) y Axin, lo que impide que se forme el complejo Axin/APC/GSK3 β , estabilizando de este modo a β -catenina en el citoplasma. β -catenina es translocada hacia el núcleo, donde desplaza a TLE y activa a los genes blanco de la vía. B) Vía no canónica o PCP. La unión de ligandos Wnt no canónicos al receptor *Frizzled* determina el reclutamiento de Dvl a la membrana y la activación de moléculas efectoras que afectan el citoesqueleto de actina y la polaridad celular. La regulación de la vía PCP también ocurre a nivel de la cilia/cuerpo basal a través de la interacción de Dvl con *Vangl2*, *inturned* (Inv), *inversina* (Inv) y *fuzzy* (Fy). C) Las cilias modulan el balance entre la vía canónica y la vía PCP. En condiciones de señalización normal de las cilias/cuerpo basal (izquierda), la proteína Inv favorece la señalización por la vía PCP por medio de la inhibición de Dvl y la activación del complejo Axin/APC/GSK3 β . La alteración de la señalización mediada por las cilias (derecha) resulta en una disminución de la vía PCP y el consecuente incremento de la señalización por la vía canónica.

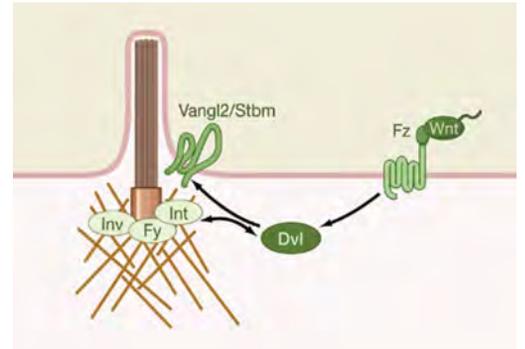
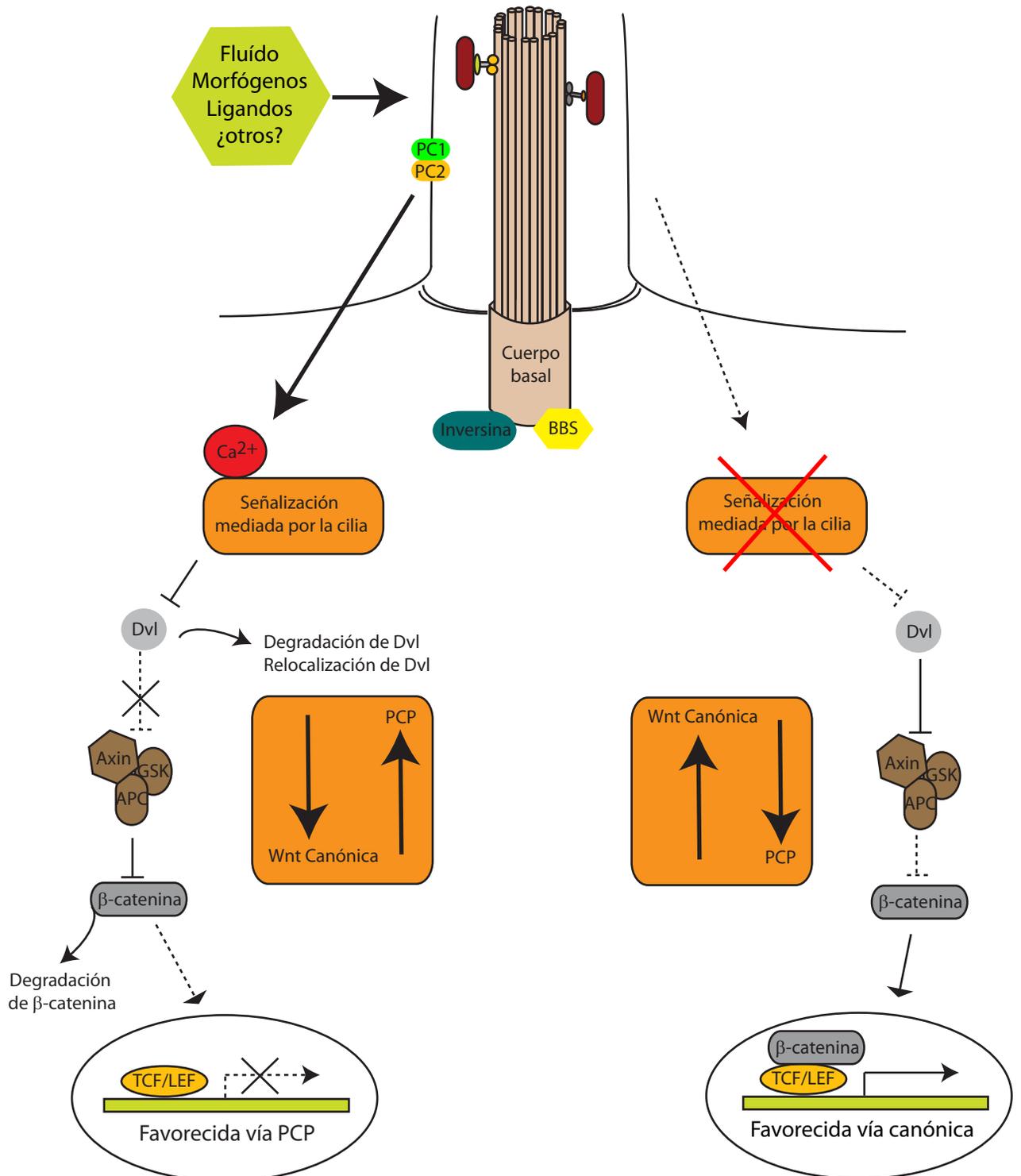
Adaptado de: Gerdes, 2009; Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009.

A

Vía canónica de Wnt o dependiente de β -catenina

**B**

Vía no canónica de Wnt o PCP

**C**

Vía PDGF α

Otra vía de señalización que se ha demostrado que opera a través de las cilias primarias es la vía mediada por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF (del inglés *platelet derived growth factor*). Esta vía participa en el control de la supervivencia y proliferación celular a través del control del ciclo celular y también es clave en dirigir la migración celular que ocurre durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis de los tejidos adultos (Andrae, 2008). Las moléculas de PDGF son sintetizadas y secretadas por varios tipos celulares diferentes y sus receptores, llamados PDGFR α y PDGFR β , también están presentes en diversos tejidos. La activación del receptor PDGFR α desencadena eventos de autofosforilación que llevan a la activación de cascadas de señalización mediadas por las quinasas Akt y Mek1/2-Erk1/2 (Christensen, 2008). Debido a que la vía PDGF está relacionada con el ciclo celular y al hecho de que las cilias son estructuras postmitóticas, Schneider y colaboradores estudiaron cuál es la relación entre las cilias y la vía PDGF (Schneider, 2005). Trabajando con células en estado estacionario (Go, cilindadas) determinaron que la expresión del receptor PDGFR α se encuentra aumentada en esta fase del ciclo, así como que se localiza en las cilias primarias. También demostraron que células provenientes de ratones Tg737^{orpk}, que carecen de cilias, no presentan un aumento de la expresión de este receptor ni activación de esta vía. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en varios tipos celulares diferentes (Awan, 2008; Danilov, 2009). El mecanismo por el cual PDGFR α es regulado positivamente y enviado a las cilias aún no se conoce, sin embargo, se ha identificado que este receptor posee una secuencia similar a las que presentan algunas proteínas que tienen un destino ciliar (Schneider, 2005). Tampoco se conoce cómo es que la activación de ésta vía a nivel de las cilias se traduce en cambios en el ciclo celular. Existen algunos datos que podrían ligar la activación de PDGFR α con la activación de la quinasa Aurora A, la cual se ha demostrado que fosforila y activa a la histona deacetilasa de microtúbulos HDAC-6, lo que provoca el desensamblaje de la cilia y la entrada al ciclo celular (Yokote, 1996; Pugacheva, 2007).

La vía PDGF también ha sido relacionada con procesos de migración celular y se ha demostrado que ésta función también es mediada por las cilias primarias (Schneider, 2010). En este sentido, se ha demostrado que defectos en la migración de las células de la

cresta neural causan las alteraciones craneofaciales y la falta de inervación intestinal que por ejemplo se observa en la ciliopatía Bardet-Biedl (Tobin, 2008).

A pesar de que resta mucho por conocerse sobre la relación entre la vía PDGF y las cilias primarias, es importante resaltar que los avances que se realicen en esta área, permitirán explicar muchos de los fenotipos que se observan en las ciliopatías y que aún no han podido ser explicados por las otras vías que operan a través de las cilias.

mTOR: una nueva vía asociada a las cilias

El estudio de la vía de mTOR es quizás una de las áreas de investigación que más rápido se expandió en los últimos 15 años. Esto se debió a que no solo se demostró la importancia que tiene dentro de la célula sino porque su alteración ha sido asociada con enfermedades de alta prevalencia en la población como son la diabetes tipo 2, obesidad, neurodegeneración y cáncer (Zoncu, 2011). Sin embargo, su asociación con las cilias es un hallazgo reciente y aún es muy poco lo que se conoce. Debido a la importancia de la asociación entre la vía de mTOR y las cilias para la interpretación de los resultados de esta tesis, se hará primero una breve introducción a sus funciones y posteriormente se describirán brevemente algunos de los trabajos que consideramos más relevantes en este tema.

Generalidades sobre la vía de mTOR

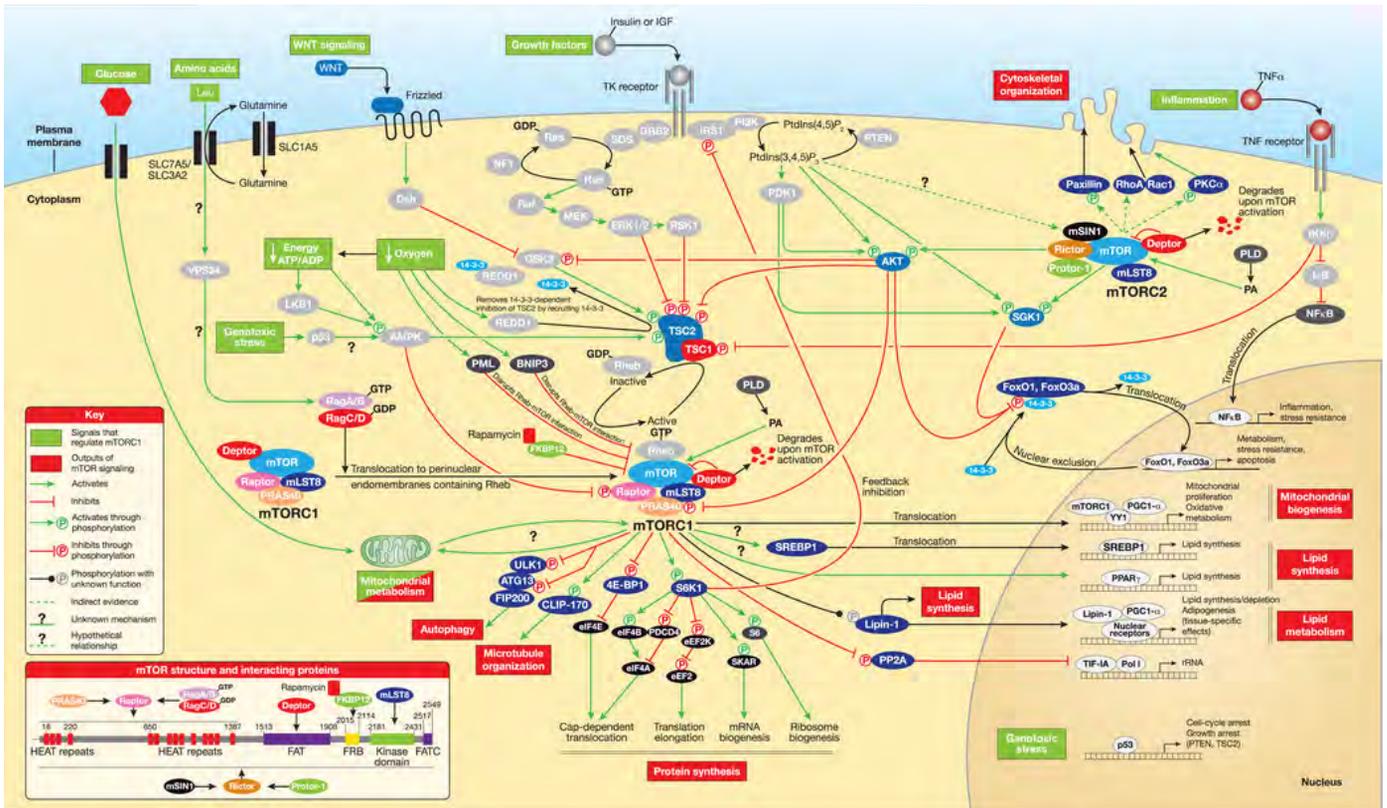
La vía de mTOR es una red de señales que media tanto procesos catabólicos como anabólicos dentro de la célula. La proteína TOR (del inglés *Target of Rapamycin*) juega un rol central en esta vía, controlando el crecimiento y el metabolismo celular frente a señales del entorno. Como su nombre lo indica, TOR es el blanco de la droga rapamicina, un macrólido antifúngico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, la cual fue aislada de una muestra del suelo de la isla de Pascua en la década de 1970 (Vezina, 1975). La rapamicina actúa inhibiendo fuertemente el crecimiento y la proliferación celular y fue a comienzos de 1990, a partir de una búsqueda genética en levaduras, cuando se identificó a TOR como uno de los mediadores del efecto tóxico de esta droga (Heitman, 1991). Poco tiempo después, el ortólogo en mamíferos de TOR, llamado mTOR

(actualmente por *mechanistic TOR*), fue identificado y clonado (Brown, 1994; Chiu, 1994; Sabatini, 1994). mTOR es una quinasa de serinas y treoninas, que pertenece a la familia de las PIKK (del inglés *phosphatidylinositol 3 kinase-related kinase*), con un peso molecular de 290 kDa. La importancia fisiológica de mTOR queda demostrada por el hecho de que la eliminación total de su expresión en el ratón (ratón *knockout*) es letal durante el desarrollo embrionario (Murakami, 2004; Gangloff, 2004). Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual la droga rapamicina inhibe a TOR, se sabe que cuando entra a la célula se une a una pequeña proteína receptora, llamada FKBP12 y es este complejo el que se une específicamente a mTOR y bloquea su función (Brown, 1994; Sabatini, 1994). mTOR interactúa con muchas proteínas para formar al menos dos complejos multiproteicos diferentes: el complejo mTOR1 (mTORC1) y el complejo mTOR2 (mTORC2). Además de presentar una composición proteica diferente, los complejos mTOR tienen también importantes diferencias en cuanto a su sensibilidad frente a la rapamicina, en las señales que integran, en los sustratos que regulan y en los procesos biológicos que controlan (**Figura 10**). A continuación se describe la composición y funciones de cada uno de estos complejos.

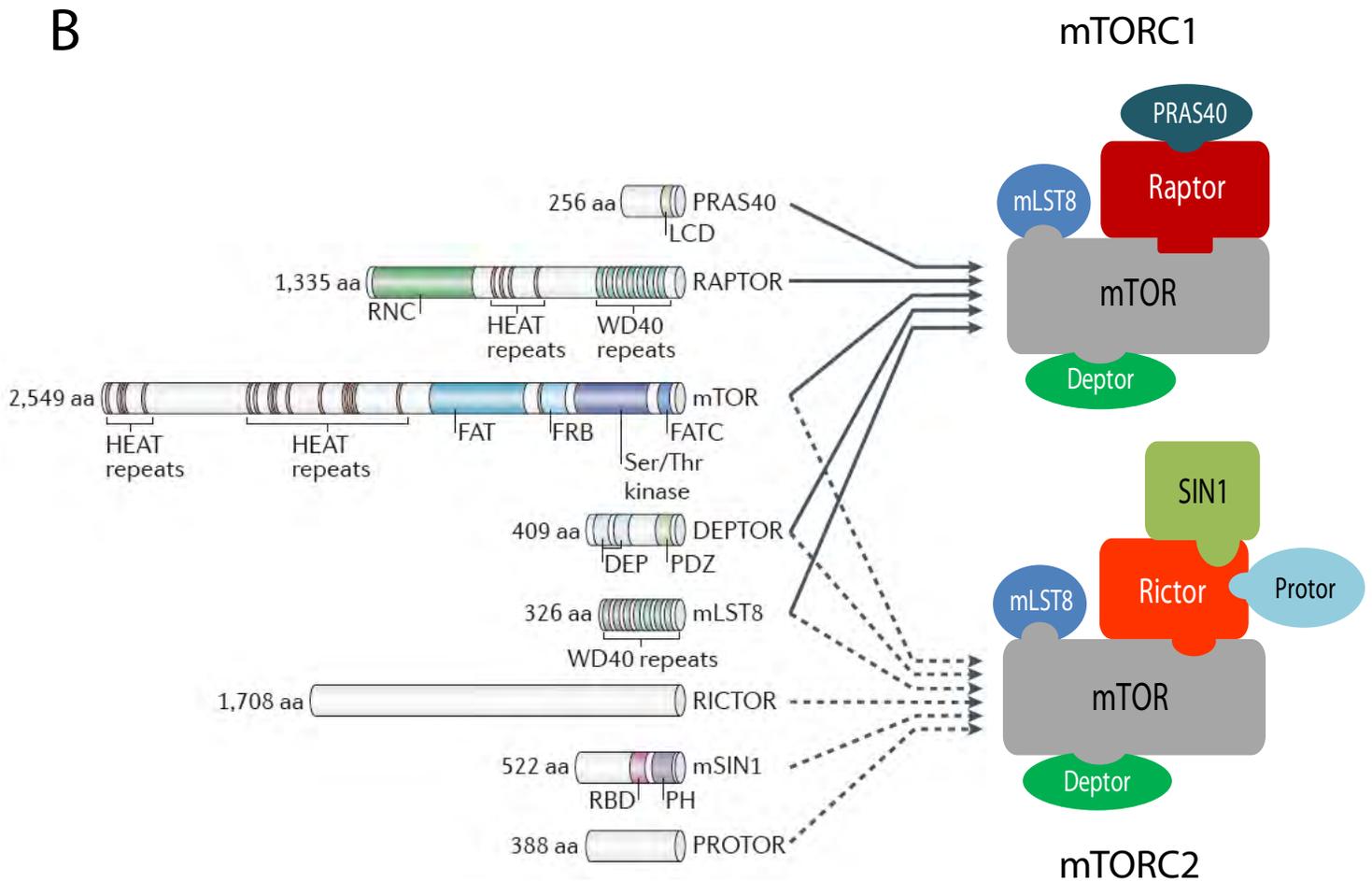
Figura 10_Vía de mTOR

A) Esquema general de la vía. B) Componentes proteicos de los complejos mTOR1 y mTOR2. Adaptado de: Laplante & Sabatini, 2009; Zoncu, 2011.

A



B



Complejo mTOR1 (mTORC1)

El complejo mTOR1 fue el primero en ser caracterizado y su actividad es inhibida por la droga rapamicina, aunque el mecanismo exacto aún hoy no se conoce. Está formado por cinco proteínas diferentes: mTOR, que funciona como la subunidad catalítica del complejo, Raptor (del inglés *regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (del inglés *mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (del inglés *proline-rich Akt substrate 40kDa*) y Deptor (del inglés *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) (**Figura 10**). Con respecto a sus funciones dentro del complejo, se ha reportado que Raptor es necesaria para el ensamblaje del complejo y para reclutar los sustratos hacia mTOR (Hara, 2002; Kim, 2002), PRAS40 y Deptor funcionan como dos reguladores negativos de mTORC1 (Sancak, 2007; Peterson, 2009), mientras que el rol de mLST8 no se conoce ya que su ausencia no afecta la función del complejo (Guertin, 2006).

mTORC1 promueve el crecimiento y la proliferación celular por medio de procesos anabólicos como ser la síntesis de proteínas y de lípidos (revisado en Laplante & Sabatini, 2009, 2012). El control de la síntesis de proteínas lo realiza principalmente a través de la fosforilación de la quinasa S6 (S6K, del inglés *p70 ribosomal S6 kinase 1*) y del regulador de la traducción 4E-BP1 (del inglés *eucariotic initiation factor 4E-binding protein 1*), mientras que el control de la biosíntesis de lípidos lo realiza por medio de la activación de los factores de transcripción SREBP1 (del inglés *sterol regulatory element binding protein 1*) y PPAR γ (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), los cuales activan la expresión de genes involucrados en la homeostasis de lípidos y colesterol. mTORC1 también inhibe procesos catabólicos por medio del bloqueo de la autofagia a través de la fosforilación del complejo formado por las proteínas ULK1 (del inglés *unc-51-like kinase 1*), ATG13 (del inglés *autophagy-related gene 13*) y FIP200 (del inglés *focal adhesión kinase family-interacting protein of 200kDa*) (revisado en Laplante & Sabatini, 2009, Laplante & Sabatini, 2012; Bracho-Valdes, 2011).

El complejo mTOR1 integra por lo menos cuatro tipos de señales: factores de crecimiento, estatus energético, oxígeno y amino ácidos. La actividad de mTORC1 es regulada por medio de la actividad del complejo TSC (del inglés *tuberous sclerosis complex*), el cual es un heterodímero formado por TSC1 (también llamada hamartin) y

TSC2 (también llamada tuberin). Se ha demostrado que la forma activa de la GTPasa Rheb (Rheb-GTP, del inglés *Ras homolog enriched in brain*) es quien interactúa directamente con mTORC1 y estimula su actividad. El complejo TSC1/TSC2 regula negativamente la actividad de mTORC1 por medio de convertir a Rheb en su estado inactivo (Rheb-GDP). Los factores de crecimiento bloquean la actividad de TSC1/TSC2 y activan a mTORC1, mientras que la falta de energía (relación ATP/ADP) y la privación de oxígeno promueven la actividad de TSC1/TSC2 e inhiben a mTORC1. Por otro lado, los amino ácidos también activan a mTORC1 pero a través de la acción de las GTPasas Rag. Se ha demostrado que en presencia de amino ácidos, las GTPasas Rag interactúan con mTORC1, lo cual promueve su translocación desde el citoplasma a la región perinuclear donde se localiza Rheb (revisado en Laplante & Sabatini, 2009; Laplante & Sabatini, 2012).

Complejo mTOR2 (mTORC2)

El complejo mTOR2 fue caracterizado originalmente como insensible a la rapamicina aunque posteriormente se determinó que en algunos tipos celulares, tratamientos más largos y con mayores dosis también reducen su actividad (Sarbasov, 2006). Este complejo está formado por seis proteínas diferentes: mTOR, Rictor (del inglés *rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (del inglés *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*), Protor-1 (del inglés *protein observed with Rictor 1*), mLST8 y Deptor (**Figura 10**). Ha sido reportado que Rictor y Sin1 son proteínas centrales en el complejo, ya que cumplen funciones estructurales y se estabilizan mutuamente (Frias, 2006; Jacinto, 2006). Protor-1 interactúa con el complejo a través de Rictor y su función no se conoce (Pearce, 2007; Pearce, 2011). Deptor también funciona como un regulador negativo de este complejo, siendo el único inhibidor endógeno de mTORC2 caracterizado hasta el momento (Peterson, 2009). En el marco de mTORC2, la función de mLST8 parece ser esencial, ya que el ratón knockout presenta reducción de la estabilidad y actividad de este complejo (Guertin, 2006).

A diferencia de mTORC1, se conoce mucho menos acerca de la función de mTORC2. Esto se debe a que no se conocen inhibidores específicos para este complejo y el uso de ratones knockout no ha aportado mucha información por ser letales en las primeras

etapas del desarrollo embrionario (Guertin, 2006; Shiota, 2006). Sin embargo, utilizando líneas celulares se ha determinado que mTORC2 regula la proliferación celular, el metabolismo y la reorganización del citoesqueleto de actina (revisado en Oh & Jacinto, 2011).

La señalización por mTORC2 es insensible a la activación por nutrientes pero responde a factores de crecimiento, tal como insulina, a través de un mecanismo dependiente de la PI3K (del inglés *phosphatidylinositol 3 kinase*). Los procesos que regula mTORC2 dependen principalmente de la activación de varias quinasas de la subfamilia AGC, como ser Akt (también llamada PKB), SGK1 (del inglés *serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) y PKC α (del inglés *protein kinase C- α*). Akt regula varios procesos celulares a través de la fosforilación de varios efectores, como ser los factores de transcripción FoxO1 y FoxO3a, los cuales controlan la expresión de genes implicados en el metabolismo, ciclo celular y apoptosis. Se demostró que mTORC2 es quien fosforila directamente a Akt en la serina 473 de su dominio hidrofóbico y que esta fosforilación es requerida para su completa activación (Sarbasov, 2005). mTORC2 también fosforila a la quinasa SGK1, la cual está implicada en el transporte de iones y el crecimiento celular (García-Martínez & Alessi, 2008). La función de mTORC2 en la reorganización del citoesqueleto de actina es mediada a través de la fosforilación y regulación de la quinasa PKC α , de la proteína de las adhesiones focales paxilina y de las GTPasas RhoA y Rac1 (Jacinto, 2004; Sarbasov, 2004).

mTOR y cilias

La asociación de la vía de mTOR con las cilias surgió principalmente de estudiar la base celular de la formación de quistes renales en varias enfermedades humanas, principalmente en la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD, del inglés *autosomal-dominant polycystic kidney disease*), la cual es una de las enfermedades genéticas más comunes afectando a más de 12 millones de personas en el mundo (Gallagher, 2010). Esta enfermedad es causada por mutaciones en dos genes, *PKD1* y *PKD2*, que codifican para las proteínas llamadas policistina 1 y 2 (PC1 y PC2), respectivamente. PC1 es una proteína con 11 dominios transmembrana cuyo extremo

amino terminal extracelular contiene una combinación de dominios proteicos implicados en interacciones proteína-proteína. PC2 es un canal catiónico no selectivo permeable al Ca^{2+} que pertenece a la subfamilia TRPP de canales catiónicos. Estas dos proteínas forman un dímero en el cual PC1 actúa como un receptor que controla la actividad del canal PC2 (Qian, 1997; Tsiokas, 1997; Hanaoka, 2000). El canal PC1/PC2 se localiza en las cilias del epitelio renal, donde participa en el sensado de fluidos y fue demostrado que su ausencia o incorrecta función determina el desarrollo de quistes renales (Yoder, 2002; Pazour, 2002; Nauli, 2003).

Una primera asociación de la interacción entre cilias y la vía mTOR surgió de la caracterización de que la cola citoplasmática de PC1 interactúa con la proteína TSC2 y colocaliza con mTOR en el aparato de Golgi. En ese trabajo también mostraron que el epitelio que recubre a los quistes renales presenta una actividad de mTORC1 aumentada, la cual era revertida por el uso de rapamicina y determinaba una reducción del tamaño de los quistes renales (Shillingford, 2006). De este modo, estos resultados mostraron por primera vez que la alteración de la vía de mTOR puede estar ligada a una alteración de la función mecanosensora de las cilias primarias del epitelio renal y ser la causante de la formación de quistes renales. Como se describió previamente, TSC2 junto a TSC1 forman un complejo inhibitorio de la actividad de mTORC1. Mutaciones en estas proteínas son las causantes de una enfermedad humana llamada esclerosis tuberosa (TSC, del inglés *Tuberous sclerosis complex*), la cual se caracteriza por la formación de tumores benignos y quistes en diversos órganos del cuerpo (Sparagana & Roach, 2000). Debido a que la rapamicina se comenzó a utilizar con fines terapéuticos para reducir los quistes renales, surgieron varios trabajos que buscaban aportar información sobre la asociación entre las proteínas TSC con el desarrollo de quistes renales y por lo tanto la posible participación de la vía de mTOR en este proceso. En este sentido, se demostró que la proteína TSC1 se localiza en el cuerpo basal de las cilias primarias del epitelio renal y que tanto TSC1 como TSC2 participan en procesos de ciliogénesis (Hartman, 2009; DiBella, 2009; Bonnet, 2009). Posteriormente, utilizando el modelo de pez cebra, se caracterizó que la reducción de la expresión de TSC1 genera fenotipos asociados con defectos en las cilias, como son la formación de quistes renales, defectos en la curvatura del cuerpo y en la asimetría derecha-izquierda, así como demostraron una interacción genética entre TSC1 y

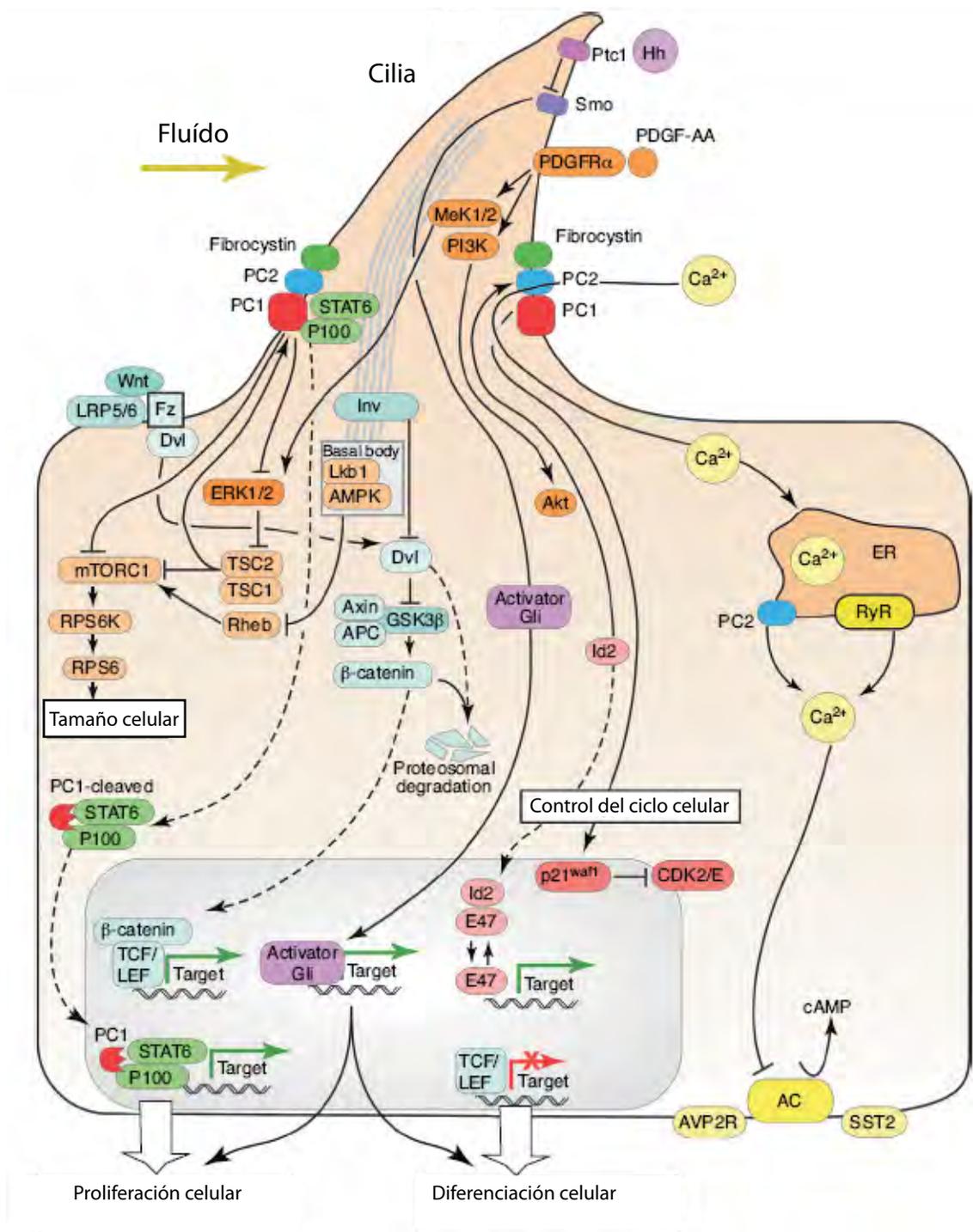
las proteínas del transporte intraflagelar IFT81 e IFT172 (DiBella, 2009). Por medio del uso de ratones transgénicos posteriormente se demostró que TSC1 y TSC2 interactúan genéticamente con PC1 para modular el largo de las cilia (Bonnet, 2009). Recientemente se demostró una asociación directa entre la cilia y la vía de mTOR, donde la flexión de la cilia por el movimiento de fluidos extracelulares sería el factor que inhibe a la actividad de mTORC1 y determina una reducción del tamaño celular (Boehlke, 2010). A pesar de que el mecanismo no se conoce completamente, en este trabajo plantearon que la flexión de las cilia activa a la quinasa LKB1, la cual se localiza en el cuerpo basal y en la cilia, y una vez activada fosforila a la quinasa AMPK en el cuerpo basal. AMPK sensa niveles de ATP/ADP y cuando está activa fosforila a TSC1/TSC2, lo que determina una inhibición de la actividad de mTORC1.

Muy recientemente, Yuan y colaboradores demostraron que la reducción de la expresión de TSC1 en el pez cebra determina la formación de cilia más largas y que esta alteración puede ser revertida por la droga rapamicina (Yuan, 2012). En este trabajo plantean que la regulación de TSC1 sobre el largo de las cilia es a través de la actividad de mTORC1, mediada por la cascada de activaciones/inhibiciones S6K-GSK3 β -TSC-mTORC1. mTORC1 modularía el largo de las cilia por medio de la síntesis de proteínas precursoras de las cilia, por lo que una alteración de la función de este complejo determina la aparición de fenotipos asociados con la disfunción ciliar como fue reportado previamente (DiBella, 2009; **Figura 11**).

Es importante mencionar que todos los trabajos que reportan una relación de la vía de mTOR con las cilia se basan en la actividad del complejo mTOR1. Hasta el momento no existen reportes que vinculen una posible participación del complejo mTOR2 con la función de las cilia primarias.

Figura 11_ Participación de las cilias en distintas vías de señalización.

Esquema a modo de resumen de la participación de las cilias en la vía de Shh, Wnt, PDGFR α y mTOR y los procesos que se desencadenan. Tomado de: Ibraghimov-Beskrovnaya & Natoli, 2011.



Consecuencias de la alteración funcional de las cilias: las Ciliopatías

Las ciliopatías son definidas como una clase de enfermedades genéticas humanas, cuya etiología es el mal funcionamiento de las cilias. Esto significa que el concepto de ciliopatía abarca a diferentes entidades clínicas que comparten no solo un defecto celular común sino una serie de fenotipos que se solapan. Muchos de los síndromes que se han agrupado dentro de esta clase fueron caracterizados previamente como entidades separadas, sin conexión entre ellos, y considerados como desórdenes raros de difícil explicación clínica. Es por esto, que la identificación de los fenotipos que causa la alteración de las cilias sirvió como una herramienta predictiva para entender la base celular de muchos de estos desórdenes (Baker & Beales, 2009; Badano, 2006; Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009).

Los fenotipos característicos de las ciliopatías abarcan defectos en múltiples órganos y en el caso de los mamíferos incluyen: degeneración de la retina, anosmia, polidactilia postaxial, *situs inversus* y formación de quistes en riñones, hígado y páncreas. A pesar de que la lista de ciliopatías confirmadas sigue creciendo, al momento agrupa a 11 síndromes. Estos son: Bardet-Biedl, (BBS), Nefronoptisis (NPHP), Senior-Løken (SNLS), Alström (ALMS), Meckel (MKS), Joubert (JBTS), oral-facial-digital tipo I (OFD 1), displasia torácica asfixiante de Jeune (JATD), Ellis-van Creveld (EVC), Amaurosis congénita de Leber (LCA) y las poliquistosis renales autosómica dominante o recesiva (ADPKD o ARPKD) (Tobin & Beales, 2009; **Tabla 2**).

A nivel genético, el concepto de ciliopatía ha tenido un impacto importante para poder comprender ciertos fenómenos. Por un lado el estudio de la base genética de las ciliopatías permitió determinar que alteraciones en diferentes genes pueden resultar en fenotipos similares o idénticos así como también mutaciones en un mismo gen pueden estar asociadas causalmente a más de una ciliopatía. Estas observaciones resaltan las similitudes en la base celular de estas patologías e indica la existencia de cierto grado de redundancia en el sistema. A nivel genético esto explica diversas observaciones. Por ejemplo, muchas ciliopatías son desórdenes genéticamente heterogéneos, ya que mutaciones en distintos genes dan como resultado manifestaciones que clínicamente son indistinguibles. A su vez, para muchas ciliopatías se ha observado que en algunas

familias mutaciones en más de un gen pueden modular tanto la penetrancia como la expresividad del síndrome, lo que nuevamente resalta cierta redundancia funcional (Davis & Katsanis, 2012). Finalmente, también se han documentado casos en los que mutaciones en un gen determinado pueden estar causalmente asociadas a más de una ciliopatía. En otras palabras, distintas patologías, que a nivel clínico son entidades diferentes, a nivel celular/molecular presentan un alto grado de similitud.

Tabla 2_Principales fenotipos observados en las ciliopatías.

PKD: poliquistosis renal; NPHP: Nefronoptisis; LCA: Amaurosis congénita de Leber; SLSN: Senior-Løken; EVC: Ellis van Creveld; OFD1: oral-facial-digital tipo 1; JS: Joubert; MKS: Meckel-Gruber; JATD: displasia torácica asfixiante de Jeune; ALMS: Alström; BBS: Bardet-Biedl; SNC: Sistema nervioso central.

Adaptado de: Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009.

	PKD	NPHP	LCA	SLSN	EVC	OFD	JS	MKS	JATD	ALMS	BBS
Malformaciones del SNC					●	●	●	●	●	●	●
Quistes renales	●	●		●		●	●	●	●	●	●
Diabetes										●	●
Malformación de las gónadas											●
Problemas cardíacos										●	●
Disfunción hepática	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●
Retardo mental			●		●	●	●	●	●		●
Obesidad										●	●
Polidactilia					●	●	●	●	●		●
Disfunción pulmonar										●	
Degeneración de la retina			●	●			●	●	●	●	●
<i>Situs Inversus</i>		●		●			●	●	●		●
Malformaciones del esqueleto					●	●			●		

Síndrome de Bardet-Biedl: un modelo de ciliopatía

Este síndrome fue descrito por primera vez por Georges Bardet y Arthur Biedl, quienes de manera independiente describieron casos de pacientes que presentaban obesidad, discapacidad visual, retardo mental, polidactilia e hipogonadismo (Bardet, 1920; Biedl, 1922). La presencia de quistes renales es una característica que se determinó posteriormente y que actualmente también es considerada como uno de los rasgos principales de este síndrome. Sumado a estas manifestaciones, los pacientes pueden presentar un número de fenotipos secundarios que incluyen ataxia, déficit en el habla, pérdida de audición, anosmia, anomalías dentales, defectos del corazón, diabetes, braquidactilia/sindactilia, alteración de la termosensación y nocicepción, entre otras (Baker & Beales, 2009; **Figura 12**). Es importante remarcar que la frecuencia y severidad con que se manifiestan los distintos aspectos del síndrome varían significativamente tanto entre familias como entre individuos de una misma familia. Es por esto que Beales y colaboradores han sugerido que la presencia de cuatro de las características principales o de tres de las características principales más dos características secundarias es un buen criterio para su diagnóstico clínico (Beales, 1999). En cuanto a su prevalencia, se estima que es de 1 cada 140.000-160.000 nacimientos en América del Norte y Europa, mientras que en la población Beduina de Kuwait asciende a 1 cada 13.500 nacimientos (Slavotinek & Beales, 2011). La principal causa de muerte prematura en estos pacientes es debido a la poliquistosis renal, combinado con complicaciones derivadas de la obesidad, diabetes tipo II, hipertensión e hipercolesterolemia (Beales, 1999).

BBS es un síndrome genéticamente heterogéneo para el cual, al día de hoy, se han identificado 17 genes causales (BBS1 a BBS12, MKS1, CEP290, FRITZ/C2ORF86, SDCCAG8 y LZTFL1 (Leitch, 2008; Kim, 2005; Otto, 2003; Marion, 2012; **Tabla 3**). Por lo general es heredado como una enfermedad autosómica recesiva pero en algunas familias el síndrome se comporta como un rasgo oligogénico dado que mutaciones en más de un gen pueden modular tanto la penetrancia como la expresividad del síndrome (Abu-Safieh, 2012; Katsanis, 2001; Beales, 2003; Badano, 2003; Badano, 2006). A su vez, mutaciones en modificadores secundarios pueden modular la expresividad de las distintas manifestaciones clínicas de BBS aumentando así la complejidad genética que caracteriza a este síndrome (Davis & Katsanis, 2012).

Figura 12_Manifestaciones clínicas de BBS.

A) Fundoscopia mostrando retinitis pigmentosa con cataratas. B) Polidactilia postaxial de pie izquierdo. C) Características faciales de un niño con BBS (ojos profundos, hipertelorismo ocular, inclinación hacia debajo de las sisuras palpebrales, puente nasal chato, boca pequeña, mandíbula pequeña, entre otras).

Adaptado de: Tobin & Beales, 2009.

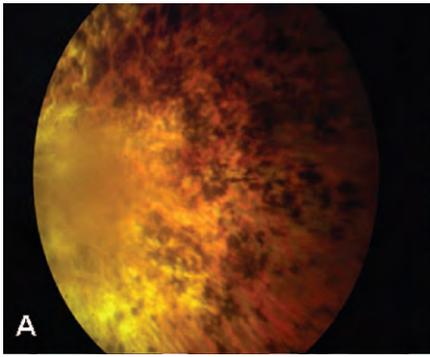


Tabla 3_Genes/proteínas causantes de BBS y los modificadores secundarios.

Se detallan los nombres de los genes y proteínas causantes de BBS. Se indica la localización y función que ha sido reportada para cada uno de esos genes/proteínas, así como las otras ciliopatías en las cuales han sido asociados. En amarillo se indican los modificadores secundarios de BBS. Adaptado de: Cardenas-Rodriguez & Badano, 2009.

Gen	Proteína	Localización/Función	Ciliopatía
<i>BBS1</i>	BBS1	Cilia/Cuerpo basal; IFT y transporte intracelular.	BBS
<i>BBS2</i>	BBS2	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS, MKS
<i>BBS3</i>	BBS3	GTPasa pequeña de la superfamilia Ras; Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>BBS4</i>	BBS4	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS, MKS, LCA
<i>BBS5</i>	BBS5	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>BBS6/MKKS</i>	BBS6	Chaperoninas tipo II; Cuerpo basal; ensamblaje BBSoma.	BBS, MKS
<i>BBS7</i>	BBS7	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>BBS8</i>	BBS8	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>BBS9</i>	BBS9	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>BBS10</i>	BBS10	Chaperoninas tipo II; Cuerpo basal; ensamblaje BBSoma.	BBS, MKS
<i>BBS11</i>	BBS11	Similar a E3 ubiquitin ligasa; posible rol en degradación vía proteasoma.	BBS
<i>BBS12</i>	BBS12	Chaperoninas tipo II; Cuerpo basal; ensamblaje BBSoma.	BBS
<i>MKS1</i>	MKS1	Centrosoma/Cuerpo basal; ciliogénesis, IFT.	MKS, BBS
<i>CEP290/NPHP6</i>	CEP290	Centrosoma; reclutamiento BBSoma.	NPHP, LCA, SLS, JS, BBS, MKS
<i>SDCCAG8</i>	<i>SDCCAG8</i>	Centrosoma; ciliogénesis.	NPHP, SLS, BBS
<i>FRITZ/C2ORF86</i>	FRITZ	Cilia/Cuerpo basal; ciliogénesis.	BBS
<i>LZTFL1</i>	LZTFL1	Cilia/Cuerpo basal; IFT.	BBS
<i>CCDC28B/MGC1203</i>	<i>CCDC28B</i>	Centrosoma/cuerpo basal; función desconocida.	Modificador en BBS
<i>RPGRIP1L/NPHP8</i>	RPGRIP1L	Cuerpo basal; posible rol en vía Shh.	NPHP, MKS, JS. Modificador en BBS, LCA, SLS
<i>TMEM67</i>	Meckelin	Cilia.	MKS, JS. Modificador en BBS
<i>TMEM216</i>	TMEM216	Cilia/Cuerpo basal; ciliogénesis.	MKS, JS. Modificador en BBS.
<i>TMEM237</i>	TMEM237	Zona de transición; ciliogénesis.	JS. Modificador en BBS.
<i>KIF7</i>	KIF7	Cilia; IFT.	JS. Modificador en BBS, MKS, OFD.
<i>CEP41</i>	CEP41	Cilia/Cuerpo basal; ciliogénesis.	JS. Modificador en BBS.
<i>TTC21B</i>	TTC21B	Cilia; IFT.	NPHP. Modificador en BBS, SLS, MKS.

Función de las proteínas BBS

En lo que respecta a la función de las proteínas codificadas por estos genes, estudios *in vitro* y en modelos animales han demostrado que cumplen roles tanto estructurales como funcionales a nivel de las cilias. La gran mayoría de las proteínas BBS estudiadas hasta el momento se localizan principalmente en el cuerpo basal, el centrosoma o el axonema ciliar (ver **Tabla 3**).

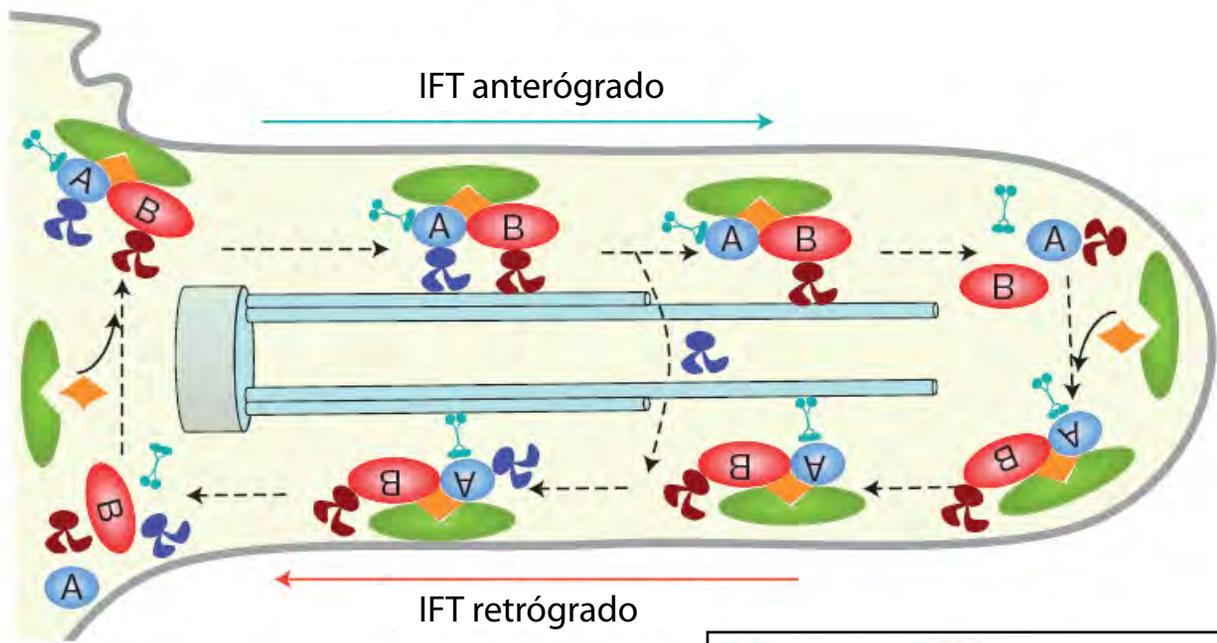
La primera asociación entre BBS y cilia surgió estudiando a la proteína BBS8 (Ansley, 2003). En ese trabajo demostraron por primera vez que BBS8 se localiza en el centrosoma y cuerpo basal e interactúa con una proteína estructural del centrosoma, llamada PCM1 (del inglés *pericentriolar material 1*). Posteriormente surgieron una serie de trabajos que demostraron que BBS4 y BBS7 también presentan ese patrón de distribución, así como se demostró que BBS7 y BBS8 están implicadas en el transporte intraflagelar, acoplando los complejos IFTA e IFTB entre sí (Kim, 2004; Blacque, 2004; Ou, 2005). A partir de estudios utilizando modelos animales se pudo determinar que las proteínas BBS regulan la vía no canónica de Wnt por medio de la regulación de la degradación vía proteasoma de β -catenina (Ross, 2005; Gerdes, 2007). Una contribución muy importante sobre la función de las proteínas BBS fue el trabajo de Nachury y colaboradores (Nachury, 2007). En este trabajo se demostró que las proteínas BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 y BBS9 forman un complejo multiproteico, al cual denominaron BBSoma, que está implicado en el transporte intraflagelar. En ese sentido, demostraron que el BBSoma regula el transporte de proteínas de membrana hacia las cilias a través de su asociación con las GTPasas Rabin8 y Rab8. La demostración de la existencia de este complejo macromolecular permitió confirmar las sospechas de redundancia según los resultados genéticos, así como entender porque los estudios de muchas de las proteínas BBS mostraban resultados tan similares y no se observaban asociaciones o funciones particulares diferentes. Muy recientemente, se caracterizó en *C. elegans* el mecanismo por el cual el BBSoma ensambla el complejo formado por las partículas IFTA, IFTB con las proteínas motoras quinesina 2, Kif17 y la dineína citoplasmática 2 en la base de las cilias (Wei, 2012). Interesantemente, también demostraron que el BBSoma es esencial para el desensamblaje y reagrupación de estos

complejos en la punta de las cilias, permitiendo el comienzo del transporte retrógrado hacia la base de la cilia (**Figura 13**).

Como se indicó previamente, no todas las proteínas BBS forman parte del BBSoma y en los últimos años importante información se ha obtenido sobre las funciones de las otras proteínas BBS. Tal es el caso de BBS3 o también llamada Arl6 (del inglés *ADP-ribosylation factor like 6*) quien se identificó como una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras (Fan, 2004; Chiang, 2004). Se demostró que esta proteína se localiza en las cilias y cuerpo basal donde se asocia con el BBSoma y su rol principal es mediar su translocación hacia el interior de las cilias (Jin, 2010). Por otro lado, se demostró que BBS6, BBS10 y BBS12 pertenecen a la clase de chaperoninas tipo II (Kim, 2004; Stoetzel, 2006; Stoetzel, 2007) y que junto con otra familia de chaperoninas forman un complejo que se asocia con el BBSoma y media su ensamblaje (Seo, 2010; Zhang, 2012). En el caso de BBS11 (o también llamada TRIM32), se caracterizó que es una E3 ubiquitin ligasa (Chiang, 2006), lo cual podría explicar las alteraciones de la actividad del proteasoma que se ha reportado en modelos de BBS (Gerdes, 2007).

Figura 13_ Modelo del rol del BBSoma en el transporte intraflagelar en la base y en la punta de las cilias.

En la base de las cilias el BBSoma ensambla el complejo formado por las partículas IFTA e IFTB con las proteínas motoras quinesina 2, Kif17 y la dineína citoplasmática 2. En las puntas de las cilias el BBSoma es esencial para el desensamblaje y reagrupación de estos complejos, lo que permite el transporte retrógrado hacia la base de la cilia. Adaptado de: Wei, 2012.



 IFT-A	 IFT-B	
 Quinesina 2	 KIF17	 Dineína
 DYF-2	 BBSoma	

Los otros genes causantes de BBS fueron originariamente identificados estudiando otros síndromes y posteriormente se determinó que también eran causantes por sí solos de BBS. Por ejemplo, el gen MKS1 fue primero identificado como causante del síndrome Meckel-Gruber, una ciliopatía de mayor severidad y letal a nivel embrionario (Kyttala, 2006). Se demostró que se localiza en el centrosoma y cuerpo basal, que es necesaria para el proceso de ciliogénesis y que interactúa con proteínas de la maquinaria de IFT (Dawe, 2007; Zhao & Malicki, 2011). El gen CEP290 (también llamado NPHP6) fue mapeado como causante de cinco ciliopatías diferentes (Coppieters, 2010). Se ha determinado que es una proteína que se localiza en el centrosoma (Kim, 2008) y recientemente se demostró que media el reclutamiento del BBSoma a las cilias a través de su interacción con BBS4 (Stowe, 2012). En el caso de SDCCAG8, mutaciones en este gen han sido asociadas con otras dos ciliopatías diferentes y se ha demostrado que se localiza en el centrosoma (Otto, 2010; Kamio, 2010), así como recientemente se demostró que su localización en la cilia conectora de los fotorreceptores es mediada por la interacción con otras proteínas también implicadas en ciliogénesis como ser RGRIP1L (Patil, 2012). A diferencia de los genes anteriores, mutaciones en los genes FRITZ/C2ORF86 y LZTFL1 solo se han asociado con BBS. En el caso de FRITZ/C2ORF86, se caracterizó recientemente que se localiza en el axonema ciliar y en el cuerpo basal y que junto con las proteínas septinas (implicadas en la remodelación del citoesqueleto), participa en los procesos de ciliogénesis y de convergencia y extensión de la gastrulación (Kim, 2010). El último gen en ser asociado como causante de BBS es LZTFL1 (del inglés *Leucine-zipper transcription factor-like 1*; Marion, 2012), cuya proteína había sido previamente caracterizada en la regulación del transporte intraflagelar del BBSoma y de componentes de la vía de Shh (Seo, 2011).

Como se puede apreciar, el gran avance que se ha hecho en los últimos años en la caracterización de las proteínas BBS y en sus funciones es extremadamente importante para entender el por qué de las manifestaciones clínicas de este síndrome. A partir de toda la información con la que actualmente se cuenta, se puede suponer que la base celular/molecular de estas manifestaciones son principalmente fallas en el mantenimiento de la estructura ciliar, principalmente por alteraciones del proceso de transporte intraflagelar. Teniendo esta asociación es más fácil comenzar a entender la

base celular de los distintos fenotipos que caracterizan el síndrome. Por ejemplo se puede visualizar a los procesos de degeneración de la retina como consecuencia de fallas en el IFT y mantenimiento de los fotorreceptores de manera funcional; a la presencia de polidactilia como consecuencia de alteraciones de la vía de Shh mediada por las cilias en los primordios germinales de los miembros; al retardo mental como consecuencia de alteraciones en la proliferación neuronal mediada por la vía Shh/cilia y a la migración de células progenitoras neuronales mediada por la vía Wnt/cilia; al desarrollo de quistes renales y la consecuente disfunción renal como resultado de la alteración de la vía PCP mediada por las cilias; y a la obesidad como consecuencia de alteraciones en el procesamiento de las señales de regulación de las reservas energéticas también mediadas por IFT/cilia (Davis & Katsanis, 2012). Sin embargo aún existen fenotipos que son difíciles de explicar o que no pueden ser explicados completamente por alteraciones del IFT. Es por esto, que es de suma importancia continuar con la caracterización de las funciones de estas proteínas y determinar también posibles roles no asociados directamente con las cilias. En este sentido, ya han surgido algunos trabajos donde demuestran que las proteínas inversina, policistina 1, Nek1, OFD1 y BBS7 también se localizan dentro del núcleo y están implicadas en la regulación transcripcional (Nurnberger, 2002; Yoder, 2002; Hilton, 2009; Giorgio, 2007; Gascue, 2012). La caracterización en mayor detalle de estas funciones extraciliares permitirá en un futuro colaborar en el entendimiento de los fenotipos que se observan en estos síndromes y que aún siguen siendo difíciles de explicar.

Genes modificadores

Un aspecto que suma complejidad a la caracterización de las funciones y fenotipos causados por mutaciones en los genes asociados con las ciliopatías, es la presencia de genes modificadores. Esto se refiere a mutaciones en genes que por sí solos no son capaces de generar la enfermedad pero en presencia de mutaciones en los genes causales determinan un desarrollo más severo de la enfermedad. En el caso de BBS se han caracterizado ocho genes modificadores, los cuales son todos genes causales de otras ciliopatías con la excepción de *CCDC28B* (ver **Tabla 3**).

CCDC28B

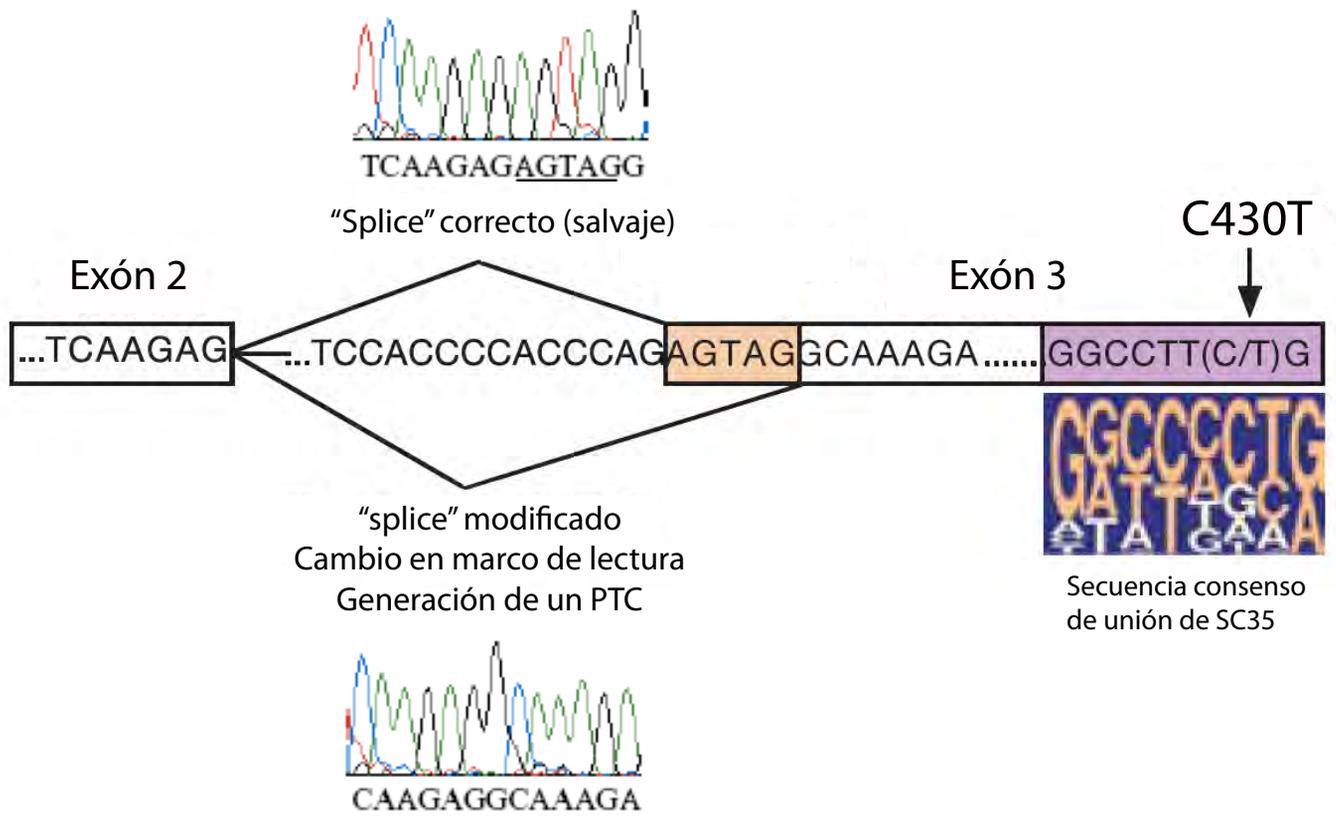
El primero de estos genes en ser identificado fue *CCDC28B* (del inglés *coiled coil domain containing 28B*) o también llamado *MGC1203* (Badano, 2006). En el momento que se caracterizó este gen era difícil explicar el grado de variabilidad clínica que se observaba en los pacientes BBS simplemente por interacciones entre los genes BBS conocidos. Fue por esto que se planteó la idea de que existían genes que codificaban para proteínas involucradas en los complejos o vías afectadas en BBS que podrían contribuir con alelos que afectaban tanto la penetrancia como la expresividad del fenotipo (genes modificadores). Fue así como a partir de combinar información bioquímica con información predictiva o computacional se identificó a *CCDC28B*. A partir de un ensayo doble híbrido en levadura, utilizando a *BBS4* como “carnada” se hallaron 60 posibles interactores, los cuales fueron posteriormente filtrados con la base del proteoma ciliar, que había sido generada recientemente (Li, 2004). De los 60 candidatos, la única secuencia que se encontraba en esa base era la de *CCDC28B*, una proteína de función desconocida. Posteriormente confirmaron que esta proteína interactuaba con proteínas BBS en células de mamífero y por medio de inmunocitoquímica se determinó que se localizaba en el centrosoma y cuerpo basal. En ese trabajo también buscaron en la base genética de pacientes BBS posibles mutaciones en este gen, y así fue como detectaron la presencia de una transversión C → T en la penúltima posición del exón 3 (C430T). Determinaron que este cambio de base genera un efecto a nivel del ARN porque potencia el uso de un sitio crítico aceptor de *splice*, lo que determina en el ARN mensajero la delección de 5 pares de bases y el consecuente cambio en el marco abierto de lectura con la generación de un codón de terminación prematuro (**Figura 14**). De este modo, caracterizaron que la mutación C430T es una mutación hipomórfica, lo que significa que determina una disminución de los niveles de la proteína codificada por este gen. También determinaron que esa mutación no es capaz de causar BBS por sí sola, ya que no detectaron pacientes con esta mutación en homocigosis, sumado a la detección de un individuo con esta mutación en homocigosis que no padecía BBS. Sin embargo, observaron que los pacientes BBS que también portaban la mutación C430T en *CCDC28B*, desarrollaban una enfermedad más severa. Es por esto que a partir del conjunto de estos

hallazgos plantearon que *CCDC28B* actúa como un gen modificador de BBS (Badano, 2006).

A pesar de ese primer reporte que mostraba la función moduladora de *CCDC28B* en el fenotipo BBS, otros trabajos posteriores no detectaron la mutación C430T en pacientes BBS, poniendo en duda su posible rol como modificador secundario (Azari, 2006; Bin, 2009; Abu-Safieh, 2012; Redin, 2012). Es por esto, que al momento de comenzar esta tesis, *CCDC28B* era una proteína de la cual se conocía muy poco, por lo que nos propusimos caracterizar su rol biológico y particularmente entender su relación con la biología de las cilias.

Figura 14_Defectos en la variante “splice” del modificador secundario de BBS, CCDC28B.

La alteración del “splice” es como consecuencia de la mutación C430T, la cual genera una secuencia de unión para la proteína reguladora del “splice” SC35 (indicada en violeta). La unión de esta proteína favorece el uso de un sitio aceptor crítico y la consecuente delección de 5 pares de bases (indicado en naranja) y la aparición de un codón de terminación prematuro (PTC). Adaptado de: Badano, 2006.



Objetivo General

Caracterizar el rol biológico de CCDC28B en la biología de las ciliás así como sus posibles funciones extraciliarias.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar el origen evolutivo y el grado de conservación de CCDC28B entre las distintas especies.
- 2) Determinar la relación entre CCDC28B y las ciliás primarias.
- 3) Identificar las proteínas con las que interactúa CCDC28B y caracterizar funcionalmente esa relación.
- 4) Determinar el patrón de localización de CCDC28B a nivel celular.
- 5) Desarrollar un modelo *in vivo* para el estudio funcional de CCDC28B y la caracterización de su interacción genética con otros genes de interés.

Resultados

Parte A_ Estudios bioinformáticos de CCDC28B

Para comenzar con la caracterización de CCDC28B lo primero que nos propusimos fue utilizar la información de su secuencia génica y proteica para evaluar su presencia y grado de conservación entre las distintas especies. Este tipo de análisis tiene el potencial de aportar información sobre el origen de la proteína y su relación con las especies, datos que pensamos podrían ser relevantes para apuntalar los estudios que diseñamos para identificar su rol biológico.

Estructura génica y transcriptos

Para realizar ese análisis, lo primero que determinamos fue la estructura genómica y expresión de transcriptos del gen CCDC28B en *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Danio rerio*, por medio de la interfase gráfica o buscador genómico *Ensembl* (Flicek, 2011). Se eligieron estas especies por los datos previos con los que ya contábamos en humanos (Badano, 2006) y porque el ratón y el pez cebra son modelos animales que utilizamos en el transcurso de esta tesis. Es importante mencionar que los datos que aporta *Ensembl* son predictivos y que es importante verificar si los transcriptos predichos son sintetizados realmente, así como si posteriormente son traducidos a proteína.

En el caso de CCDC28B en *H. sapiens* ya contábamos con información sobre su estructura y secuencia, ya que el marco abierto de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*) había sido clonado previamente (Badano, 2006). En humanos el gen se localiza en el cromosoma 1, en la posición 1p36.11-p34.2, y está compuesto por 6 exones, siendo el primer exón no codificante. Datos de secuenciación de ARN mensajeros (ARNm) han puesto en evidencia que posiblemente este gen presente splicing alternativo habiéndose detectado 5 posibles transcriptos, de los cuales solamente 2 codificarían para proteínas de 200 (NM_024296) y 241 (BC002462) aminoácidos (aa), a las cuales por su código de acceso en *Genbank* (NCBI) las denominamos isoformas NM y BC, respectivamente (**Figura 15A**). En la **Figura 15B** se presenta una alineación de las secuencias de estas dos isoformas, donde se puede observar que únicamente difieren en el extremo carboxilo terminal, lo que está dado por la retención del intrón 5 en la isoforma BC. La posibilidad de que existan dos variantes de la misma proteína nos llevó a estudiar si ambas isoformas

se expresan y si su expresión es regulada de manera diferencial. Esta parte del proyecto corresponde a una tesis de Maestría que se encuentra actualmente en desarrollo en el laboratorio, por lo que no se presentarán aquí esos resultados. Sin embargo, cabe mencionar que a nivel de ARNm pudimos detectar y clonar ambos transcritos, pero como se verá más adelante, no fuimos capaces de detectar por medio de un anticuerpo específico a la isoforma BC. A pesar de esto, es importante mencionar que en los experimentos donde se redujo la expresión de CCDC28B se trabajó con oligonucleótidos de ARN que pueden hibridarse y bloquear la expresión de los ARN mensajeros de ambas isoformas.

Figura 15_ Estructura y transcritos del gen *CCDC28B* en *Homo sapiens*.

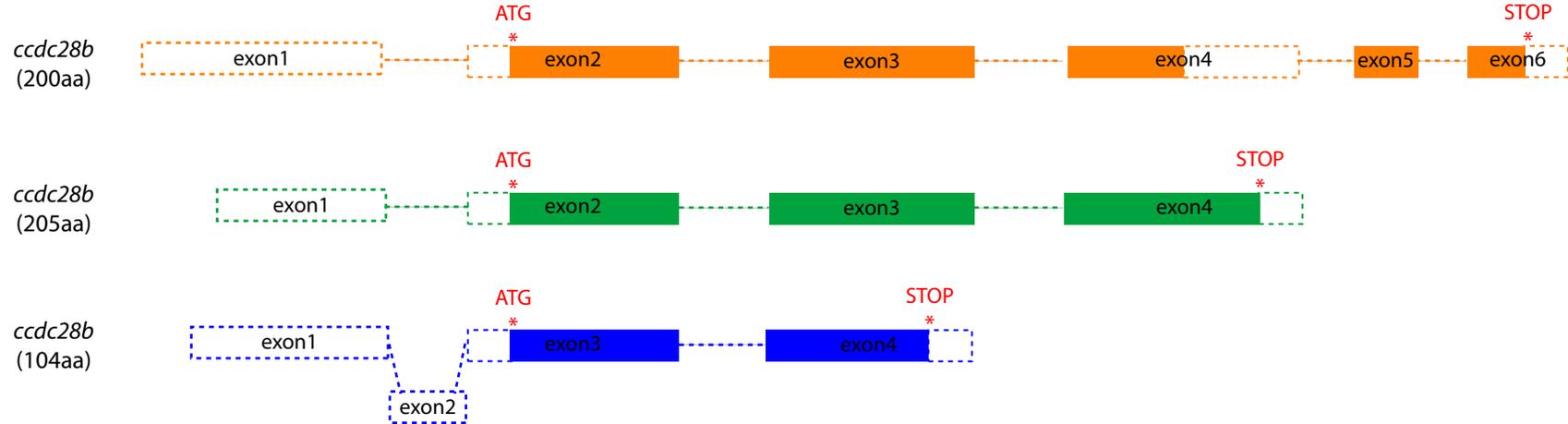
A) Transcritos predichos por medio del buscador genómico *Ensembl*. Se predicen 2 variantes proteicas de 200 (naranja) y 241 aa (verde). Los otros transcritos (no mostrados) son degradados por el mecanismo de “nonsense mediated decay” o no contienen un marco abierto de lectura (ORF). B) Alineación de las secuencias de las isoformas de 200 y 241 aa. Se indica el grado de conservación en cada posición y la secuencia consenso. Las dos isoformas difieren únicamente en el extremo carboxilo terminal (indicado en amarillo).

En el caso de *Mus musculus*, el gen *Ccdc28b* se localiza en el cromosoma 4, en la posición 4 D2.3 y contiene 6 exones, siendo el primer exón no codificante. Ensembl asocia 10 transcritos diferentes a este gen, de los cuales únicamente 3 codificarían para proteínas de 205, 200 y 104 aa (**Figura 16A**). Al igual que en humanos, las dos isoformas más largas difieren entre sí únicamente en el extremo carboxilo terminal (**Figura 16B**) y la isoforma de 104 aa corresponde solo a la primera mitad de las otras dos proteínas. La isoforma de 200 aa es la que presenta un 97% de similitud con la isoforma NM humana (**Figura 17**). Debido a que utilizamos el modelo de ratón en muy pocas oportunidades, no evaluamos particularmente a nivel de ARN ni de proteína si estas tres isoformas se transcriben y traducen. De cualquier manera es importante notar que en los experimentos donde trabajamos con células murinas, se bloqueó la expresión de *Ccdc28b* por medio de oligonucleótidos de ARN que son capaces de hibridar con los ARN mensajeros de las tres isoformas.

Figura 16_ Estructura y transcritos del gen *ccdc28b* en *Mus musculus*.

A) Transcritos predichos por medio del buscador genómico *Ensembl*. Se predicen 3 variantes proteicas de 200 (naranja), 205 (verde) y 104 aa (azul). Los otros transcritos (no mostrados) son degradados por el mecanismo de “nonsense mediated decay” o no contienen un marco abierto de lectura (sin ORF). B) Alineación de las secuencias de las isoformas de 200 y 205 aa. Se indica el grado de conservación en cada posición y la secuencia consenso. Las dos isoformas difieren únicamente en el extremo carboxilo terminal (indicado en amarillo).

A



B

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ccdc28b_200aa	MEDK	KKKRS	PKPCLTQPAQAPGTLRRVPVPTSHSGSLALGLPHLPSPKQRAKFKRAGKEKCRPVL	AGGGGS	AGTPLQHSFLTEVTDVYEMEGGLLNLLNDFH					
Ccdc28b_205aa	MEDK	KKKRS	PKPCLTQPAQAPGTLRRVPVPTSHSGSLALGLPHLPSPKQRAKFKRAGKEKCRPVL	AGGGGS	AGTPLQHSFLTEVTDVYEMEGGLLNLLNDFH					
Conservación	*****									
Consenso	MEDK K K K R S P K P C L T 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 A G K E K C R P V L A G G G G S A G T P L Q H S F L T E V T D V Y E M E G G L L N L L N D F H									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Ccdc28b_200aa	SGRLQAFGKECSFEQLEHVREMQEKLARLHFSLDVCGEEDDEEEEDGVTEGLPEEQKKT	MADRNL	DQLLS	NLEDLSNSIQKLHLAENAEPEDQPAA	-----					
Ccdc28b_205aa	SGRLQAFGKECSFEQLEHVREMQEKLARLHFSLDVCGEEDDEEEEDGVTEGLPEEQKKT	MADRNL	DQLLS	NVGHRA GCCSWDTKGGEGTGSQVSHGKLG	T					
Conservación	*****945587786575654744847*784-----									
Consenso	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 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 ----- Q -----									

Figura 17_ Comparación de las secuencias proteicas entre *H. sapiens* y *M. musculus*.

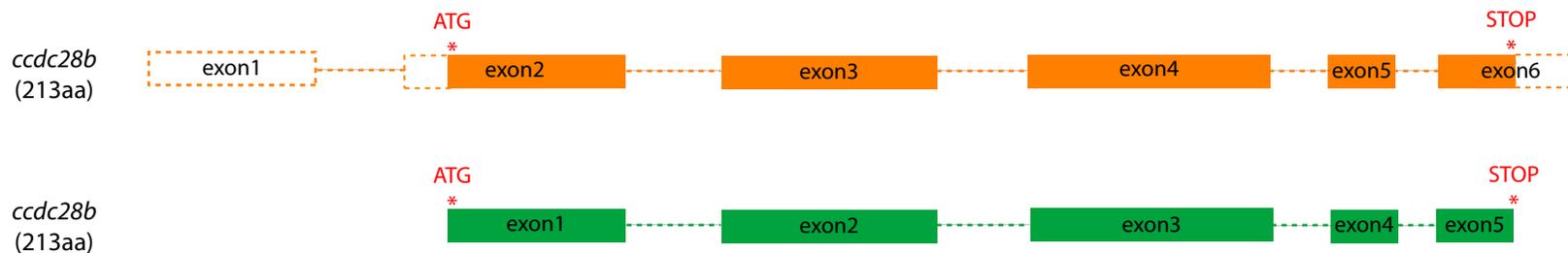
A) Alineación y comparación del grado de conservación entre la isoforma de 200 aa humana y la de 200 aa de ratón. Nótese que solo difieren en 7 posiciones (97% homología, indicadas en amarillo).

El gen en *Danio rerio* está ubicado en el cromosoma 13 y contiene 6 exones de los cuales el primero no es codificante. Ensembl asocia dos transcritos a este gen aunque ambos codificarían para una proteína de 213 aa (**Figura 18A y B**). La diferencia entre estos dos transcritos se debe únicamente a la ausencia en uno de ellos de las secuencias no traducidas, tanto el 5' como el 3' UTR, por lo que podemos considerar que en *Danio rerio* no habría evidencias de que *ccdc28b* esté sujeto a splicing alternativo que afecte la secuencia proteica (**Figura 18A**). Debido a la duplicación del genoma que ha ocurrido en los peces teleosteos, fue importante determinar si *ccdc28b* está duplicado en el genoma del pez cebra. Utilizando más de una base de datos (Genbank y ZFIN_Zv9) encontramos únicamente una sola copia de este gen. Como se verá más adelante éste es un aspecto muy importante a considerar cuando se busca bloquear la expresión de un gen en el pez cebra utilizando la técnica de microinyección de morfolidos (ver sección Materiales y Métodos).

Figura 18_ Estructura y transcritos del gen *ccdc28b* en *Danio rerio*.

A) Transcritos predichos por medio del buscador genómico *Ensembl* (Zv9). Se predicen 2 transcritos que difieren únicamente en la presencia de un exón no codificante en el extremo 5'. B) Alineación de las secuencias codificadas por esos 2 transcritos donde se observa que ambos codificarían para una misma proteína de 213 aa.

A



B

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
<i>Ccdc28b_213aa</i>	MEDKRRKRS	PKVSLPQPPPP	INPRKLT	TVLPASKSAT	FSLGLPQPPS	PKPRGKYKRS	VGAMGPSKEAL	AVPVVPPKNT	RPHREKPRAPQP	PAGPSRVSS	SSPLQHTF	
<i>Ccdc28b_213aa</i>	MEDKRRKRS	PKVSLPQPPPP	INPRKLT	TVLPASKSAT	FSLGLPQPPS	PKPRGKYKRS	VGAMGPSKEAL	AVPVVPPKNT	RPHREKPRAPQP	PAGPSRVSS	SSPLQHTF	
Conservación	*****											
Consenso	MEDKRRKRS PKVSLPQPPPP INPRKLT TVLPASKSAT FSLGLPQPPS PKPRGKYKRS VGAMGPSKEAL AVPVVPPKNT RPHREKPRAPQP PAGPSRVSS SSPLQHTF											
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	
<i>Ccdc28b_213aa</i>	LT DVSDVREMEG	GLLNLLNDFH	HSGKLQAFG	KVCSFEQLE	HVREMQLARL	HFSLD	SHVEELSE	DQRKNASDRN	LEHLLSNLEEL	STSIQKLHL	AENQDLPKTS	NT
<i>Ccdc28b_213aa</i>	LT DVSDVREMEG	GLLNLLNDFH	HSGKLQAFG	KVCSFEQLE	HVREMQLARL	HFSLD	SHVEELSE	DQRKNASDRN	LEHLLSNLEEL	STSIQKLHL	AENQDLPKTS	NT
Conservación	*****											
Consenso	LTDVSDVREMEGGLLNLLNDFHSGKLQAFGKVCSFEQLEHVREMQLARLHFSLD SHVEELSE DQRKNASDRNLEHLLSNLEELSTSIQKLHLAENQDLPKTSNT											

Conservación entre especies

Como segunda etapa nos propusimos determinar en qué especies está presente CCDC28B y cuál es su grado de conservación entre las distintas especies. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con Hector Romero de la Facultad de Ciencias y con Martín Graña de la Unidad de Bionformática del Instituto Pasteur de Montevideo. Para la búsqueda de secuencias homólogas en las distintas especies se utilizó la secuencia NP_077272 de CCDC28B humana, la cual corresponde a la isoforma de 200 aa mencionada previamente. Se realizaron intensas búsquedas en diversas bases de datos que se detallan en Materiales y Métodos. A partir de esa búsqueda se encontraron secuencias homólogas en 65 especies representantes de diversos grupos, aunque un punto a destacar es que todos esos grupos pertenecen a los Eucariotas/Metazoos (**Tabla 4**). No se encontraron secuencias homólogas en Procariotas (Bacteria y Arquea), ni en Plantas o Fungi. Posteriormente utilizando las secuencias homólogas encontradas, elaboramos un árbol filogenético, el cual recapituló las agrupaciones taxonómicas y evolutivas (**Figura 19**). Un dato interesante fue que no se encontraron secuencias homólogas de CCDC28B en los nemátodos (9 especies analizadas, incluida *C. elegans*) ni en los platelmintos (2 especies analizadas). La ausencia de secuencias homólogas en nemátodos parece ser una pérdida específica dado que CCDC28B sí está presente en los Artrópodos, los cuales pertenecen al mismo clado (Ecdysozoa).

Tabla 4_ Grupos taxonómicos donde se encontraron secuencias homólogas de CCDC28B.

Se indica el nombre de las 65 especies, su nombre “común” y su clasificación taxonómica.

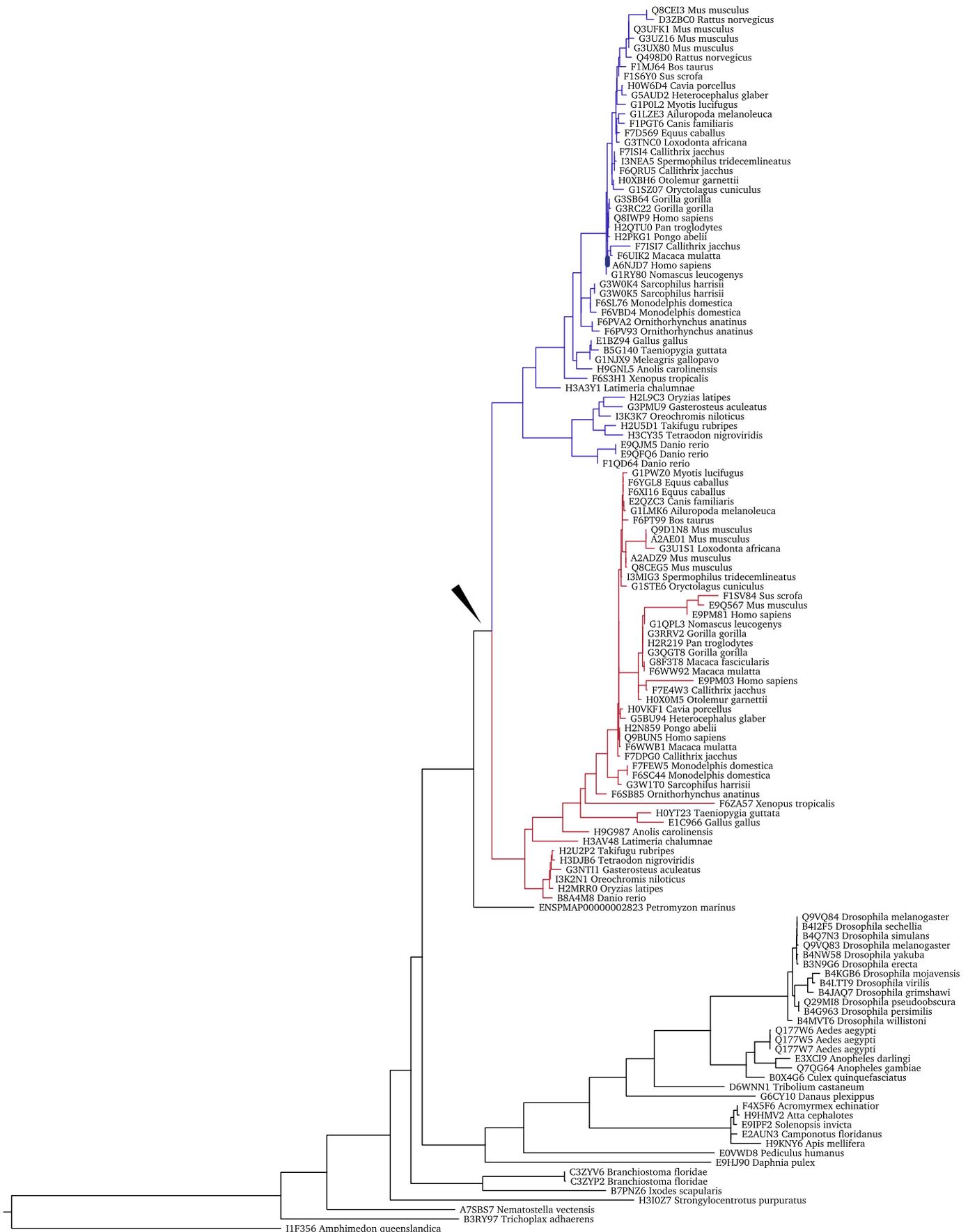
Nombre de la especie	Nombre común	Clasificación
<i>Daphnia pulex</i>	Pulga de agua	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Crustacea
<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata de los ciervos	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Chelicerata
<i>Tribolium castaneum</i>	Escarabajo rojo de la harina	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Danaus plexippus</i>	Mariposa monarca	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Pediculus humanus</i>	Piojo del cuerpo	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Apis mellifera</i>	Abeja	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Solenopsis invicta</i>	Hormiga roja de fuego	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Atta cephalotes</i>	Hormiga podadora	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Camponotus floridanus</i>	Hormiga carpintera	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Acromyrmex echinator</i>	Hormiga podadora	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Anopheles gambiae</i>	Mosquito de la malaria	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito del dengue	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Anopheles darlingi</i>	Mosquito de la malaria	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Mosquito del sur	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila willistoni</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila yakuba</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila virilis</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila simulans</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila sechellia</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila persimilis</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila mojavensis</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila grimshawi</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila erecta</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Mosca de la fruta	Eukaryota › Metazoa › Ecdysozoa › Arthropoda › Hexapoda › Insecta
<i>Trichoplax adhaerens</i>	Placozoa	Eukaryota › Metazoa › Placozoa
<i>Amphimedon queenslandica</i>	Esponja	Eukaryota › Metazoa › Porifera
<i>Nematostella vectensis</i>	Anémona de mar	Eukaryota › Metazoa › Cnidaria
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Erizo de mar violeta	Eukaryota › Metazoa › Echinodermata
<i>Branchiostoma floridae</i>	Anfioxus	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Cephalochordata › Branchiostomidae › Branchiostoma
<i>Petromyzon marinus</i>	Lamprea	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Hyperoartia

Nombre de la especie	Nombre común	Clasificación
Tetraodon nigroviridis	Pez globo moteado	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Oryzias latipes	Pez Medaka	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Danio rerio	Pez cebra	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Gasterosteus aculeatus	Pez espinoso	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Takifugu rubripes	Pez Fugu	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Oreochromis niloticus	Tilapia del Nilo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Actinopterygii
Latimeria chalumnae	Celacanto de Comores	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Coelacanthiformes
Xenopus tropicalis	Rana Xenopus	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Amphibia
Taeniopygia guttata	Pinzón cebra	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Archosauria
Gallus gallus	Gallina	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Archosauria
Meleagris gallopavo	Pavo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Archosauria
Anolis carolinensis	Lagarto Anoles	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Lepidosauria
Ornithorhynchus anatinus	Ornitorrinco	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Monotremata
Monodelphis domestica	Zaligüeya colicorte	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Metatheria
Sarcophilus harrisii	Demonio de Tasmania	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Metatheria
Mus musculus	Ratón	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Rattus norvegicus	Rata	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Heterocephalus glaber	Rata topo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Cavia porcellus	Cobayo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Spermophilus tridecemlineatus	Ardilla de trece franjas	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Oryctolagus cuniculus	Conejo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Bos taurus	Vaca/Toro	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Sus scrofa	Chancho	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Equus caballus	Caballo	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Myotis lucifugus	Murcielago	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Ailuropoda melanoleuca	Oso panda	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Canis familiaris	Perro	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Loxodonta africana	Elefante africano	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Otolemur garnettii	Mono Gálago de Garnet	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Callithrix jacchus	Mono tití de orejas blancas	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Macaca fascicularis	Macaco cangrejero	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Macaca mulatta	Mono Rhesus	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria

Nombre de la especie	Nombre común	Clasificación
Nomascus leucogenys	Gibón de mejillas blancas	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Pongo abelii	Orangutan	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Gorilla gorilla	Gorila	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Pan troglodytes	Chimpance	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria
Homo sapiens	Humano	Eukaryota › Metazoa › Chordata › Craniata › Vertebrata › Euteleostomi › Mammalia › Eutheria

Figura 19_ Análisis filogenético de CCDC28B.

Árbol de máxima verosimilitud de las secuencias proteicas homólogas a CCDC28 presentes en la base de datos UniProt. El árbol fue calculado utilizando el programa PhyML. Se indican los nombres de las especies y los códigos de acceso en UniProt. La escala inferior indica el promedio de sustituciones por sitio. Con azul se indica la agrupación de secuencias correspondientes a CCDC28A y en rojo a CCDC28B. La cabeza de flecha indica el fenómeno de duplicación del gen CCDC28 en los vertebrados.



Un dato importante que surgió cuando se elaboró el árbol filogenético, y que se indica con una flecha en la **Figura 19**, es la aparente duplicación génica de CCDC28 en los vertebrados. En todas las especies de invertebrados analizadas, siempre se encontró una única secuencia homóloga, mientras que en los vertebrados posteriores a la lamprea (*Petromyzon marinus*), se encontraron dos agrupaciones de secuencias homólogas. Este análisis indica que ocurrió una duplicación del gen en algún momento en la divergencia entre las lampreas y los teleostomos (peces óseos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), ya que las lampreas aún presentan una única proteína CCDC28, mientras que los teleostomos presentan dos secuencias parálogas: CCDC28A y CCDC28B. El gen CCDC28A codifica para una proteína de 274 aa (NP_056254), cuya función está muy poco caracterizada. Se ha demostrado que CCDC28A está asociada con el desarrollo hematopoyético y con la patogénesis de varios tipos de leucemias, como consecuencia de rearrreglos cromosómicos que determinan la formación de una proteína de fusión con la nucleoporina NUP98 (Petit, 2012). En ese trabajo también demostraron que este gen codifica para dos isoformas, una isoforma larga, cuyos primeros 90 aa están muy poco conservados y una isoforma corta, compuesta por los restantes 184 aa y muy conservada en los vertebrados. Para analizar el grado de conservación entre CCDC28A y CCDC28B, realizamos un alineamiento de las secuencias proteicas utilizando la isoforma corta de CCDC28A. En la **Figura 20** se presentan los resultados considerando solo algunas especies y en la **Figura 21** se presenta el alineamiento completo de todas las secuencias encontradas de CCDC28A y CCDC28B. A partir de estos análisis filogenéticos pudimos determinar que CCDC28A y CCDC28B presentan aproximadamente un 50% de homología de secuencia entre sí, que ambos genes están evolucionando a velocidades similares y que su estructura exón-intrón está conservada, presentando 6 exones en los Teleostomos y 4 en los Artrópodos (indicados con barras rojas en la **Figura 20**).

Figura 20_ Conservación de CCDC28B en distintas especies.

Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de CCDC28B y CCDC28A humanas alineadas con las secuencias ortólogas respectivas de *Mus musculus* y *Danio rerio*, y con las secuencias de CCDC28 de *Petromyzon marinus*, *Drosophila melanogaster*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Nemastotella vectensis*, *Trichoplax adhaerens* y *Amphimedon queenslandica*. Con diferente intensidad de colores se indica el porcentaje de identidad en cada posición. La alineación se realizó utilizando el programa Jalview (Waterhouse, 2009). Con recuadros de colores se indica la localización aproximada de los diferentes dominios y los motivos proteicos predichos. Se predice que CCDC28B contiene un NLS (N-terminal; recuadro amarillo) y dos motivos NES (parte media y C-terminal, recuadro verde), un motivo IQ de unión a calmodulina (recuadro color naranja) y un motivo de unión a MAPK (recuadro marrón). Las líneas rojas verticales indican la posición de los límites de cada exón y se indica el número total de exones en cada especie.

10 20 30 40 50 60 70 80

Homo sapiens CCDC28A MPRAEPRATLGEQEKAGLPLGAWRLYLLRHFRKQTELRRSGSRDVTGALLVAAAVASEAVGSLRVAEGGPNTLLLQVLRSPWCNKE
Mus musculus CCDC28A -----
Danio rerio CCDC28A -----
Homo sapiens CCDC28B -----
Mus musculus CCDC28B -----
Danio rerio CCDC28B -----
Petromyzon marinus CCDC28 -----
Drosophila melanogaster CCDC28 ----- ME PNDE VVERQKL
Strongylocentrotus purpuratus CCDC28 ----- MASNRISQIHGSPKT
Nemastotella vectensis CCDC28 -----
Trichoplax adhaerens CCDC28 -----
Amphimedon queenslandica CCDC28 ----- M

90 100 110 120 130 140 150 160 170

Homo sapiens CCDC28A LKTMEERKVKRFS PKSFSAHCTQVVNAK-----KNA-IPVSKS--TGFSNPASQSTSORPKLKR-----
Mus musculus CCDC28A ---MEERKAKRKS PKSFSAHSTQVVNAK-----KNA-IPSSKS--TGFSNPTSQSASORPKLKR-----
Danio rerio CCDC28A ---MEEKSKKRKS PKPSSNQLPPSVPAR-----KT--TSRS--FGVGGIGTHS-SQRAKNRRG-----
Homo sapiens CCDC28B ---MDDKKKKRSP KPCLAQPAQAPGTLR-----RVP-VPTSHSGSLALGLPHLPSPKQRAKFKRV-----
Mus musculus CCDC28B ---MEDKKKKRSP KPCLTQQAQAPGTLR-----RVP-VPTSHSGSLALGLPHLPSPKQRAKFKRA-----
Danio rerio CCDC28B ---MEDKRKKRSP PKVSLPQPPPPINPR-----KLTVLPASKSATFSLGLPQPPSPKPRGKYKRSVVGAMGPSKEALAVPVVPPKN-----
Petromyzon marinus CCDC28 -----
Drosophila melanogaster CCDC28 VNDVETEEEAQSAPKSA TPASPAPVNIKIKGISSGETTRSRNSASCS IERT ISEKEKDKSQGGQAA-----TKV
Strongylocentrotus purpuratus CCDC28 LHQTGSEVTKIHRPASLVAPHLVSSSLT-----SQAGVKSRHIRGHSLGQIASPVGYPPAGMGRDFRGAGSHSGVAVMGPQYARS
Nemastotella vectensis CCDC28 -----
Trichoplax adhaerens CCDC28 ---MDDNHEEFLRTTSSIPSPLTIA-----EVSTSPRSKGRKIDASIDLNKKSTNKSATRSN-----
Amphimedon queenslandica CCDC28 AAPIDVKIQETEVRVEAPTTP-----

180 190 200 210 220 230 240 250

Homo sapiens CCDC28A ---MKEKTK-----PQGGEG---KGAQS-----TPI-QHSFLTVDVSDVQEMERGLLSLLNDFHSGKLOAFGNECSI EQ
Mus musculus CCDC28A ---MKEKNK-----PPGGEG---KGAQS-----TPI-QHSFLTVDVSDVQEMERGLLSLLNDFHSGKLOAFGNECSI EQ
Danio rerio CCDC28A ---ARDKPR-----PQSQSG---KSNQS-----SHI-QHSFLTVDVSDVQEMEKGLLSLLNDFHSGKLOAFGNECSI EQ
Homo sapiens CCDC28B ---GKEKCR-----PVLAGGG---SGSAG-----TPL-QHSFLEVTDVYEMEGGLLNLLNDFHSGRLQAFGKECSFEQ
Mus musculus CCDC28B ---GKEKCR-----PVLAGGG---GGSAG-----TPL-QHSFLEVTDVYEMEGGLLNLLNDFHSGRLQAFGKECSFEQ
Danio rerio CCDC28B TRPHREKPR-----APQPA GPSRVSQSS-----SPL-QHTFLTVDVSDVREMEGGLLNLLNDFHSGKLOAFGKVCSEFEO
Petromyzon marinus CCDC28 -----PPKGP--VTAVA-----GPTQQHSFLTVDVSEVREMERGLVNLLNDFHCGKLOAFGSECSFEQ
Drosophila melanogaster CCDC28 TYVNERPR-----PQAHGGS GGGAGDERFEFKTRPRKLLK-----VPDVKHMERALLGLLDDFHSGLKRAFSGGCTMDQ
Strongylocentrotus purpuratus CCDC28 HSLGHQPSKHSKQTTGNAPSRTSKNKTKQEKSKHKTVVDSAMETGCKEHSFITNASDIRHMONGLLNLEEFNSGKLOAFDENCSEYK
Nemastotella vectensis CCDC28 -----EHSFLTDRTDVQKMERGLLELMDDFNHGR LHAFGRDFTLEK
Trichoplax adhaerens CCDC28 ---QSNTTTRTSPADH-----EHSFLTDASDIKKMEDGLLVLLNDFHQGNLOAFGNEETF EK
Amphimedon queenslandica CCDC28 ---VSESSRTDPPKSPSKTKG PSM-----KHKRSQTESLRESEKALQQLLEDFE E E G K L N A F G N S D T L S K

Dominio Coiled-Coil

270 280 290 300 310 320 330 340 Exons

Homo sapiens CCDC28A MEHVRGMQEKLARLNLELYGEELEE-----LPEDKRKTASDSNLDRLLSDFEELNSSIQKLHLADAQDVPNTSAS-- 6
Mus musculus CCDC28A MEHVRGMQEKLARLNLELYGEELEE-----LPEDKRKAASDANLDRLLSDFEELNSSIQKLHLADAQDVPNASSS-- 6
Danio rerio CCDC28A MEHVREMQETLAPLHEDLYGEEVDE-----LPEDQRKSAYDTNMDKLLNLEELSSSIQKLNLA DTQDVPRTSSI-- 6
Homo sapiens CCDC28B LEHVREMQEKLARLHFSLDVGEEEDDEEEEDGVTEGLPEEQKTMADRNL DQLLSNLEDLSNSIQKLHLAENAEPEEQSAA-- 6
Mus musculus CCDC28B LEHVREMQEKLARLHFSLDVGEEEDDEEEEDGVTEGLPEEQKTMADRNL DQLLSNLEDLSNSIQKLHLAENAEPEEQPAA-- 6
Danio rerio CCDC28B LEHVREMQERLARLHFSLDSHVEE-----LSEDQRKNASDRNLEHLLSNLEELSTS IQKLHLAENQDLPKTSNT-- 6
Petromyzon marinus CCDC28 MEHVRELQERLARLHFDLDVESEA-----MAEDARKGVASRNLEQLLSNLEELSSSIQKLHVSDSQSLPRSASA-- 4
Drosophila melanogaster CCDC28 MTKIREQQESLAKLHFE LAAAEEDSLE-----HGNEFNTNKAQENMLQLMQRLEQLSISIEQLQTSHTGL----- 4
Strongylocentrotus purpuratus CCDC28 MSNVRDLQEKLARLHFEMDQLQA-----QGVGSKEAITLANQNMDHLLSNV-SISFMLQT----- 5
Nemastotella vectensis CCDC28 MDKVRELQERVAQQHFELDNAETE-----ADEDEVSSARNLEKLMKNLEGLSSTIQSLHQAHPD----- 1
Trichoplax adhaerens CCDC28 MDKIRELQEKLSQSHFKIEEESKRTSLSQ-----ENE EEWNNKSNQQINLLMRNTGTTAK----- 4
Amphimedon queenslandica CCDC28 LTKIRKMQEDLTRHFEIDQMRIS-----QENSGKDYQVEASLNEELTQTL EKGNEMYPLIIMYITVVAFMKIHF 6

Figura 21_ Alineamiento completo de todas las secuencias encontradas de CCDC28.
Las secuencias están indicadas con blanco si corresponden a CCDC28, con rojo a CCDC28B y con amarillo a CCDC28A. Ver formato electrónico.

Análisis de dominios proteicos

El siguiente análisis que realizamos consistió en determinar a partir de la secuencia aminoacídica de CCDC28B, potenciales dominios que nos aporten información sobre su función. Para esto, utilizamos diversos programas computacionales que están detallados en Materiales y Métodos y los dominios que encontramos están indicados en la **Figura 20**. El dominio más sobresaliente que presenta, y que da lugar al nombre de esta proteína, es un dominio “coiled coil” localizado en el extremo carboxilo terminal entre los residuos Glu158 y Glu193, mientras que los primeros 75-80 aminoácidos del extremo amino terminal se predicen como desordenados. Por lo general, los dominios “coiled coil” median la oligomerización de proteínas y/o interacciones heterólogas proteína-proteína y como se verá más adelante esto podría ser relevante para entender algunos de los resultados presentados en este trabajo.

Otros dominios que se predicen que presenta CCDC28B son: un dominio IQ de unión a calmodulina entre los residuos D101 y E120, un dominio de unión de la quinasa MAP (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) entre los residuos K128 y V138, una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) en el extremo amino terminal (K4-S9) y dos señales de exportación nuclear (NES, del inglés *nuclear export signal*) centradas en los residuos F134 y D178. Cuando analizamos la secuencia de CCDC28A, encontramos el dominio *coiled coil*, la secuencia NLS amino terminal, la secuencia NES carboxilo terminal y el motivo de unión a MAPK. Debido a sustituciones puntuales de aminoácidos, no se predice en esta proteína el motivo IQ ni la secuencia NES central.

En resumen, a través de este análisis *in silico* pudimos determinar datos sobre el origen y la evolución de CCDC28B así como posibles motivos que podrían ser relevantes para su función. Es importante destacar que la presencia de CCDC28B restringida a metazoarios coincide con que en todos los casos se trata de organismos ciliados. A su vez, se ha demostrado que los centrosomas y las cilias están altamente enriquecidas en proteínas con dominios *coiled coil* y regiones intrínsecamente desordenadas como las encontradas en CCDC28B (Nido, 2012). Por lo tanto creemos que los datos obtenidos en este análisis

son relevantes especialmente teniendo en cuenta la vinculación de CCDC28B con una ciliopatía como BBS y por tanto un posible rol de esta proteína en la biología de las ciliadas.

Parte B_Relación entre CCDC28B y las cilias primarias

La inhibición de la expresión de CCDC28B afecta la ciliogénesis en células en cultivo

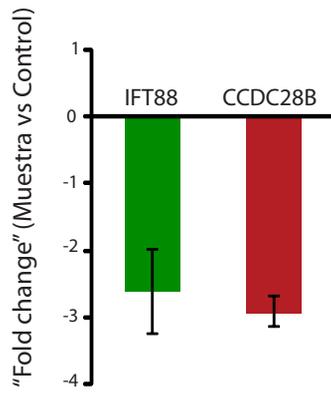
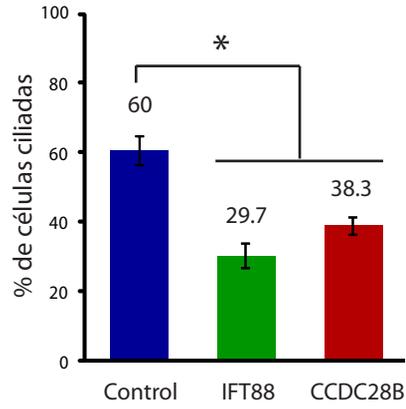
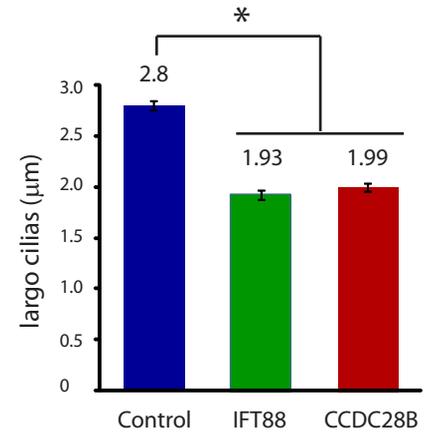
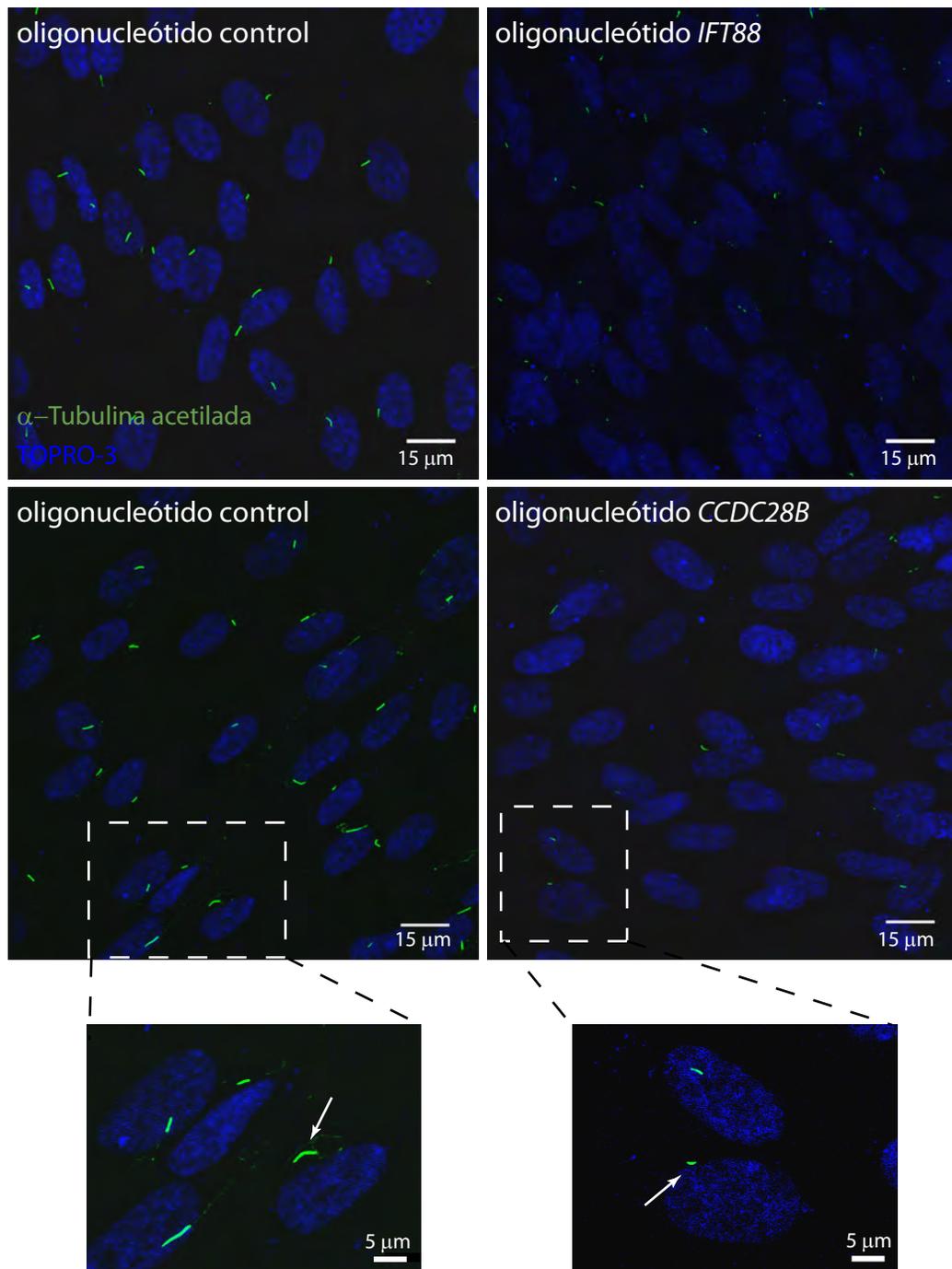
Teniendo en consideración los resultados obtenidos anteriormente, en una segunda etapa nos propusimos determinar en un modelo experimental, si existía una relación entre la expresión de CCDC28B y la formación de las cilias primarias. Para esto, trabajamos con un modelo de células en cultivo y evaluamos el efecto de inhibir la expresión de CCDC28B sobre el número de células que presentaban cilias y el largo de esas cilias. Como modelo celular utilizamos la línea celular humana hTERT-RPE (del inglés *human telomerase reverse transcriptase-retinal pigment epithelial cells*) y las cilias fueron detectadas por medio de un anticuerpo que reconoce a la α -tubulina acetilada. Para bloquear la expresión de CCDC28B utilizamos la tecnología Stealth RNAi™ siRNAs de Invitrogen, que consiste de pequeños ARN de interferencia complementarios a la secuencia del gen. Este método de reducción de la expresión se basa en que estos oligonucleótidos de ARN interactúan con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*) y desencadenan el corte y degradación del ARNm blanco por parte de la maquinaria celular (Rana, 2007).

Utilizando esas herramientas, transfectamos células hTERT-RPE con estos oligonucleótidos utilizando el método basado en liposomas (Lipofectamine™ RNAiMAX) y lo primero que evaluamos por medio de PCR en tiempo real (RT-PCR), fue la eficiencia de esos oligonucleótidos para disminuir la expresión de CCDC28B. Como control positivo utilizamos un oligonucleótido de ARN contra el ARNm de *IFT88*, ya que se ha demostrado que es una proteína esencial para la ciliogénesis (Pazour, 2000). Como control negativo utilizamos un oligonucleótido de ARN que contiene el mismo número de nucleótidos y porcentaje de Guaninas y Citosinas (porcentaje GC) pero que no hibrida con ningún ARNm y para la normalización se amplificó el ARNm de *GAPDH*. En la **Figura 22A** se puede observar que los oligonucleótidos de CCDC28B e *IFT88* disminuyen la expresión de sus ARNm blanco en unas 2,5-3 veces (tasa de cambio o “fold change”). Los experimentos fueron realizados en triplicados biológicos y duplicados técnicos. Posteriormente inhibimos la expresión de CCDC28B e *IFT88* y cuantificamos el número de células que presentaban cilias así como el largo de las mismas. Este sistema tiene la ventaja que

también permite monitorear la eficiencia de transfección ya que se transfectan las células con el oligonucleótido “problema” junto a un oligonucleótido que está conjugado a un fluoróforo y que no es complementario a ningún ARNm. Todos los cultivos celulares utilizados fueron aquellos que presentaron una eficiencia de transfección mayor a un 80%. Como se observa en la **Figura 22B-D** determinamos que la disminución de los niveles de CCDC28B provoca una reducción significativa tanto en el número como en el largo de las cilias. Un $38,3 \pm 3,4\%$ de las células transfectadas con el oligonucleótido de CCDC28B presentaron cilias, con un promedio de largo de $1,99 \pm 0,04 \mu\text{m}$, mientras que un $60 \pm 4\%$ de las células controles presentaron cilias, con un promedio de largo de $2,80 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Esta reducción fue comparable con lo observado cuando se utilizó el oligonucleótido de *IFT88*. En este caso se observó un $29,7 \pm 2,4\%$ de células ciliadas, con un largo de $1,93 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ($P < 0,001$). A partir de estos resultados pudimos determinar que CCDC28B es una proteína que está relacionada con la biología de las cilias ya que la disminución de sus niveles afecta el proceso de ciliogénesis.

Figura 22_ La disminución de CCDC28B en células hTERT-RPE determina defectos en la ciliogénesis.

A) Determinación por PCR en tiempo real de la eficiencia de reducción de la expresión de *IFT88* y *CCDC28B* utilizando los oligonucleótidos de ARN. B) Imágenes confocales de células hTERT-RPE transfectadas con el oligonucleótido control o con el oligonucleótido de *CCDC28B* o *IFT88*, donde se muestra una disminución en el largo y número de células ciliadas. Se utilizó TOPRO-3 para visualizar los núcleos (azul) y un anticuerpo α -tubulina acetilada (verde) para las cilias. En la parte inferior se presenta una magnificación de las fotos seleccionadas y se indican con una flecha las cilias. *GAPDH* se utilizó para la normalización. La expresión relativa de cada gen se muestra como factor de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) entre las muestras y el oligonucleótido control. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. C) Por medio del programa ImageJ se contaron más de 100 células y se cuantificó el porcentaje de células ciliadas en cada condición. D) Se midió por medio del programa ImageJ la longitud de más de 300 cilias en las células controles y en células donde se redujo la expresión de *IFT88* o *CCDC28B*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de duplicados biológicos y técnicos.

A**C****D****B**

Análisis de la función ciliar de CCDC28B in vivo

Para profundizar en el estudio de la asociación entre CCDC28B y las cilias decidimos desarrollar un modelo animal que nos permitiera estudiar *in vivo* las implicancias fisiológicas de esa asociación. Nuestra primera opción fue desarrollar una línea de ratón transgénica, la que nos permitiera anular la expresión de *Ccdc28b* y estudiar las consecuencias en todo un organismo. Por dificultades técnicas no pudimos completar el desarrollo de ese modelo, pero los pasos y logros alcanzados están descritos y presentados en la Parte F de esta tesis.

Debido a la necesidad de disponer de un modelo animal fue que decidimos trabajar con el pez cebra porque es un modelo que presenta muchas ventajas experimentales y ha sido muy utilizado para estudiar la biología de las cilias. En la sección Materiales y Métodos se describen las ventajas “técnicas” de este modelo así como se presenta una breve reseña sobre la importancia de su uso para el estudio de las ciliopatías. A continuación se presentan los resultados que obtuvimos utilizando este modelo.

Relación de CCDC28B y las cilias en el pez cebra: caracterización del ortólogo de CCDC28B en el pez cebra

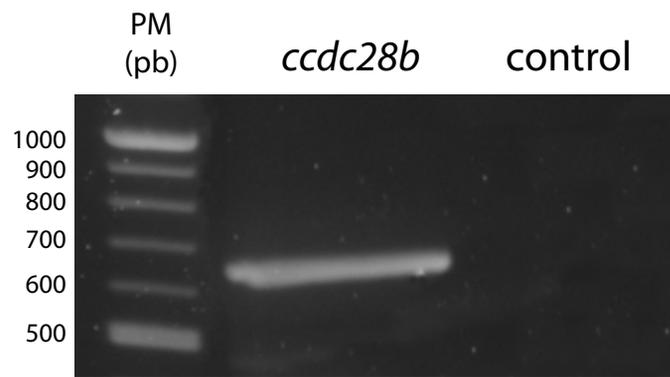
Para comenzar a estudiar la relación de CCDC28B con las cilias utilizando el modelo de pez cebra, lo primero que hicimos fue analizar si CCDC28B se expresa en el pez cebra y determinar cómo es su patrón de expresión. Contábamos con la información previa de que existe un único gen ortólogo, con una única variante de procesamiento del ARNm (**Figura 18**). Lo primero que hicimos fue amplificar con *primers* específicos el gen y luego clonarlo en diversos vectores para posteriormente producir tanto las sondas sentido y antisentido, utilizadas en experimentos de hibridación de ARN *in situ*, así como para producir el ARNm para ensayos de sobreexpresión. Los *primers* y vectores están detallados en Materiales y Métodos y en la **Figura 23A** se muestra la amplificación del marco abierto de lectura (ORF) de *ccdc28b* a partir de ARN/ADN copia obtenido de una muestra de cerebro de un pez cebra adulto. Como se puede observar fue posible amplificar el ORF de *ccdc28b* en el pez cebra, lo cual indica que este gen se expresa. Para determinar el patrón de expresión posteriormente realizamos una hibridación *in situ* utilizando una sonda antisentido complementaria al ARNm, la cual fue preparada a partir

del ORF clonado en el vector pGEM y la ARN polimerasa SP6. Como se puede observar en la **Figura 23B**, detectamos una expresión de *ccdc28b* ubicua a lo largo del eje rostro-caudal en embriones de 24 hpf y no observamos una concentración de señal en alguna zona particular del embrión.

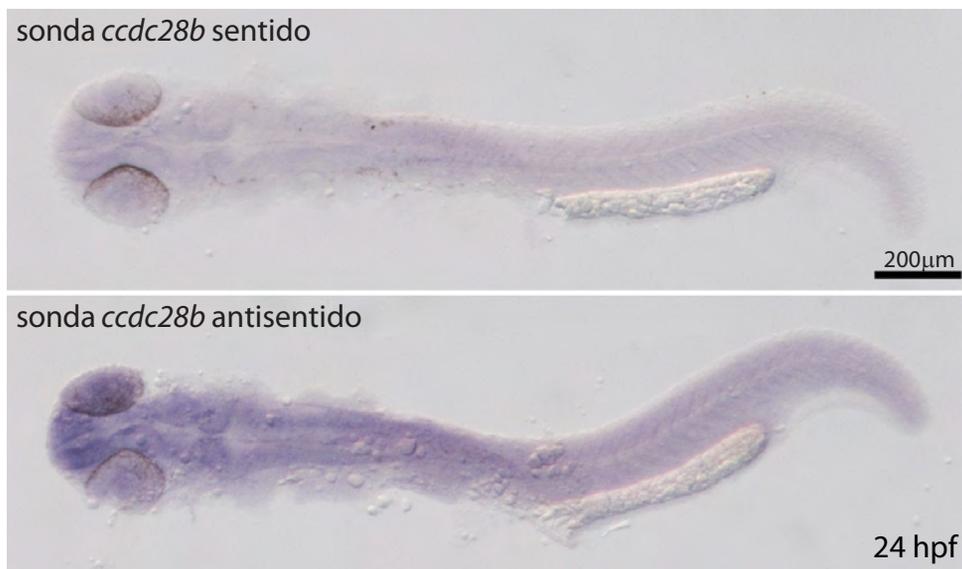
Figura 23_ Análisis de la expresión de *ccdc28b* en el pez cebra.

A) PCR a partir de ARN/ADN copia de cerebro de un pez adulto donde se amplificó el ORF del gen *ccdc28b* (642 pb). Esta banda fue recortada y clonada en diversos vectores, los cuales fueron posteriormente verificados por secuenciación directa. Como control se utilizó el mismo “mix” de PCR pero sin ADN. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. B) Hibridación *in situ* de ARN en embriones de 24 hpf, donde se observa una expresión ubicua del ARNm de *ccdc28b* a lo largo del eje rostro caudal. La sonda sentido se utilizó como control.

A



B



*Puesta a punto de un morfolino y caracterización de los morfantes *ccdc28b**

Para reducir los niveles de la proteína Ccdc28b en el pez cebra, diseñamos un morfolino que altera el *splice* (MOspl) de su ARNm entre el exón 2 y el intrón 2 (el mecanismo de acción de los morfolinos está descrito en Materiales y Métodos). La unión de este morfolino (MO) determina una retención del intrón 2 (90 pares de bases; pb) lo cual modifica el marco abierto de lectura e introduce un codón de terminación prematuro 17 pb dentro del intrón. De este modo, si este ARNm procesado incorrectamente fuera traducido, codificaría para una proteína trunca que corresponde solo a los primeros 79 aa de un total de 213 aa que contiene la proteína salvaje. Para verificar la eficiencia del MOspl realizamos una retro-transcripción y posterior PCR (rt-PCR) usando el ARN/ADN copia de embriones controles y de embriones inyectados con el MOspl (estos últimos denominados “embriones morfantes”; **Figura 24A**). Los *primers* fueron diseñados de tal modo que la amplificación de la banda salvaje o “wild type” (wt) resulta en una banda de 233 pb mientras que la amplificación a partir del ARNm “modificado” resulta en una banda de 323 pb debido a la retención del intrón 2. Determinamos que el MOspl afecta eficientemente el procesamiento de *ccdc28b* en una manera dependiente de la dosis inyectada (2-3 ng; **Figura 24A**) y que tanto el número como la gravedad de los embriones afectados se correlaciona con la concentración de morfolino inyectado (0,5-3 ng; **Figura 24B**). A partir de la cuantificación de los rt-PCR determinamos que la dosis de 3 ng del *ccdc28b*MOspl produce una reducción de un $45 \pm 10\%$ del ARNm wt. Es importante destacar que a pesar de que es una reducción de aproximadamente un 50%, la inyección de dosis apenas mayores (4 ng) provoca la detención de la gastrulación y la letalidad en casi el 100% de los embriones inyectados. Esto sugiere que un nivel mínimo de Ccdc28b sería necesario para completar las primeras etapas del desarrollo y mantener la viabilidad de los embriones. Debido a esto, seleccionamos para trabajar la dosis de 3 ng del *ccdc28b*MOspl, porque a pesar de que no elimina totalmente la cantidad de Ccdc28b, consistentemente determinó en todas las inyecciones realizadas aproximadamente un 80% de embriones con fenotipo.

Luego de haber definido la dosis de MO apropiada, comenzamos la caracterización del fenotipo que se observa al disminuir la expresión de *Ccdc28b*. Primero realizamos una caracterización global en embriones de 10 a 72 hpf y luego con técnicas más específicas

profundizamos en algunos de los fenotipos que observamos. La reducción de *Ccdc28b* en el pez cebra determina que los embriones presenten un cuerpo más corto y curvado, ojos más pequeños, defectos en el patrón de la pigmentación, alteraciones craneofaciales y una mala definición de los somites (**Figura 24B y C**). Un fenotipo muy evidente que presentaron los embriones morfantes fue hidrocefalia. En los embriones vivos se observó como una hinchazón del cuarto ventrículo y cuando los embriones fueron fijados se observó como una depresión, la cual es consecuencia de la deshidratación (**Figura 25A**; indicado con flechas). Para profundizar en el análisis de la alteración craneofacial observada, realizamos una tinción de los cartílagos con el colorante Azul Alcian (“*Alcian Blue*”) en embriones de 96 hpf y posteriormente medimos el ángulo del cartílago ceratohial (**Figura 25B**, indicado con flechas en las vistas ventrales). Observamos un incremento significativo en el ángulo de este cartílago, el cual en los controles fue de $30^{\circ} \pm 1,4^{\circ}$ y en los morfantes de $55^{\circ} \pm 3,6^{\circ}$ ($P < 0,001$), lo que refleja una marcada alteración del desarrollo de los cartílagos/huesos del cráneo. Para caracterizar en mayor detalle la alteración de la estructura de los somites que presentan los morfantes de *ccdc28b* (**Figura 24C y 25C**, indicado con flechas), realizamos una tinción con faloidina para visualizar los filamentos de actina en las fibras musculares (**Figura 25D**). Cuando se compararon iguales planos focales entre controles y morfantes, observamos una desorganización de las fibras musculares, detectando en muchos casos un cruce de fibras entre somites adyacentes (indicado con una flecha en la **Figura 25D**).

Figura 24_Verificación del funcionamiento del morfolino *splice* de *ccdc28b* y caracterización del fenotipo de los embriones morfantes.

A) Análisis por medio de rt-PCR de los niveles del ARNm de *ccdc28b* donde se observa un incremento, dosis dependiente, de los niveles del ARNm procesado incorrectamente (sometido a “splice”) por la unión del morfolino (banda de 323 pb). A la derecha se presenta la cuantificación de la intensidad de la banda salvaje (“wild type”, 233 pb) normalizado con la intensidad de la banda de *gapdh* (banda de 300 pb) de cada una de las condiciones analizadas. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de duplicados biológicos. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. B) Caracterización del fenotipo de los embriones morfantes de *ccdc28b* usando diversas dosis del morfolino. Los morfantes presentan ojos más chicos, defectos en la pigmentación, un cuerpo más corto y curvado y malformaciones craneofaciales. La dosis seleccionada fue la de 3 ng ya que fue la que en todas las inyecciones independientes realizadas ($n > 3$), determinó más de un 80% de embriones con fenotipo. C) Vistas laterales y dorsales de embriones controles y morfantes de *ccdc28b* (dosis 3ng) en el estadio de 10 somites. Los morfantes presentan un cuerpo más corto y una alteración en la definición de los somites (indicado con flechas). Se analizaron 30 embriones por condición de dos inyecciones independientes.

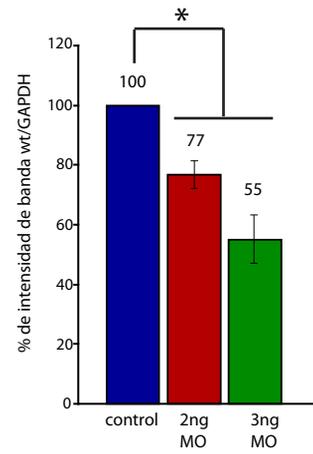
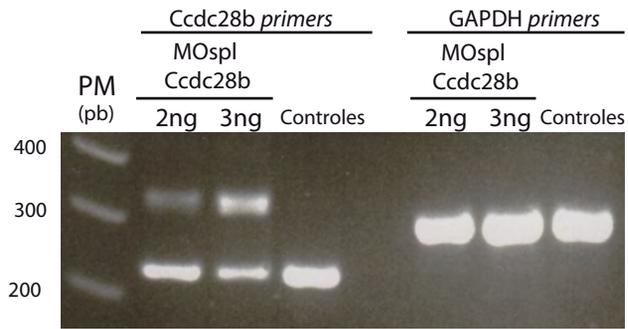
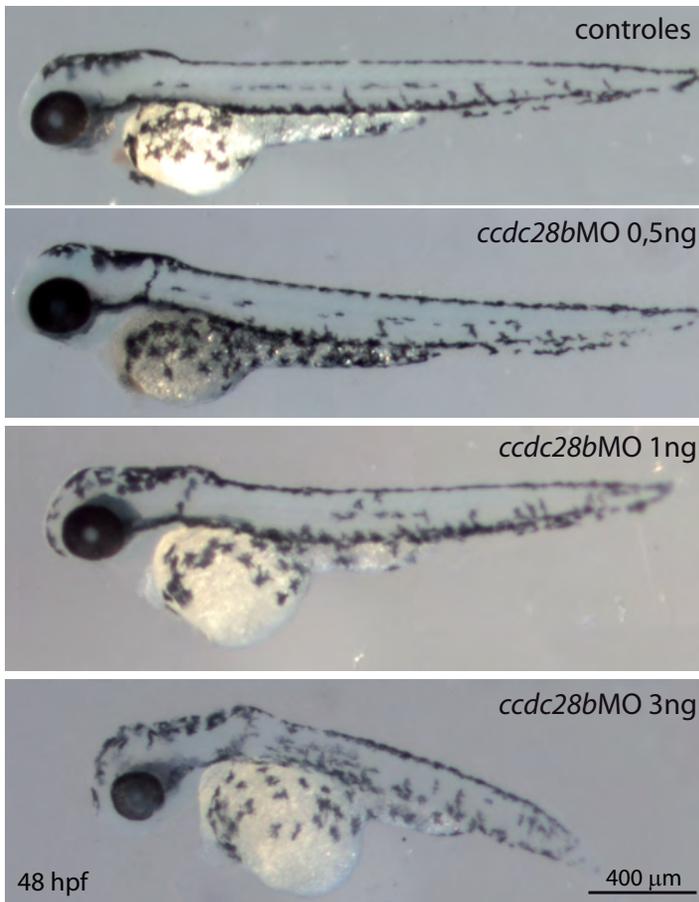
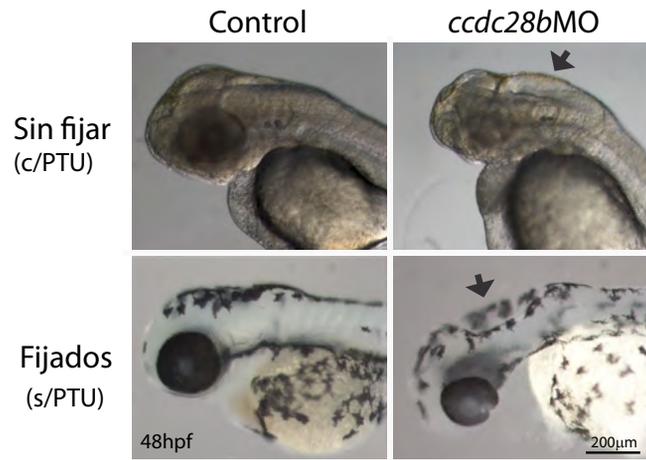
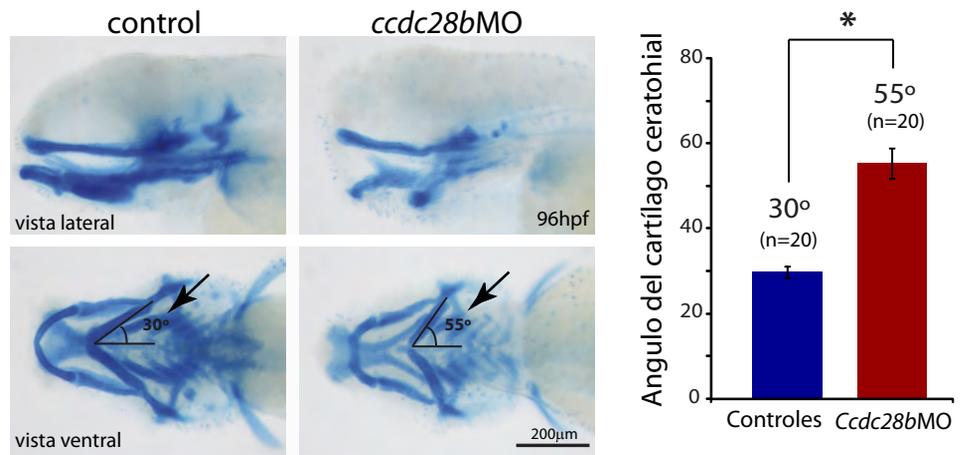
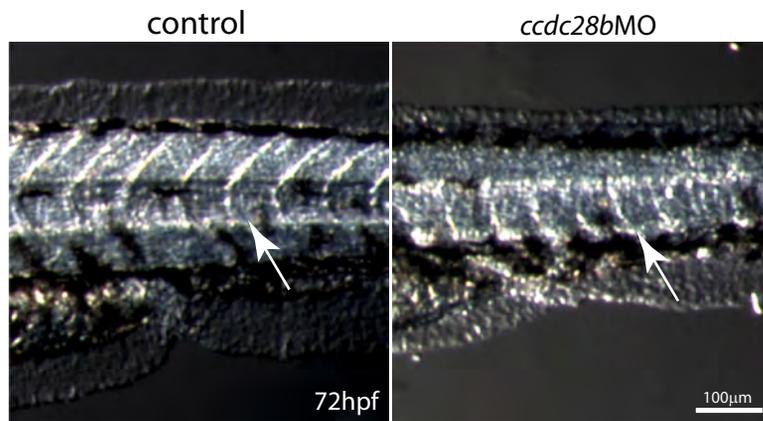
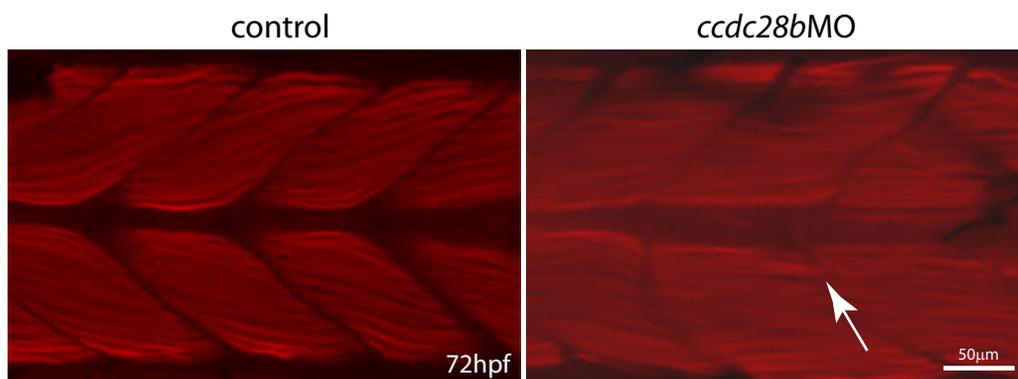
A**B****C**

Figura 25_ Caracterización del fenotipo de los embriones morfantes de *ccdc28b*.

A) Análisis del fenotipo craneofacial de los morfantes de *ccdc28b*. Se utilizó la dosis experimentalmente seleccionada de 3 ng del morfolino *splice* y se analizaron 30 embriones en cada condición de tres inyecciones independientes. Los morfantes de *ccdc28b* presentan hidrocefalia, la cual se evidencia en los embriones vivos como una hinchazón del cuarto ventrículo y en los embriones fijados como una depresión (indicado con flechas en las figuras de la derecha). La diferencia en la pigmentación entre embriones fijados y sin fijar es debido al tratamiento con 1-phenyl 2-thiourea (PTU) para eliminar la pigmentación de la piel. B) La alteración craneofacial fue analizada en mayor detalle por medio de la tinción de los cartílagos con el colorante Azul Alcían y la medición del ángulo del cartílago ceratohial. Los morfantes *ccdc28b* presentan un incremento del ángulo del cartílago ceratohial (controles $30^\circ \pm 1,4^\circ$, morfantes $55^\circ \pm 3,6^\circ$; n=20 por condición). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de duplicados biológicos. C) Imágenes “tipo campo oscuro” de la zona de la cola de embriones de 72 hpf donde se puede observar la alteración de la organización somítica en los morfantes de *ccdc28b* (indicado con flechas, n=30 por condición). D) Análisis por medio de la tinción con faloidina de la organización de los filamentos de actina de las fibras musculares en embriones de 72 hpf (n=20 por condición). Los morfantes de *ccdc28b* presentan una alteración de la organización de las fibras musculares (indicado con una flecha).

A**B****C****D**

Como último paso en esta caracterización, y para determinar si los fenotipos observados eran específicos de reducir los niveles de *Ccdc28b*, realizamos un experimento de rescate del fenotipo con el ARNm de *ccdc28b* del pez cebra. El ARNm se sintetizó *in vitro* a partir del ORF clonado previamente y fue inyectado en embriones wt y en embriones a los cuales previamente se les había inyectado el *ccdc28b*MOspl. Como se observa en la **Figura 26** fuimos capaces de rescatar el fenotipo de los embriones morfantes, ya que la inyección de 100 pg del ARNm de *ccdc28b* redujo el número de embriones con fenotipo de 78% (n=18/26) a 31% (n=6/19). Con estos resultados confirmamos que el fenotipo observado es consecuencia específica de reducir los niveles de *Ccdc28b*.

La inhibición de la expresión de Ccdc28b resulta en defectos a nivel de las ciliias in vivo

Es importante mencionar que el desarrollo de este modelo animal nos aportó mucha información sobre la relación entre *CCDC28B* y las ciliias ya que los fenotipos observados son muy similares a los que presentan otros morfantes y mutantes de proteínas ciliares (Gerdes, 2007; Ross, 2005; Tobin & Beales, 2008; Walczak-Sztulpa, 2010; Yen, 2006). Dado que observamos que *CCDC28B* afecta ciliogénesis en células en cultivo y que el fenotipo global de los morfantes de *ccdc28b* es compatible con un defecto en la función de las ciliias, decidimos estudiar si las ciliias están afectadas en estos embriones morfantes.

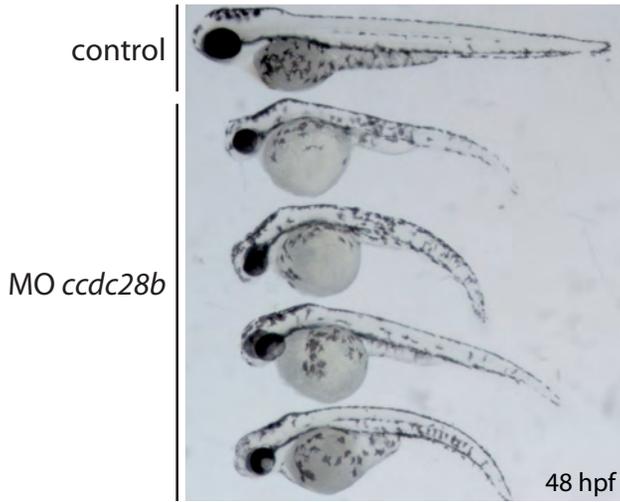
Para probar esta posibilidad lo primero que evaluamos fueron las ciliias de la vesícula de Kupffer (KV), dado que es un órgano altamente ciliado y de fácil observación. Para esto, utilizamos microscopía confocal y anticuerpos contra α -tubulina acetilada y γ -tubulina para detectar ciliias y cuerpos basales, respectivamente. Se analizaron más de 500 ciliias de 18 KVs individuales de embriones controles y morfantes en estadio de 12 somites. Observamos que la inyección del *ccdc28b*MOspl determinó una reducción significativa en la longitud de las ciliias de la KV ($3,24 \pm 0,13 \mu\text{m}$) comparado con los controles ($4,65 \pm 0,21 \mu\text{m}$; **Figura 27A**). Sin embargo, utilizando este modelo, no detectamos una diferencia en el número de ciliias, lo cual podría indicar posibles diferencias entre el proceso de ciliogénesis de las células RPE y el modelo *in vivo* o bien que por algún factor de tipo técnico no sea posible registrar una posible diferencia. Como se mencionó previamente, el movimiento de las ciliias de la KV genera un flujo de líquido extracelular que resulta

fundamental en la determinación del eje de simetría izquierda-derecha del embrión. Por lo tanto, estudiamos si esta alteración del largo de las cilias que observamos en los morfantes *ccdc28b* tiene consecuencias en la especificación del eje de simetría del embrión. Para esto, realizamos una hibridación *in situ* de ARN utilizando una sonda antisentido de la cadena liviana de la miosina cardíaca 2 (*cmIc2*) para visualizar la orientación del bucle del atrio del corazón. Determinamos que un 42% (n=14/34) de los morfantes (estadio 48 hpf) presentaron una orientación anormal (central o hacia la derecha) mientras que solo se observó una orientación incorrecta en 3% (n=1/36) de los animales control (**Figura 27B**). Estos resultados demuestran que la disminución de la expresión de *ccdc28b* determina un defecto en las cilias de la KV, lo cual altera la especificación del eje izquierda-derecha del embrión.

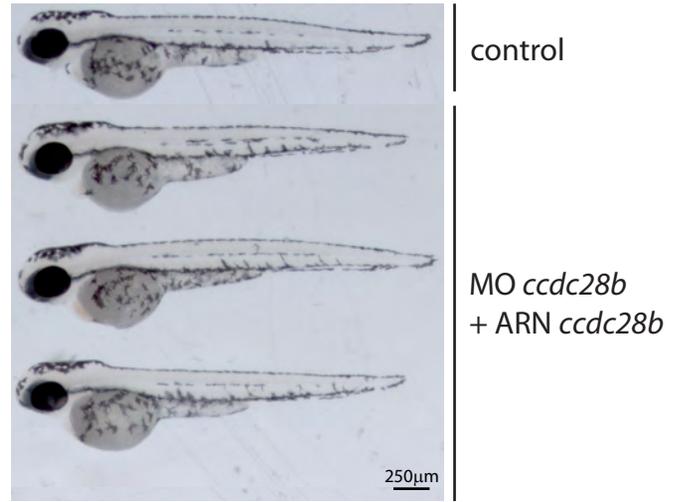
Figura 26_ Especificidad del fenotipo observado en los morfantes de *ccdc28b*.

El fenotipo de los morfantes *ccdc28b* (A) es específico ya que fue rescatado por la inyección del ARNm de *ccdc28b* (B). C) La inyección del morfolino de *ccdc28b* determinó un 78% (n=18/23) de embriones con fenotipo. La inyección del morfolino junto con el ARNm de *ccdc28b* redujo a un 31% (n=6/19) los embriones con fenotipo. La inyección del ARNm de *ccdc28b* determinó solamente un 11% de embriones con fenotipo (n=3/27).

A



B



C

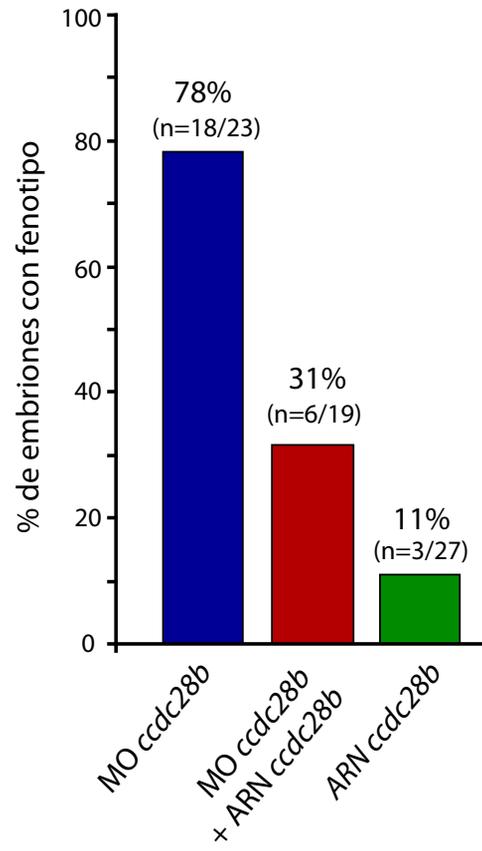
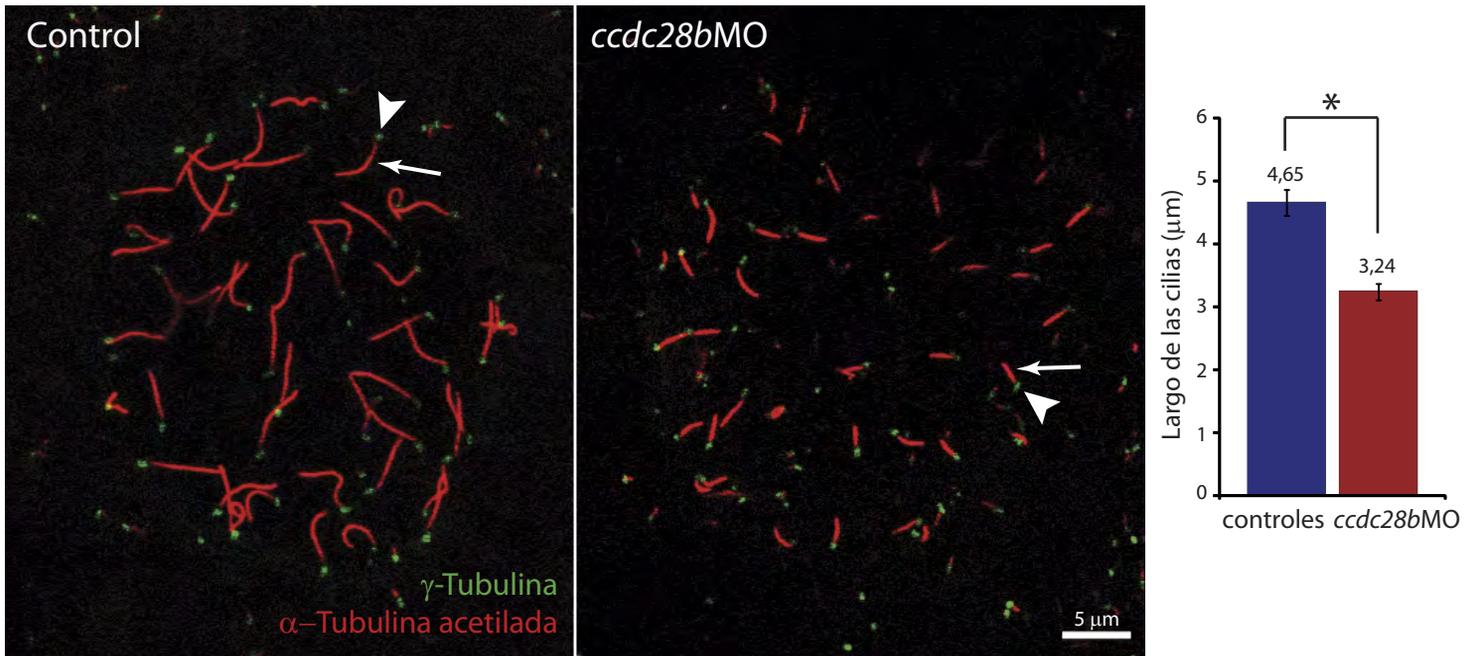


Figura 27_ La reducción de Ccdc28b resulta en defectos en ciliogénesis y en la determinación del eje derecha-izquierda.

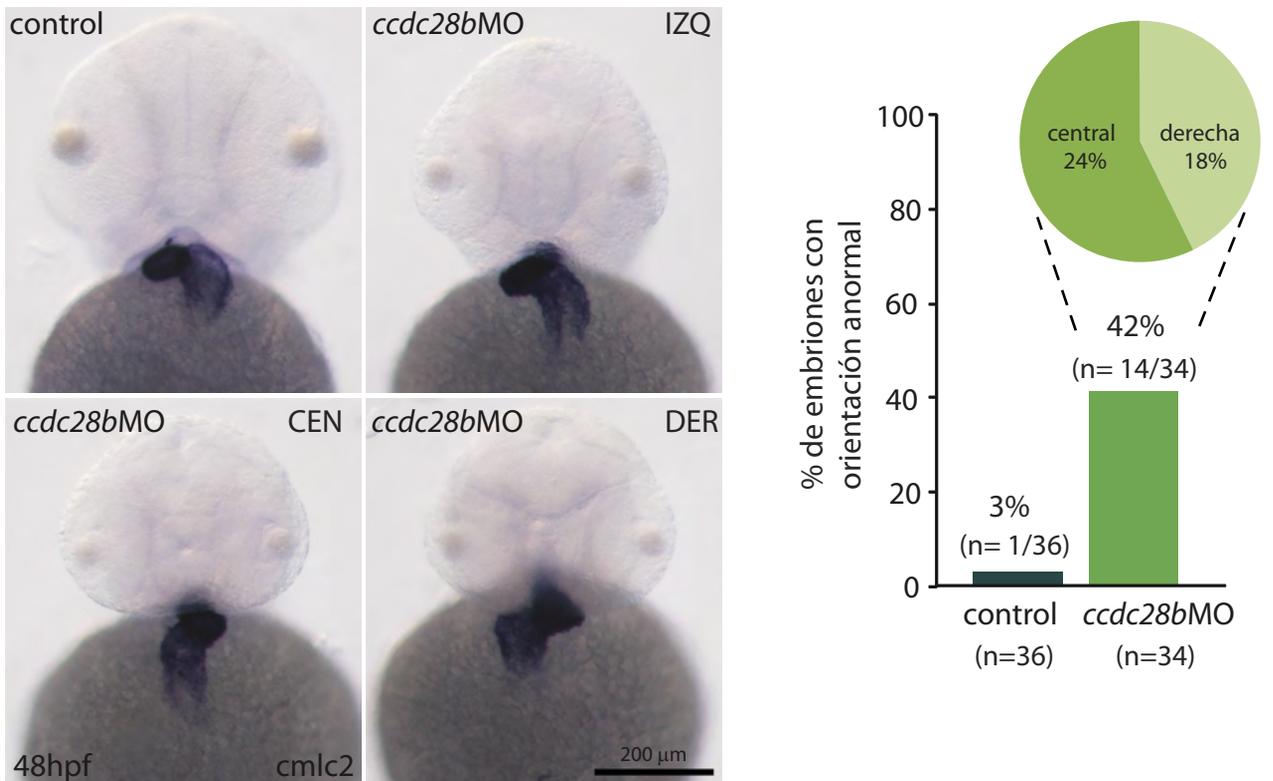
A) Las ciliias y los cuerpos basales de la vesícula de Kupffer (KV, estadio 12 somites) se visualizaron por medio del uso de anticuerpos anti α -tubulina acetilada (rojo, flecha) y γ -tubulina (verde, cabeza de flecha), respectivamente. Se tomaron imágenes confocales de 18 KV de cada condición y se determinó la longitud de las ciliias por medio del programa ImageJ (>500 ciliias analizadas por condición). El largo promedio de las ciliias en los morfantes de *ccdc28b* fue significativamente menor que en los animales control. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de tres inyecciones independientes. B) La hibridación *in situ* de ARN utilizando una sonda para el marcador cardíaco *cm1c2* muestra que los animales morfantes presentan defectos en la especificación del eje derecha-izquierda, ya que el 42% (n=14/34) de los morfantes presentó una orientación anormal del bucle del atrio del corazón.

A

Vesícula de Kupffer



B



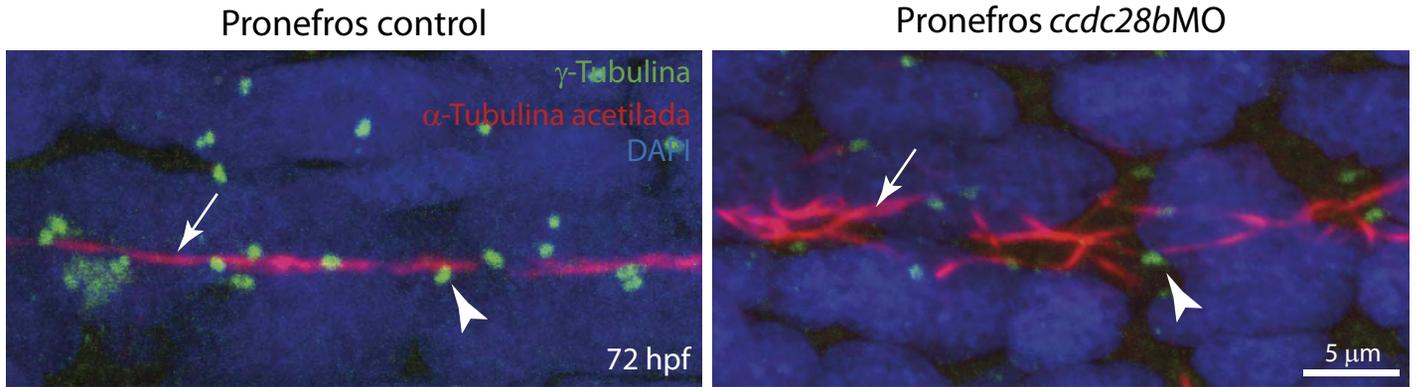
Además de la KV decidimos examinar otros tejidos ciliados en los morfantes de *ccdc28b*. Realizamos una tinción para las cilias en todo el embrión (estadio 72 hpf) y observamos el epitelio que recubre los conductos de los pronefros, debido a que es otro de los órganos altamente ciliados que presenta el pez cebra. En los embriones controles, las cilias de este epitelio se alinean a lo largo del conducto por lo que se visualizan como una delgada línea (**Figura 28A**, panel izquierdo). En contraste, observamos que la organización de las cilias en los morfantes *ccdc28b* estaba claramente alterada (**Figura 28A**, panel derecho). No fue posible cuantificar el largo de estas cilias debido a la distribución que adoptan y el alto grado de superposición entre las mismas. Las cilias de los pronefros del pez cebra son móviles y se ha demostrado que tanto su inmovilidad como la falta de coordinación en su movimiento resultan en defectos renales y formación de quistes (Kramer-Zucker, 2005). Para evaluar si el defecto en las cilias de los morfantes de *ccdc28b* afecta la función renal, realizamos un ensayo de eliminación de un colorante (dextrano de rodamina). Este ensayo consiste en inyectar un colorante en el pericardio y registrar la desaparición de la señal fluorescente en el tiempo. A las 24 horas post inyección (24 hpi), los embriones controles retuvieron un $38 \pm 6\%$ del colorante mientras que los morfantes de *ccdc28b* retuvieron un $82 \pm 3\%$, lo que refleja una alteración de la función renal ($P < 0,001$, **Figura 28B**). Sin embargo, y a pesar del defecto en la función renal, no se detectó la formación de quistes en los morfantes de *ccdc28b*, posiblemente debido a la ausencia de una obstrucción en la cloaca o por la actividad residual de *Ccdc28b* que persiste en los morfantes. Es importante destacar que la incorporación del colorante fue similar entre los morfantes y los controles, como se puede observar en las imágenes tomadas a las 3 hpi (**Figura 28B**, panel superior). Esto indica que las diferencias observadas no son debidas a defectos en la circulación y que por tanto son consecuencia de una mala función renal para eliminar el colorante de la sangre.

El conjunto de nuestros resultados muestran que la reducción de *Ccdc28b* en el pez cebra determina un defecto en la formación de las cilias, lo cual altera la fisiología de órganos ciliados. Por lo tanto, utilizando una línea celular humana y un modelo animal, demostramos que *CCDC28B* cumple un rol en la biología de las cilias.

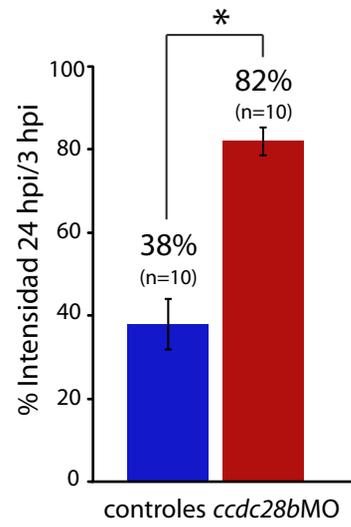
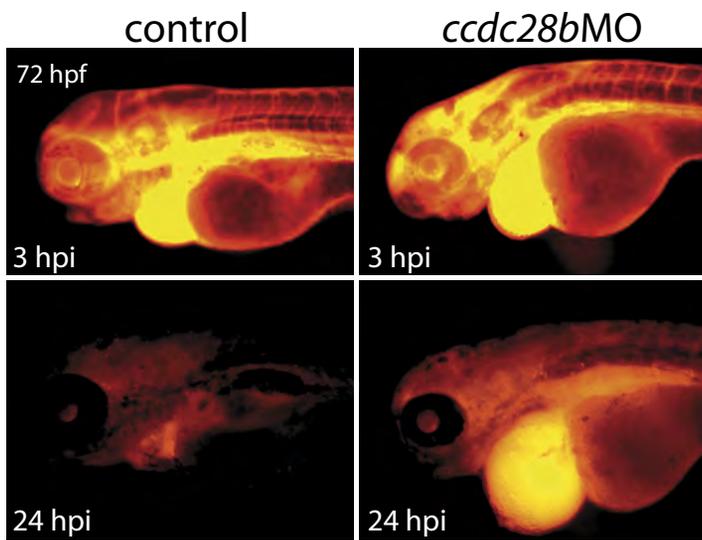
Figura 28_ Los morfantes de *ccdc28b* presentan defectos en la organización de las cilias.

A) Se observó una desorganización de las cilias de los pronefros, visualizadas con anticuerpos anti γ -tubulina (cuerpos basales, cabeza de flecha) y α -tubulina acetilada (cilias, flecha). En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. B) Por medio de un ensayo de eliminación del dextrano de rodamina observamos que los morfantes de *ccdc28b* (72 hpf) presentan una alteración de la función renal. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes (10 embriones analizados por condición en cada inyección). hpi: horas post-inyección.

A



B



Parte C_ Entendiendo el rol biológico de CCDC28B a nivel celular y molecular: implicancias a nivel de las ciliias

Nuestros resultados tanto en células humanas así como en el pez cebrá nos indicaban que CCDC28B es una proteína que participa en el proceso de ciliogénesis y en la regulación del largo de las ciliias. Sin embargo, en este punto todavía no teníamos información mecanística acerca de cómo esta proteína ejerce esas funciones. Desde el inicio de este trabajo, y por tanto previo a obtener los resultados hasta ahora mostrados, evaluamos que una buena aproximación experimental para ganar información acerca de una proteína de función desconocida podía ser determinar con qué proteínas interactúa. De esta manera, y si los interactores resultaban ser proteínas con función conocida, podríamos inferir posibles funciones de CCDC28B. Para esto, lo primero que realizamos fue un ensayo de doble híbrido en levadura, cuya primer etapa fue realizada por el Dr. Badano como parte de su trabajo posdoctoral. La etapa de confirmación de los clones positivos y la eliminación de los falsos positivos fue realizada en Montevideo como parte de esta tesis doctoral. Cabe destacar en este punto que la identificación inicial de interactores de CCDC28B precedió en el tiempo a la identificación del BBSoma y por tanto la determinación de un vínculo directo entre las proteínas BBS y la ciliogénesis. A su vez, la caracterización de CCDC28B y sus interactores comenzó antes de que pudieramos determinar un rol directo de esta proteína en la biología de las ciliias. Por estos motivos, la relación entre CCDC28B y distintas proteínas BBS, así como la posibilidad de que CCDC28B participase en el proceso de ciliogénesis a través del BBSoma, no fue explorada en este trabajo de tesis (ver la sección de Discusión).

Determinación de interactores de CCDC28B

Ensayo de doble híbrido en levadura

El ensayo de doble híbrido que se utilizó fue una variante citoplasmática que se basa en revertir el efecto de una mutación que impide la activación de la vía de señalización intracelular Ras, la cual está involucrada en procesos de crecimiento, supervivencia y proliferación celular. En este ensayo, se utiliza una cepa de la levadura *Saccharomyces*

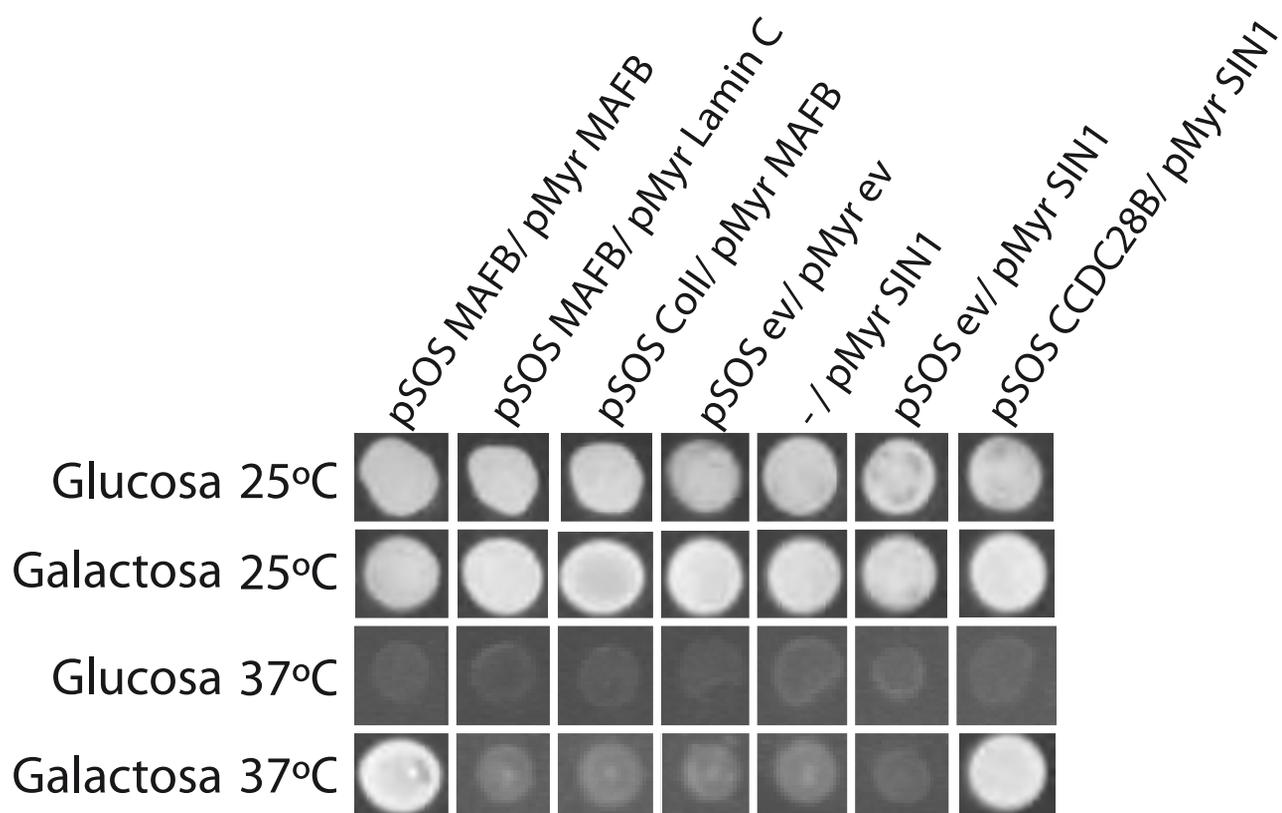
cerevisiae que porta una mutación puntual, y sensible a la temperatura, en el gen de la proteína reguladora *cdc25* e impide que a 37°C se active la vía de señalización Ras. El rescate de la función de la vía Ras se logra por la interacción de la proteína de interés (denominada “bait” o carnada) con la proteína blanco (denominada “prey” o presa). La proteína “carnada” es expresada como una proteína de fusión con la proteína SOS, la cual es el homólogo humano de *cdc25* (vector pSOS) y la proteína “presa” es expresada a partir de una biblioteca de ADN copia como una proteína de fusión con una señal de miristilación que le permitirá anclarse a la cara citoplasmática de la membrana celular. La biblioteca de ADN copia está clonada en el vector pMyr bajo el control del promotor GAL1, lo que determina que la expresión de la proteína puede ser controlada por medio de crecer a las levaduras en presencia de glucosa (reprime la transcripción) o galactosa (induce la transcripción). Si ocurre la interacción entre las proteínas “carnada” y “presa”, el dominio hSOS se localizará en la membrana plasmática y por lo tanto la vía de Ras puede ser activada a la temperatura restrictiva de 37°C.

En una primera instancia se seleccionaron todos aquellos clones que fueron capaces de crecer a 37°C solo en presencia de galactosa (ya que promueve la expresión de la proteína codificada en el vector pMyr). Para confirmar estas interacciones, los plásmidos de los candidatos fueron re-transformados en la cepa de levadura *cdc25H*, tanto en forma individual como junto al vector pSOS sin inserto y pSOS-CCDC28B, de manera de testear la dependencia entre las proteínas “carnada” y “presa”. Consideramos por tanto un verdadero positivo solo a aquel interactor capaz de hacer crecer las levaduras a 37°C solo en presencia de galactosa (no en glucosa) y en presencia de hSOS-CCDC28B.

De ese ensayo se obtuvieron y confirmaron 4 proteínas que interactúan con CCDC28B en levaduras, las cuales son: 1) CINP (del inglés *cyclin-dependent kinase 2-interacting protein*), 2) NCKAP5 (del inglés *Nck-associated protein 5*), 3) PTPRA (del inglés *protein tyrosine phosphatase receptor A*) y 4) MAPKAP1 (del inglés *mitogen-activated protein kinase associated protein 1*, o también llamada SIN1, del inglés *SAPK1 interacting protein*). En la **Figura 29** se muestra como ejemplo el resultado del ensayo para uno de los interactores (MAPKAP1 o SIN1).

Figura 29_Determinación de interactores de CCDC28B.

Por medio de un ensayo de doble híbrido en levadura se identificaron cuatro proteínas que interactúan con CCDC28B. A modo de ejemplo, se muestra el ensayo para la proteína SIN1. Sólo la interacción SIN1-CCDC28B le confiere a las levaduras la capacidad de crecer a la temperatura restrictiva de 37°C. La interacción MAFB-MAFB corresponde al control positivo; las interacciones MAFB-Lamin C, Coll-MAFB y pSOS ev-pMyr ev a los controles negativos.



La información bibliográfica disponible sobre estas proteínas nos permitió identificar que todas ellas están relacionadas directa o indirectamente con la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, la proteína CINP interactúa con CDK2 (del inglés *cyclin-dependent kinase 2*), con CDC7 (del inglés *cell division cycle 7-related protein kinase*), con MCM5 (del inglés *DNA replication licensing factor MCM5*), así como se asocia con el complejo de reconocimiento del inicio de la replicación (ORC2) (Grishina & Lattes, 2005; Lovejoy, 2009; Wang, 2011). Sobre la proteína NCKAP5, existe muy poca información funcional pero se ha demostrado que interactúa con NCK, la cual es una proteína con regiones de homología Src, la cual media vías de señalización a través de receptores tirosina-quinasa (Matuoka, 1997; Labelle-Cote & Larose, 2011). La proteína PTPRA es un miembro de la familia de fosfatasas de tirosina (PTP), las cuales son moléculas de señalización que regulan el crecimiento y diferenciación celular, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. PTPRA es un receptor tipo PTP, que contiene un dominio extracelular, un único dominio transmembrana y dos dominios catalíticos intra-citoplasmáticos. Se ha demostrado que PTPRA desfosforila y activa a la familia de tirosinas quinasas Src y está implicada en la señalización por integrinas, adhesión celular y proliferación (Pallen, 2003). Por último, MAPKAP1 o más conocida como SIN1 es una proteína miembro del complejo mTOR2 (mTORC2) de la vía de señalización mTOR (Frias, 2006; Jacinto, 2006; Yang, 2006). Como ya se describió en la Introducción, ésta vía está implicada en el crecimiento y proliferación celular, así como en la reorganización del citoesqueleto (Laplante & Sabatini, 2012).

CCDC28B interactúa con SIN1 en células de mamíferos

De todas las proteínas que identificamos decidimos centrar nuestros estudios en SIN1 ya que fue la que nos resultó más interesante por la información con la que se disponía al comienzo de esta tesis. En ese momento se contaba con la información sobre el rol central que cumple la vía mTOR en la patogénesis de la poliquistosis renal y sobre su asociación con la vía de Wnt, procesos que habían sido asociados con las cilias primarias (Shillingford, 2006; Inoki, 2006). Esta información nos aportaba indicios sobre una posible asociación directa de la vía de mTOR con las cilias primarias, información que fue confirmada tiempo después (Boehlke, 2010; Yuan, 2012). Estos estudios por tanto

reforzaron nuestro interés en la interacción SIN1/CCDC28B y en la posibilidad de ganar información sobre el mecanismo por el cual CCDC28B afecta ciliogénesis, a la vez de poder aportar información sobre la relación entre la vía de mTOR y las cilias primarias.

La siguiente etapa consistió en confirmar la interacción SIN1/CCDC28B en células de mamíferos por medio de una co-inmunoprecipitación (Co-IP). Para esto, lo primero que realizamos fue el clonado del ORF de SIN1 en los vectores de expresión en mamíferos, pMyc y pHA (Clontech), mientras que el ORF de CCDC28B ya había sido clonado previamente (Badano, 2006). Se utilizaron estos vectores porque permiten agregarle a la proteína clonada una etiqueta o “tag”, la cual se expresa fusionada a la proteína clonada y para la cual existen anticuerpos comerciales que la reconocen (epítopes c-Myc o HA). De este modo podíamos detectar proteínas para las cuales no teníamos un anticuerpo específico. En los casos en los que se dispuso de anticuerpos comerciales para las proteínas de interés se priorizó su uso para realizar las co-inmunoprecipitaciones de las proteínas endógenas. Los plásmidos fueron transfectados en células de mamíferos (línea humana HEK293) y posteriormente los lisados fueron sometidos a la co-inmunoprecipitación. Pudimos determinar que CCDC28B y SIN1 también interactúan en células de mamíferos, utilizando tanto proteínas con “tag” (HA-CCDC28B y Myc-SIN1), como por medio de una Co-IP semi-endógena (Myc-CCDC28B y anticuerpo anti-SIN1; **Figura 30A y B**).

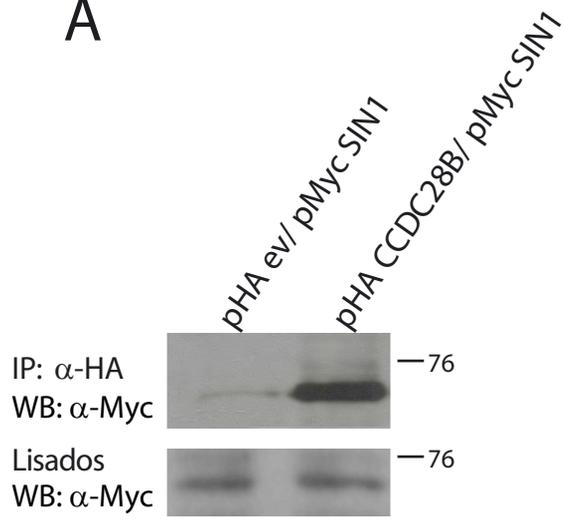
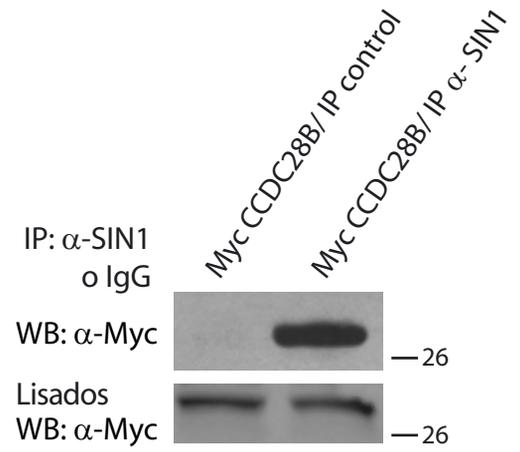
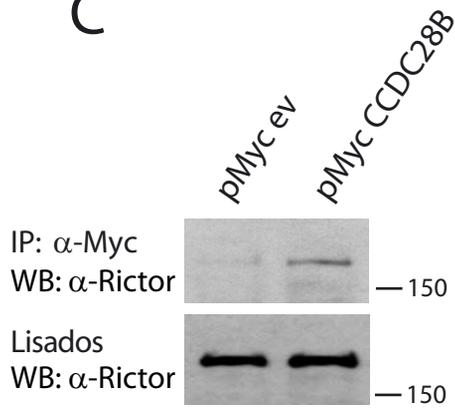
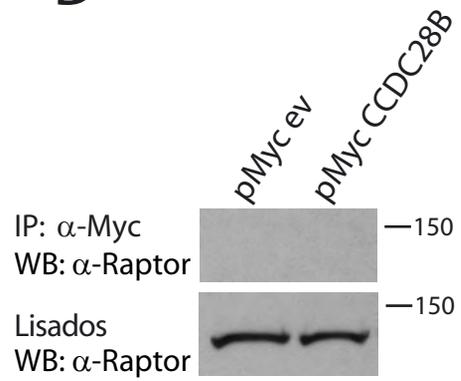
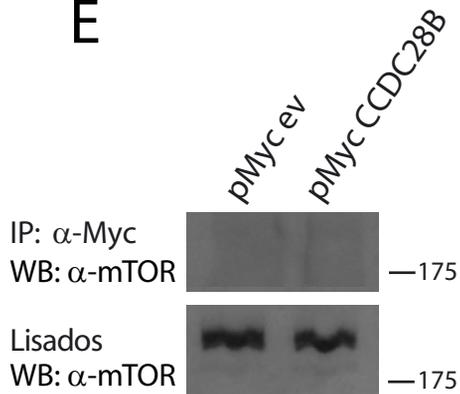
Debido a que el principal rol reportado de SIN1 es como miembro estructural de mTORC2, nos propusimos determinar si CCDC28B interactúa con SIN1 en el contexto de este complejo. El complejo mTOR2 también incluye a las proteínas mTOR, mLST8 y Rictor y ha sido reportado que la estabilidad del complejo depende de la interacción SIN1-Rictor (Oh & Jacinto, 2011; Yang, 2006; Sarbassov, 2004). Es por esto, que evaluamos si CCDC28B interactúa con SIN1 en el contexto de mTORC2 por medio de testear si CCDC28B también puede interactuar bioquímicamente con Rictor. Para esto, transfectamos células con Myc-ev (vector vacío) o Myc-CCDC28B, realizamos la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Myc, y testeamos la presencia de Rictor por medio de un *Western blot*. Observamos que CCDC28B y Rictor también co-inmunoprecipitan (**Figura 30C**). Para verificar que CCDC28B interactúa solo con miembros del complejo mTOR2 realizamos una co-inmunoprecipitación semi-endógena para detectar a Raptor, el cual es un miembro

específico del complejo mTOR1. En este caso, no fuimos capaces de detectar a Raptor en los inmunoprecipitados de Myc-CCDC28B (**Figura 30D**).

Debido a que ha sido reportado que SIN1 y Rictor forman primero un heterodímero y luego se asocian con mTOR para formar mTORC2 (Frias, 2006; Jacinto, 2006; Oh & Jacinto, 2011), decidimos determinar si la interacción entre CCDC28B y SIN1/Rictor ocurre previamente a que se ensamblen con mTOR. Para esto, estudiamos por medio de una co-inmunoprecipitación si CCDC28B también interactúa con mTOR. Utilizando las mismas condiciones experimentales que para la detección de Rictor, no fuimos capaces de detectar una interacción entre CCDC28B y mTOR (**Figura 30E**). Nuestros resultados por lo tanto indican que CCDC28B interactúa directamente con SIN1, se asocia también con Rictor, pero no estaría formando parte de mTORC2.

Figura 30_ CCDC28B interactúa con SIN1 y Rictor en células de mamíferos.

A) Se detectó a Myc-SIN1 cuando se inmunoprecipitó a HA-CCDC28B. B) Esa interacción también fue detectada cuando se realizó la inmunoprecipitación (IP) de manera semi-endógena (Myc-CCDC28B y α -SIN1). Como control se utilizó una misma proporción de IgG de conejo en los mismos lisados celulares. C) Por medio de una IP semi-endógena se determinó que CCDC28B también interactúa con Rictor. Por el contrario, no se detectó una interacción con Raptor (D) o con mTOR (E) en los mismos lisados celulares. Los pesos moleculares se indican en kDa.

A**B****C****D****E**

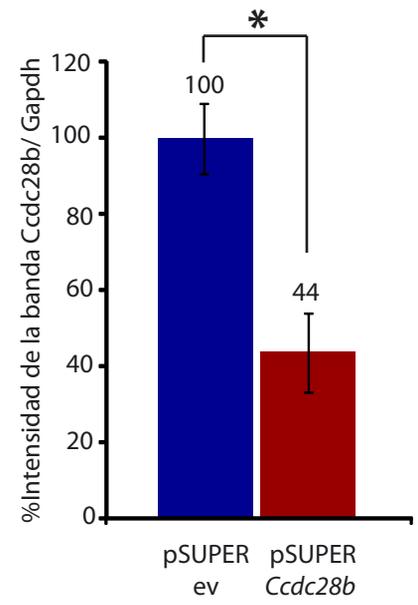
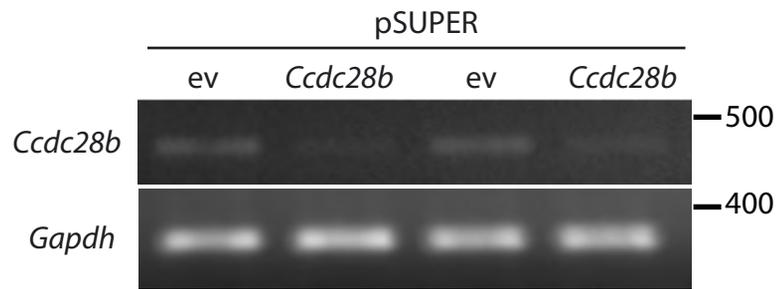
CCDC28B regula la actividad de mTORC2

Para profundizar en la interacción SIN1/CCDC28B y determinar las consecuencias fisiológicas de esa interacción evaluamos si la actividad del complejo mTOR2 se afecta cuando se modifican los niveles de CCDC28B. Una función de mTORC2 es fosforilar a la quinasa Akt en el residuo Serina 473, lo que determina su completa activación (Jacinto, 2006; Hresko & Mueckler, 2005). Es por esto, que los niveles de fosfo-Akt(S473) se evalúan habitualmente como reporteros de la función de mTORC2 (Oh & Jacinto, 2011). Trabajamos con un modelo de células en cultivo y con el modelo animal de embriones del pez cebra utilizado anteriormente. Para reducir los niveles de Ccdc28b en las células, transfectamos la línea celular murina NIH3T3, con un plásmido que codifica para un pequeño ARN de interferencia que se une al ARNm de Ccdc28b e induce su degradación (vectores pSUPER, OligoEngine). Lo primero que realizamos fue la verificación de la eficiencia de nuestro sistema pSUPER para reducir los niveles de Ccdc28b en esta línea celular. En la **Figura 31** se puede observar que 72hs luego de la transfección con este plásmido se reducen significativamente los niveles de Ccdc28b tanto a nivel del ARNm ($56 \pm 10\%$, **Figura 31A**) como de la proteína ($80 \pm 4\%$, $P < 0,01$, **Figura 31B**). La modificación de los niveles de Ccdc28b en el pez cebra se realizó utilizando el morfolino y el ARNm de ccdc28b sintetizado *in vitro*, cuyas eficiencias para modificar los niveles de ccdc28b lo demostramos previamente (**Figura 24A y 26**).

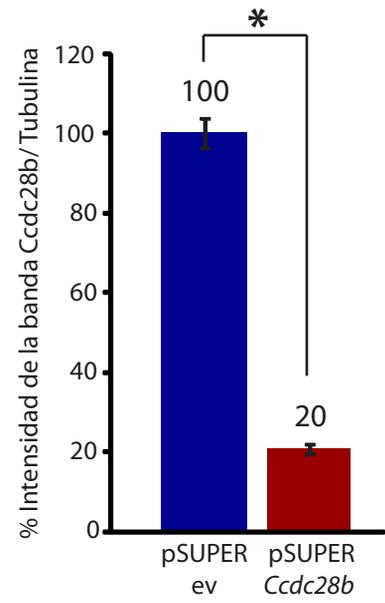
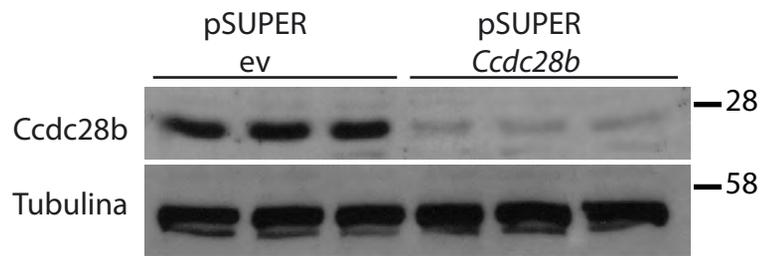
Figura 31_Funcionamiento del sistema pSUPER para reducir la expresión de *Ccdc28b* en células de mamíferos.

A) rt-PCR semi-cuantitativo que confirma la reducción de los niveles de *Ccdc28b* cuando se transfectan células NIH3T3 con el vector pSUPER *Ccdc28b*. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. B) La reducción también fue confirmada por medio de un *western blot*. Las gráficas muestran el porcentaje de la intensidad de la banda en comparación con los controles, normalizado sobre *Gapdh* o α -Tubulina. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Se indica el tamaño en pares de bases o en kDa.

A



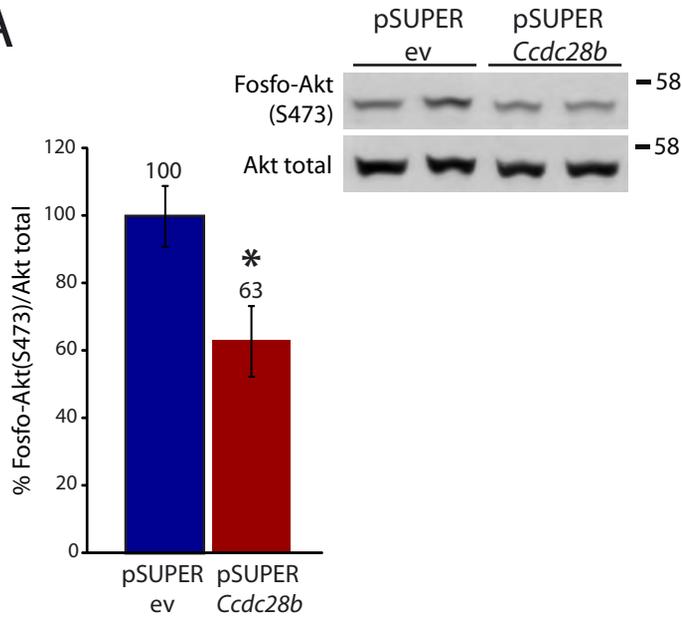
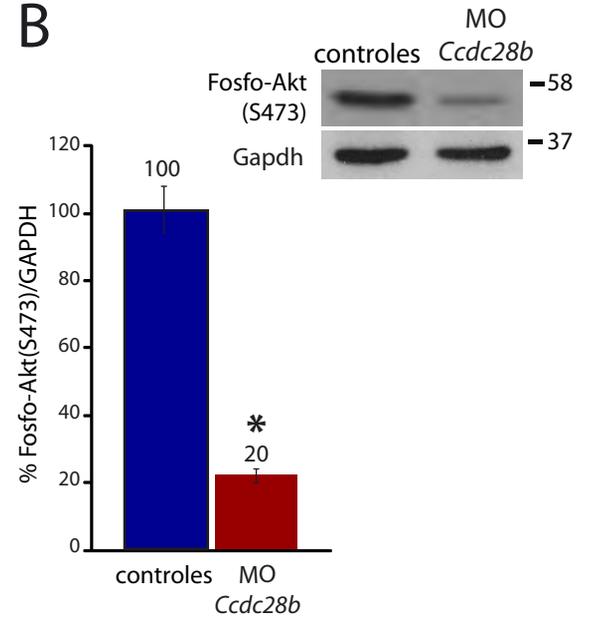
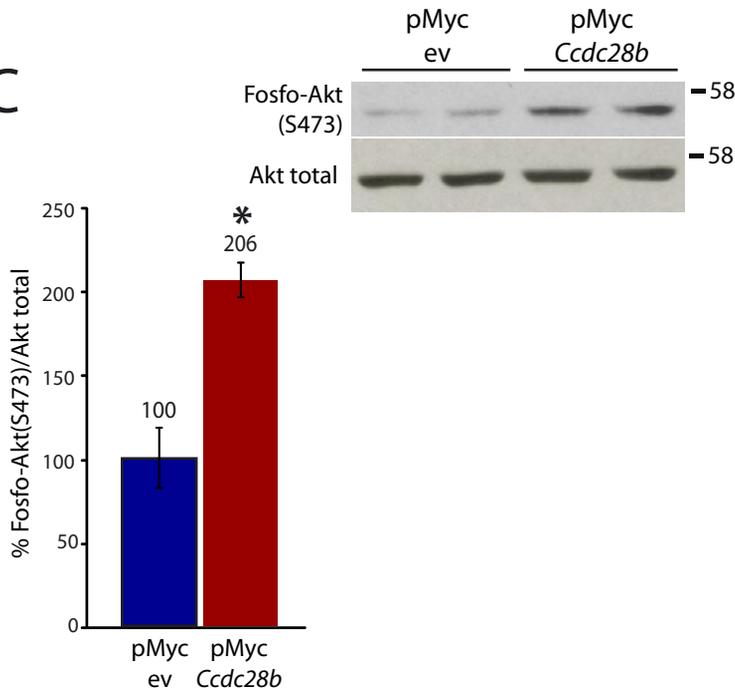
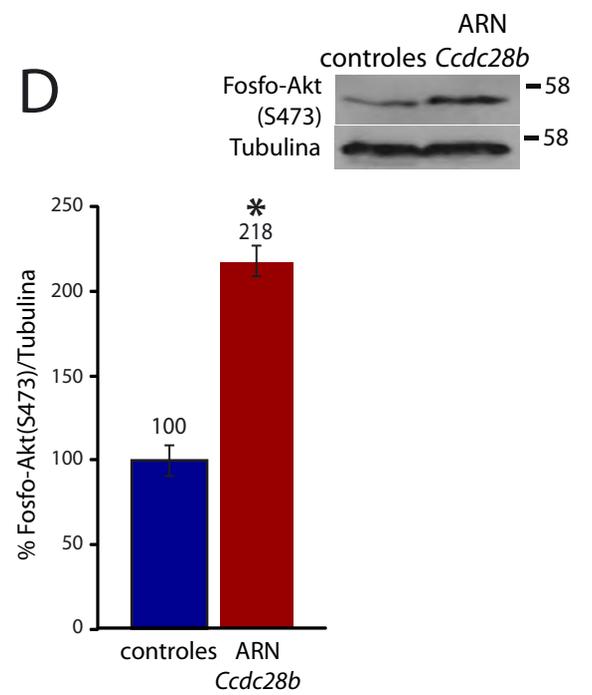
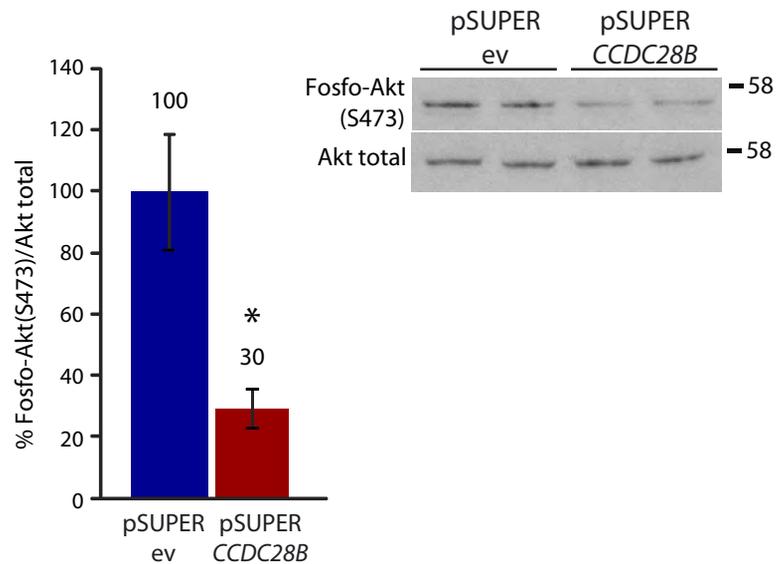
B



Cuando se disminuyeron los niveles de *ccdc28b* en las células NIH3T3 y medimos la relación de fosfo-Akt(S473) sobre el total de Akt, observamos una reducción significativa de un $37 \pm 11\%$ ($P < 0,01$; **Figura 32A**) comparado con los controles. A modo de control, analizamos y verificamos que la reducción en los niveles de fosfo-Akt(S473) al inhibir a CCDC28B también se observan cuando se utiliza otra línea celular, para lo cual utilizamos a la línea humana HeLa (**Figura 32E**). A continuación decidimos verificar si el efecto de CCDC28B sobre la actividad de mTORC2 se reproducía *in vivo*. Para esto, redujimos los niveles de *Ccdc28b* en los embriones del pez cebra utilizando el morfolino previamente caracterizado, y analizamos los niveles de fosfo-Akt(S473) a las 48 hpf. De manera similar, la reducción de *Ccdc28b* en el pez cebra también determinó una reducción marcada de los niveles de fosfo-Akt(S473) (~ 80% de reducción, $P < 0,01$; **Figura 32B**). Consistente con estos hallazgos, observamos un aumento de aproximadamente un 100% de los niveles de fosfo-Akt(S473) cuando sobre-expresamos a *Ccdc28b* tanto en las células en cultivo como en los embriones del pez cebra, por medio del vector pMyc-*Ccdc28b* o la inyección del ARNm de *ccdc28b*, respectivamente ($P < 0,01$; **Figura 32C y D**).

Figura 32_ Ccdc28b modula la actividad de mTORC2.

A-B) La reducción de los niveles de Ccdc28b tanto en células NIH3T3 (A) como en embriones de pez cebra (B) determina una reducción de la fosforilación de Akt en la S473, lo que indica una disminución de la actividad de mTORC2. Akt total o Gapdh fueron utilizados como controles de carga. C-D) La sobreexpresión de Ccdc28b en células (C) y en embriones de pez cebra (D) produjo un aumento de la actividad de mTORC2. Akt total y α -Tubulina fueron utilizados como controles de carga. E) La reducción de CCDC28B en células humanas (HeLa) también resultó en una reducción en la actividad de mTORC2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

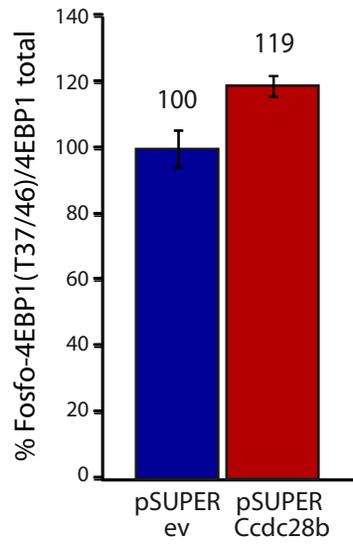
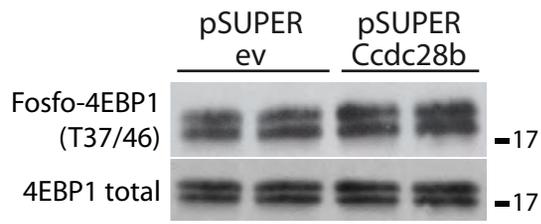
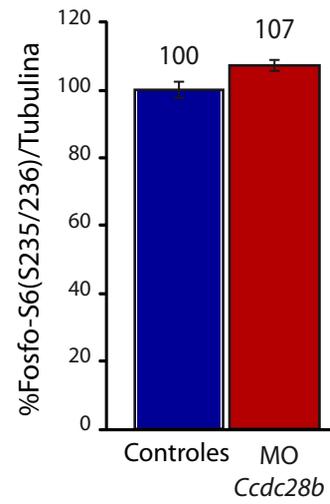
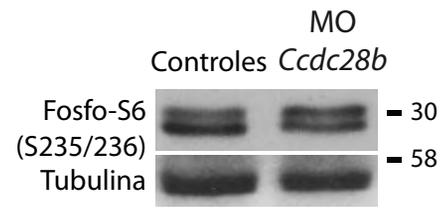
A**B****C****D****E**

A pesar de que previamente no observamos una asociación entre CCDC28B y Raptor (componente de mTORC1), igual evaluamos si la actividad del complejo mTOR1 variaba al reducir los niveles de *ccdc28b*. Para esto determinamos la actividad del complejo mTOR1 tanto en células en cultivo como en embriones del pez cebra midiendo los niveles de fosforilación de la proteína reguladora de la traducción 4E-BP1 en los residuos Treonina 37 y 46, y de la proteína ribosomal S6 en los residuos Serina 235 y 236 (Laplante & Sabatini, 2009). En ambos casos, cuando se inhibió la expresión de *ccdc28b*, observamos un leve incremento que no resultó estadísticamente significativo ($P < 0,01$; **Figura 33A y B**). Consideramos que ese aumento es indirecto y podría estar relacionado con la fuerte regulación cruzada que existe entre ambos complejos (Huang & Manning, 2009).

En suma, el conjunto de estos resultados nos permiten afirmar que CCDC28B actúa como un regulador positivo de la actividad de mTORC2 pero no de mTORC1.

Figura 33_ Los niveles de Ccdc28b no afectan la actividad de mTORC1.

A-B) La reducción de los niveles de Ccdc28b en células NIH3T3 (A) o en embriones de pez cebra (B) no afectó la actividad de mTORC1, medida a través de la fosforilación de 4EBP1 en la T37/46 o de S6 en la S235/236. Se utilizaron los niveles de 4EBP1 total y α -Tubulina como controles de carga respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

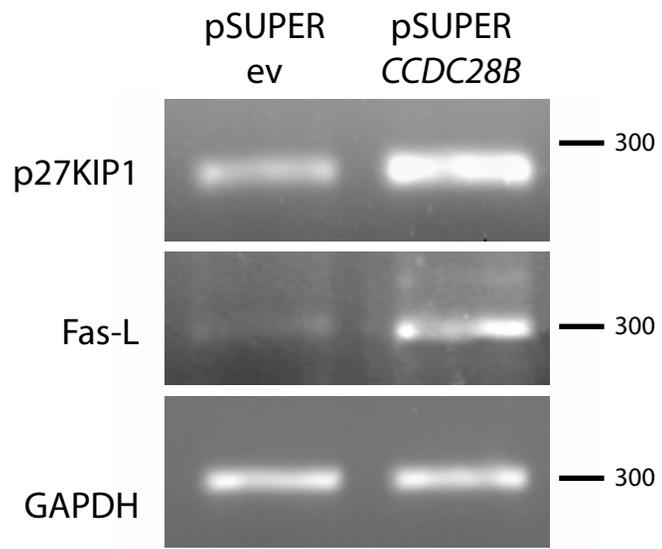
A**B**

Efectos de la función reguladora de CCDC28B sobre mTORC2

Posteriormente nos propusimos determinar si el cambio que produce CCDC28B sobre la actividad de mTORC2 tiene consecuencias sobre procesos celulares mediados por este complejo. Ha sido demostrado que una de las moléculas que Akt regula negativamente es el factor de transcripción FOXO3a (del inglés *Forkhead box 3a*). Cuando Akt es activada (fosforilada en S473), fosforila a FOXO3a en los residuos Treonina 24, Serina 256 y 319, lo que determina que FOXO3a se asocie con la proteína 14-3-3 y sea retenida en el citoplasma (Arden, 2004). Cuando Akt no está activada, FOXO3a es desfosforilada y translocada al núcleo, donde induce la expresión del factor de inhibición del ciclo celular p27KIP1 (también llamada CDKN1B) y del factor pro-apoptótico Fas-L (Zhang, 2011). Debido a esta información evaluamos si los niveles de expresión de estos factores se modifican al inhibir la expresión de CCDC28B. Para esto, transfectamos células con el plásmido pSUPER-CCDC28B y por medio de una rt-PCR analizamos los niveles del ARNm de p27KIP1 y Fas-L. Como se observa en la **Figura 34**, determinamos que la inhibición de CCDC28B determina un aumento de la expresión de p27KIP1 y Fas-L, como consecuencia de la reducción de la actividad de mTORC2 y Akt.

Figura 34_ La reducción de los niveles de CCDC28B determina cambios en los niveles de *p27KIP1* y *Fas-L*.

Células HeLa fueron transfectadas con el vector pSUPER CCDC28B y se evaluaron los niveles de los ARNm de *p27KIP1* y *Fas-L* por rt-PCR semi-cuantitativo. La reducción de CCDC28B determinó un aumento de la expresión de ambos genes. Los niveles de *GAPDH* fueron considerados para el control de la cantidad de ADN copia utilizada. El tamaño de los productos amplificados corresponde a pares de bases. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5.



La proteína p27KIP1 pertenece a la familia Cip/Kip de las proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas. Controla la progresión del ciclo celular en la transición G1-S, por medio de unirse e impedir la activación de los complejos ciclina E/Cdk2 o ciclina D/Cdk4, deteniendo a las células en la fase G1 (Polyak, 1994; Toyoshima & Hunter, 1994). El ligando Fas (Fas-L) es una proteína que pertenece a la familia de factores de necrosis tumoral (TNF), la cual cuando se une a su receptor (Fas) en la membrana plasmática, activa la vía de las caspasas y desencadena la muerte celular por apoptosis (Wallach, 1999; Danial & Korsmeyer, 2004).

Por lo tanto, nos planteamos estudiar la participación de CCDC28B en la regulación del ciclo celular y determinar si el aumento de p27KIP1 y Fas-L observado, tiene consecuencias directas sobre la progresión del ciclo celular. Para esto, transfectamos células con los vectores pSUPER ev o pSUPER CCDC28B y realizamos un ensayo utilizando una molécula intercalante del ADN (Ioduro de propidio, IP) para posteriormente separar, por medio de citometría de flujo, a las células según su contenido de ADN en las distintas etapas del ciclo celular. La inhibición de CCDC28B determinó un aumento significativo de las células en apoptosis, pasando de $9,2 \pm 1,7\%$ en los controles a $14,1 \pm 0,9\%$ en pSUPER CCDC28B ($P < 0,01$, **Figura 35**). A pesar de que observamos una tendencia a una reducción en la fracción de células en G0/G1 al inhibir a CCDC28B, ésta no fue estadísticamente diferente con respecto al control. Tampoco detectamos un cambio en el porcentaje de células en fase S. Esto podría deberse a que la técnica no sea lo suficientemente sensible para poder detectar pequeñas variaciones. Debido a esto, decidimos analizar con una técnica más sensible y específica si la inhibición de CCDC28B provoca un cambio en la tasa de proliferación. Para determinar esto, transfectamos células de la línea HeLa con el oligonucleótido de ARN de CCDC28B e incubamos las células con un nucleósido modificado (EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine) el cual se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo (Click-iT Invitrogen). Por medio de una posterior reacción química y uso de citometría de flujo es posible determinar el porcentaje de células que incorporaron EdU, lo que representa el porcentaje de células en proliferación. Utilizando esta metodología pudimos determinar que la inhibición de la expresión de CCDC28B determina una reducción del porcentaje de células en proliferación (EdU positivas), pasando de un $39 \pm 0,6\%$ a un $34 \pm 0,3\%$ ($P < 0,01$; **Figura 36**). En suma, el conjunto de estos resultados apoyan

una relación funcional entre CCDC28B y mTORC2 lo que se refleja en alteraciones de la fisiología celular.

Figura 35_Relación entre CCDC28B y la regulación del ciclo celular.

Análisis por tinción con ioduro de propidio (IP) y citometría de flujo de los perfiles de ciclo celular al inhibir la expresión de CCDC28B. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la población de células en las fases G₀/G₁, S o G₂. Sí se observó un aumento de las células apoptóticas al inhibir la expresión de CCDC28B. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar.

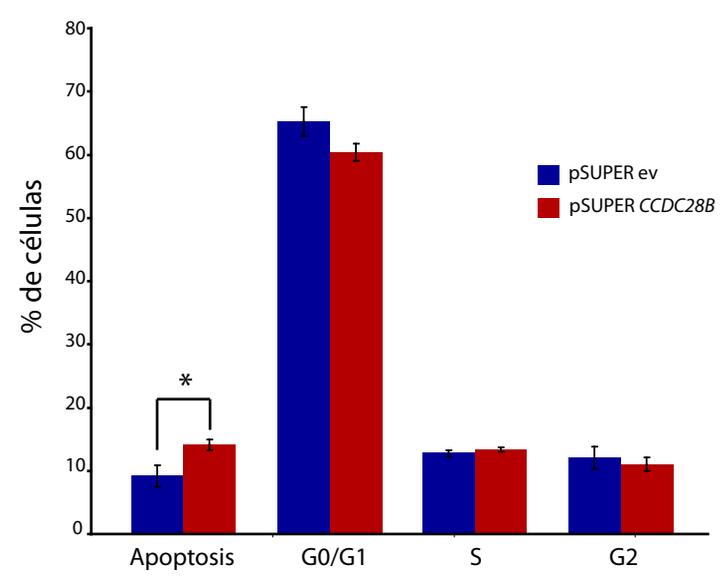
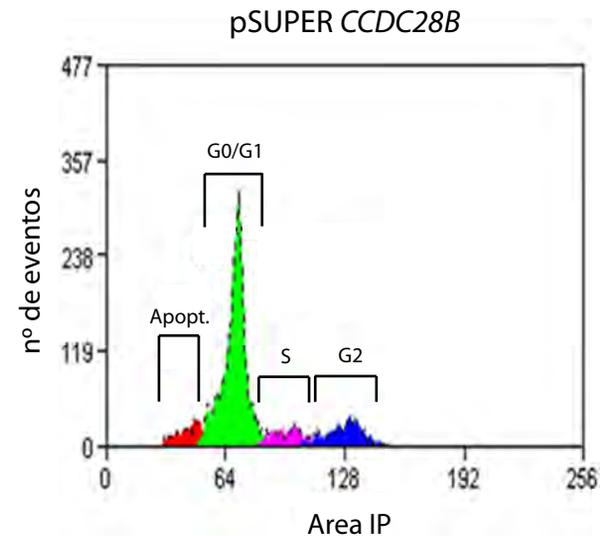
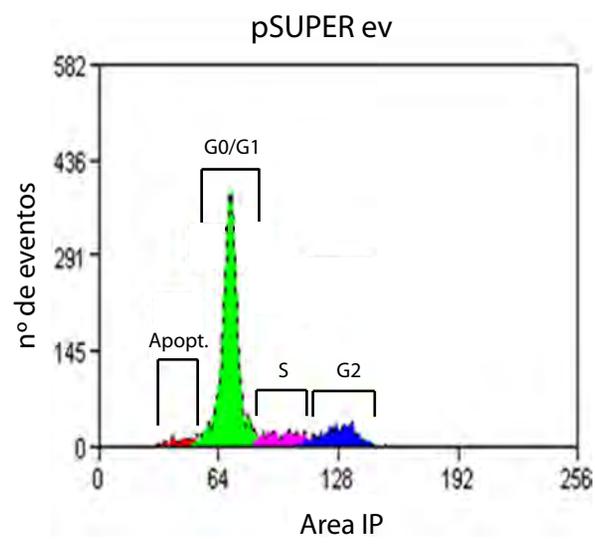
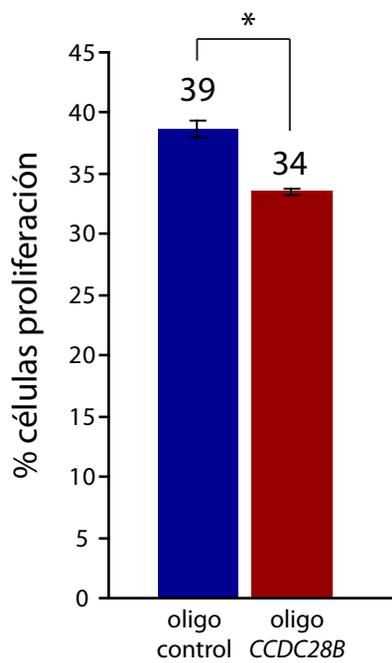
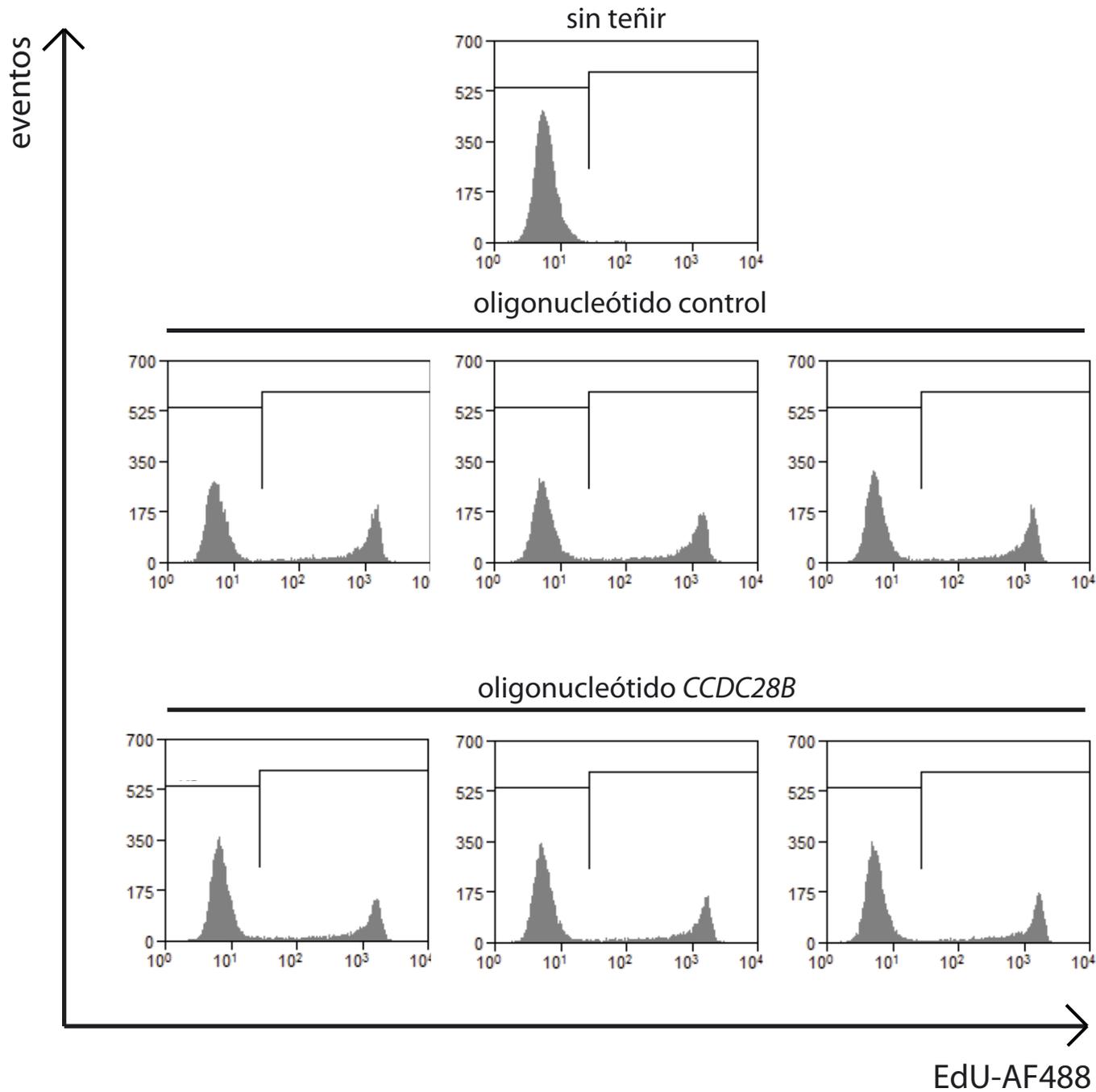


Figura 36_ Análisis de la relación entre CCDC28B y la proliferación celular.

La inhibición de los niveles de CCDC28B determina una reducción en el número de células en proliferación, medida por la incorporación del nucleósido modificado EdU-AF488. Se presentan los gráficos del análisis por citometría de flujo y la cuantificación de las células EdU positivas en cada condición. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar.



Mecanismo de regulación de CCDC28B sobre mTORC2

Niveles de expresión de componentes mTORC

Como paso siguiente, nos propusimos determinar el mecanismo por el cual CCDC28B regula la función de mTORC2. Una posibilidad que nos planteamos es que CCDC28B regule los niveles de expresión de alguno de los componentes de mTORC2, lo que podría explicar los cambios observados en la actividad de este complejo. Para abordar esta posibilidad, inhibimos la expresión de CCDC28B en cultivos celulares (pSUPER en línea HeLa) y analizamos si los niveles de SIN1, Rictor, Raptor y mTOR cambiaban, por medio de *Western blot* utilizando anticuerpos comerciales específicos. No observamos cambios significativos en los niveles de expresión de SIN1, Rictor y Raptor (**Figura 37A-C**) pero interesantemente, sí detectamos una reducción de un $40 \pm 3\%$ en los niveles de mTOR ($P < 0,01$; **Figura 37D**).

Esa observación nos llevó a evaluar cómo es que CCDC28B regula los niveles de mTOR. La primer posibilidad que estudiamos fue si la regulación era a nivel de la expresión del gen de mTOR, o sea a nivel de la transcripción. Para esto, comparamos por medio de Real Time-PCR (RT-PCR) los niveles del ARN mensajero de mTOR de células donde se inhibió la expresión de CCDC28B y células controles. Como se observa en la **Figura 38A**, no observamos diferencias significativas a nivel de la expresión del ARN mensajero de mTOR. Este resultado, nos indicó que la regulación podría estar ocurriendo ya sea a nivel de la traducción o a nivel de la degradación de la proteína por medio del proteasoma. Para testear esta última posibilidad, realizamos un ensayo en donde inhibimos la actividad del proteasoma por medio del inhibidor MG132. Nuestro supuesto se basaba en que si un descenso en los niveles de CCDC28B determina que mTOR sea degradada, la inhibición del proteasoma debería restablecer los niveles normales de mTOR. En la **Figura 38B** se puede observar que la inhibición de CCDC28B determinó una reducción de mTOR de $48 \pm 4\%$, la cual fue revertida a los niveles controles (pSUPER ev) por el tratamiento con MG132 ($111 \pm 11\%$, $P < 0,01$). No observamos una diferencia significativa entre los controles (pSUPER ev) con y sin inhibidor. Estos resultados indican que CCDC28B podría participar a nivel postraducciona en la regulación de los niveles de mTOR.

Figura 37_Análisis de los niveles de los componentes de mTORC1 y 2 al inhibir la expresión de *Ccdc28b*.

Se transfectaron células HeLa y se analizaron los niveles de Sin1(A), Rictor (B), Raptor (C) y mTOR (D) por *western blot*. Únicamente se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de mTOR ($P < 0,01$). Las barras corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

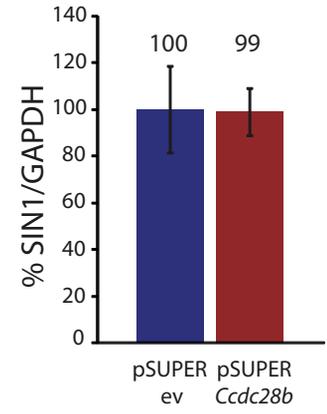
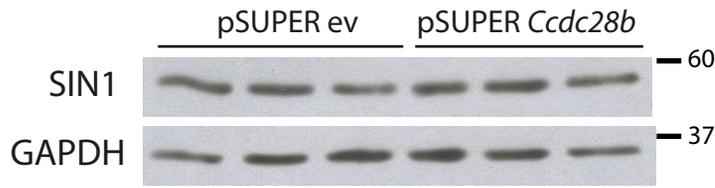
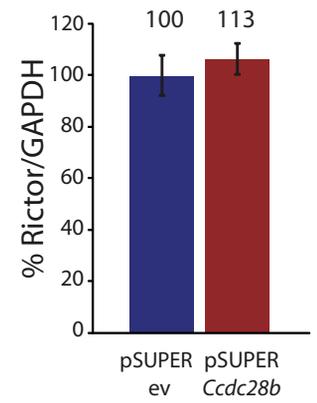
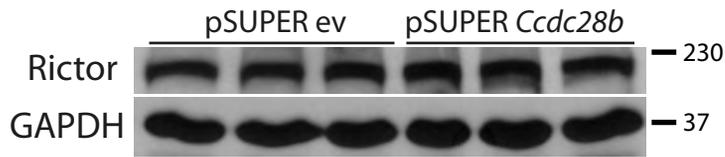
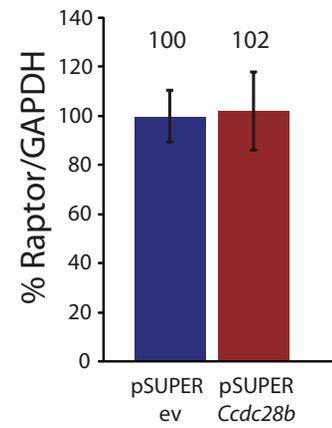
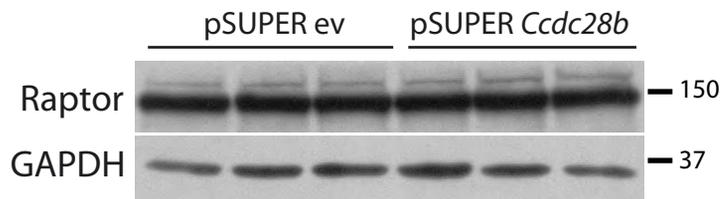
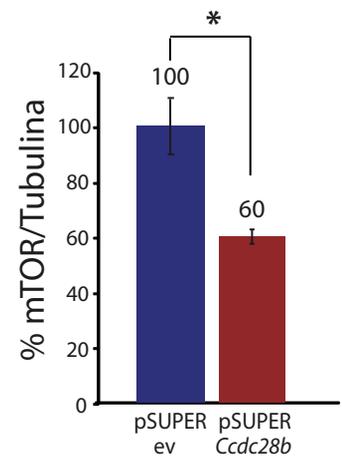
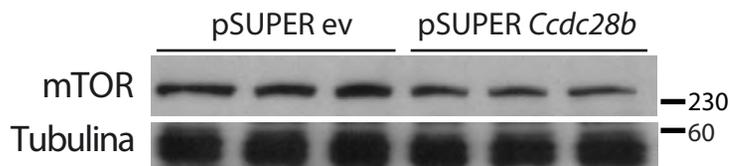
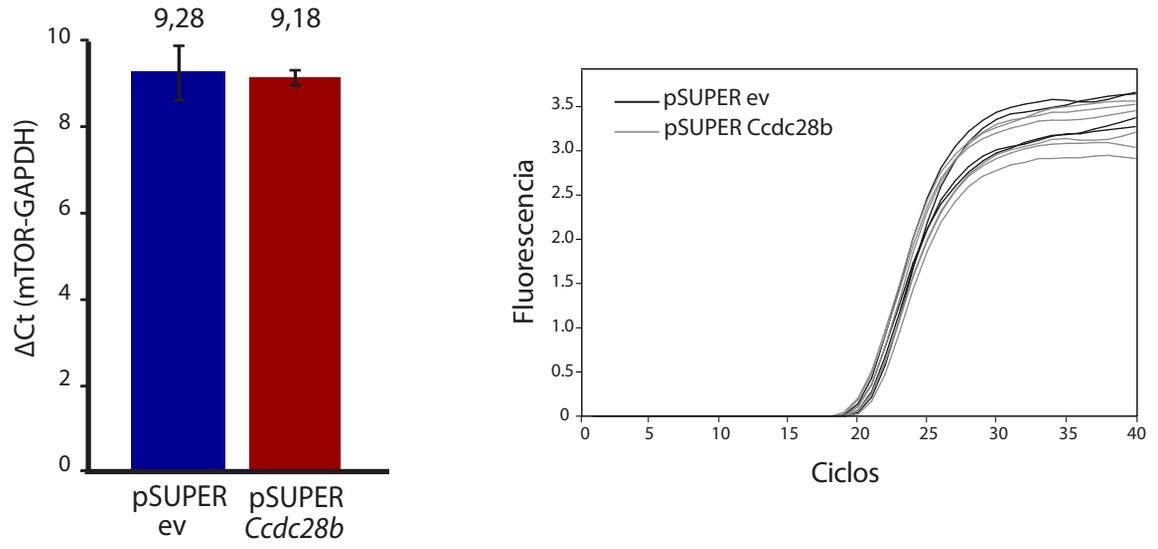
A**B****C****D**

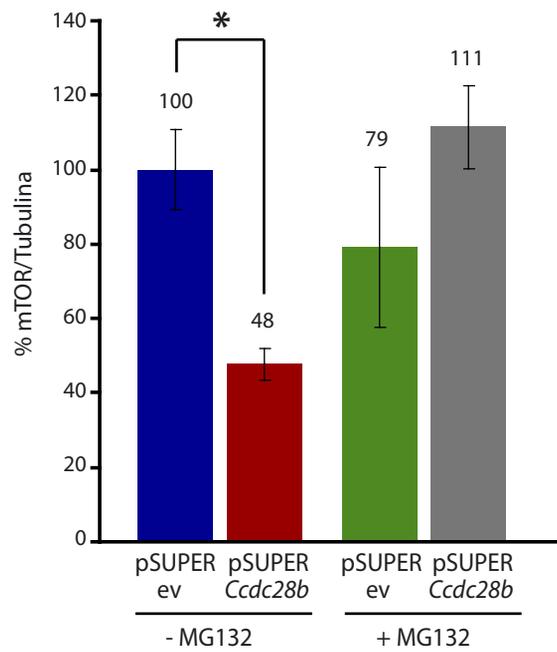
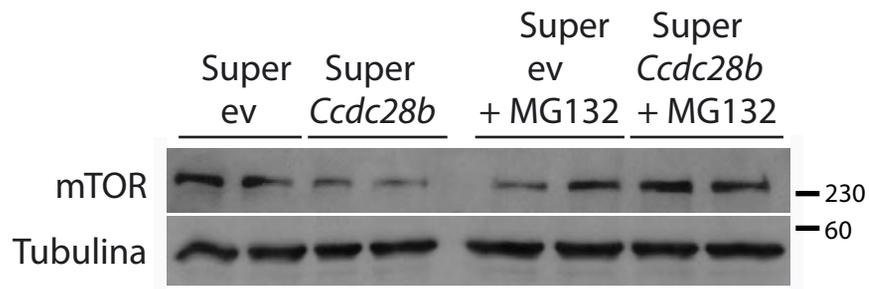
Figura 38_ CCDC28B afecta los niveles de mTOR.

A) Análisis de los niveles del ARNm de mTOR por medio de Real time PCR (RT-PCR) en células transfectadas con pSUPER *CCDC28B*. No se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. **B)** El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132, restauró los niveles de mTOR. Se utilizó un anticuerpo anti- α -Tubulina como control de carga. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

A



B



Caracterización de la interacción CCDC28B con mTOR *in vivo*.

Como siguiente etapa, decidimos explorar *in vivo* la relación entre CCDC28B y mTOR. Para esto, decidimos utilizar el modelo de pez cebra para evaluar la interacción entre estos dos genes. La idea que nos planteamos fue que de ser fisiológicamente relevante la reducción de los niveles de mTOR que observamos cuando inhibimos a CCDC28B, una inhibición de mTOR debería exacerbar los fenotipos que se observan en los morfantes de *ccdc28b*. Para realizar estos experimentos, diseñamos y trabajamos con un morfolino que bloquea el procesamiento del ARN mensajero de mTOR (morfolino *splice*). Detectamos un único gen ortólogo en el pez cebra y diseñamos un morfolino que bloquea el sitio aceptor de *splice* entre el exón 3 y el intrón 3. La unión de este MO determina una retención del intrón 3 (2060 pb) lo cual modifica el marco abierto de lectura e introduce un codón de terminación prematuro 94 pb dentro del intrón 3. De traducirse este ARNm, codificará para una proteína trunca que corresponde solo a los primeros 109 aa de un total de 2515 aa que contiene la proteína salvaje.

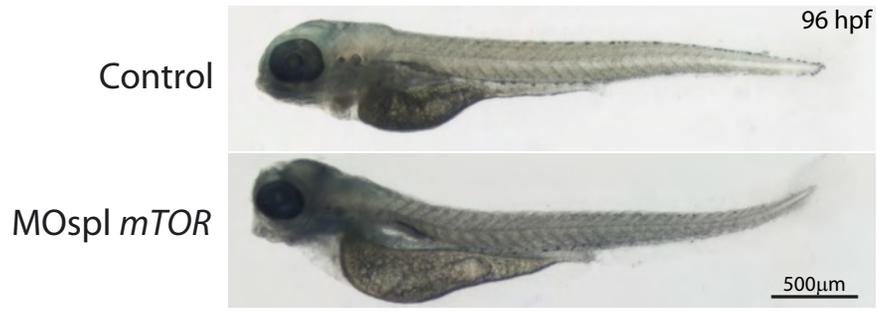
Lo primero que evaluamos fue el fenotipo de los embriones morfantes de *mtor* y la funcionalidad del morfolino, para luego determinar la mejor dosis en términos de relación fenotipo/viabilidad. Observamos que la reducción de *mtor* determinó en los embriones morfantes un fenotipo leve, el cual se caracterizó por presentar una leve curvatura del cuerpo y defectos craneofaciales (**Figura 39A**). Este fenotipo es consistente con lo reportado en otro trabajo, donde utilizando un morfolino *splice* diferente, observaron un fenotipo leve y muy similar (Makky, 2007). Para poner a punto la mejor dosis de morfolino, inyectamos 2, 3 y 6 ng, y verificamos por medio de una rt-PCR la efectividad del morfolino para alterar el procesamiento del ARNm de *mtor*. Primero utilizamos un juego de *primers* que hibridan en el exón 3 y exón 4, y comparamos los niveles de amplificación de esta banda (322 pb) con los controles. De funcionar el MO esta banda debería de disminuir a medida que incrementamos la dosis de MO inyectado, ya que el intrón 3 contiene 2060 pb impidiendo la amplificación a partir del ARNm no procesado. Observamos que con una dosis de 2 ng aún es posible amplificar a partir del ARNm “salvaje” y que con 3 y 6 ng ya no se observa una banda (**Figura 39B**). Debido a este resultado, descartamos la menor de las dosis y luego considerando los cálculos del porcentaje de animales con fenotipo y viables, determinamos que la mejor dosis para

trabajar era la de 6 ng. Posteriormente, utilizando un juego de *primers* que hibridan en el exón 3 e intrón 3 confirmamos el funcionamiento correcto del morfolino con esta dosis, ya que observamos la amplificación de la banda específica de 236 pb solo en los animales inyectados (**Figura 39C**). Debido a que contábamos con un anticuerpo que reconocía a la proteína mtor del pez cebra, realizamos un Western blot para verificar su disminución por la acción del morfolino. Como se observa en la **Figura 39D**, una dosis de 6 ng determina una reducción a un $43 \pm 12\%$ de los niveles de mtor y ésta fue la que elegimos para trabajar ($P < 0,01$).

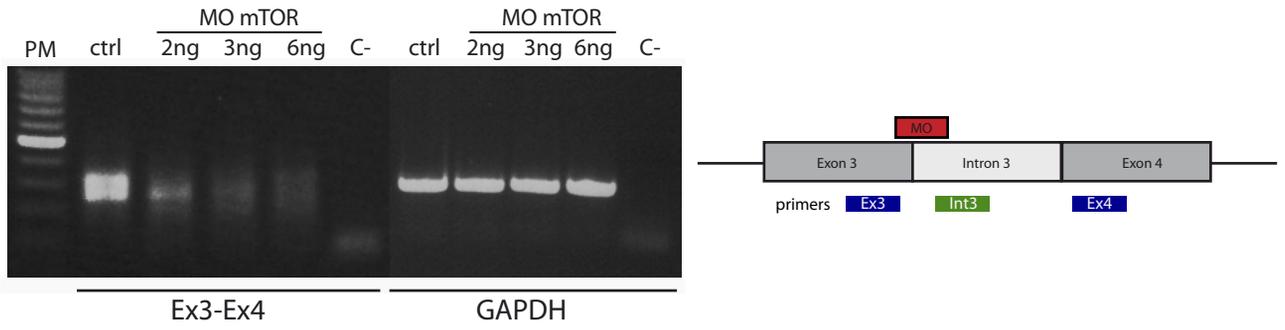
Figura 39_ Caracterización del morfolino splice de *mtor*.

A) Fenotipo de los morfantes de *mtor* en los cuales se observa una leve curvatura del cuerpo y alteraciones craneofaciales. B) Análisis por medio de rt-PCR de la funcionalidad del morfolino para alterar el procesamiento del ARNm de *mtor*. Se utilizó un juego de *primers* para el exón3/exón4 y se determinó la desaparición de la banda (322 pb) con dosis ≥ 3 ng. C) Análisis por medio de rt-PCR de la alteración en el procesamiento del ARNm de *mtor* por la inyección de 6 ng del morfolino. Utilizando un juego de *primers* exón3/intrón3 se observó la retención del intrón 3. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. D) Análisis por *Western blot* de la reducción de los niveles de mTor al incrementar la dosis de morfolino inyectada. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

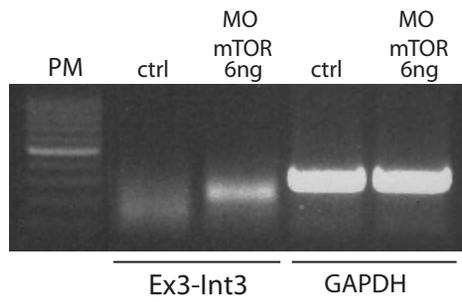
A



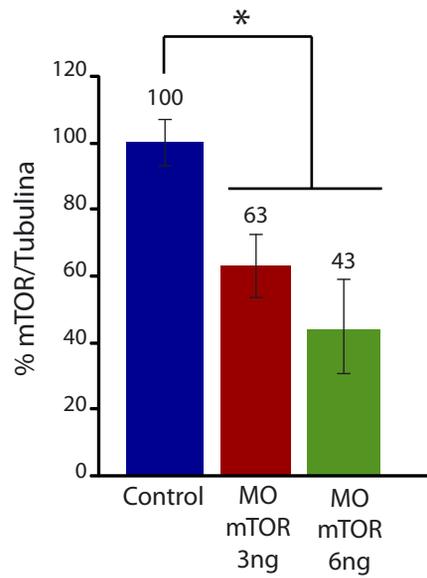
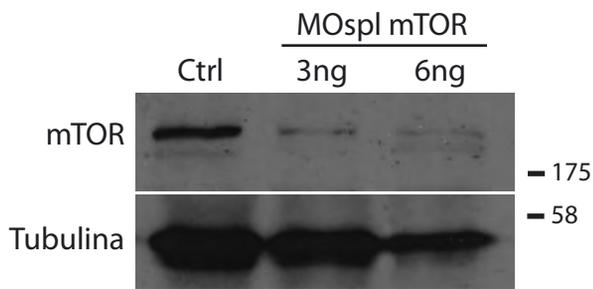
B



C



D



Para evaluar la relación funcional entre *ccdc28b* y *mtor* decidimos realizar un ensayo de interacción genética. Este tipo de ensayo se basa en la hipótesis de que la interrupción parcial de una determinada vía genera un fondo genéticamente sensibilizado, en el cual mutaciones en más de un componente de la vía genera una sinergia que produce un fenotipo que no podría ser explicado por un simple efecto aditivo. Para este ensayo, trabajamos con dosis subóptimas de cada uno de los morfolinós, las cuales individualmente producen un número muy bajo de embriones con fenotipo, y siendo ese fenotipo a su vez leve. De ocurrir interacción entre *ccdc28b* y *mtor*, esperábamos que el número y la severidad del fenotipo aumenten de manera significativa en los embriones co-inyectados con ambos morfolinós. En nuestro caso utilizamos dosis subóptimas de 2 y 3 ng de los morfolinós de *ccdc28b* y *mtor*, respectivamente. Para mantener constante la cantidad de MO inyectado en todas las condiciones, igualamos el total de 5 ng con el morfolino control. La inyección individual del *ccdc28b*MO y *mtor*MO a dosis subóptimas, determinaron un 11% (n=6/53) y 21% (n=12/57) de embriones con fenotipo, respectivamente. En cambio, la inyección de ambos morfolinós juntos, determinó un 76% (n=47/62) de embriones con fenotipo, que a su vez fue claramente más severo (**Figura 40A**, panel inferior). Para poder cuantificar esta interacción, decidimos medir el ángulo del cartílago ceratohial ya que en ambos morfantes se observan alteraciones craneofaciales. La inyección de subdosis de cada uno de los MO resultó en un incremento en $\sim 5^\circ$ del ángulo, siendo de $34^\circ \pm 1,5^\circ$ en los *ccdc28b*MO y de $35^\circ \pm 2,9^\circ$ en los *mtor*MO, comparado con los $30^\circ \pm 1,5^\circ$ de los controles. La coinyección de los dos morfolinós incrementó significativamente el ángulo en unos $\sim 40^\circ$ ($69^\circ \pm 4,6^\circ$, $P < 0,01$; **Figura 40B**; n=20 por condición). Estos resultados nos indicaron que existe una interacción entre ambos genes y que parte de los fenotipos observados en los morfantes de *mtor* podrían deberse a la regulación por *Ccdc28b*.

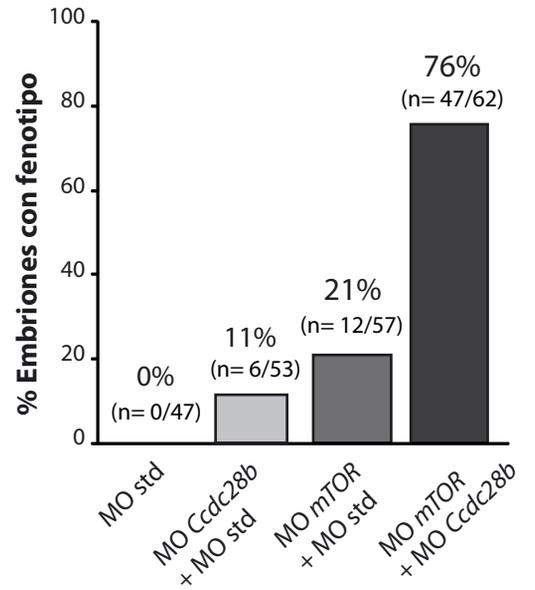
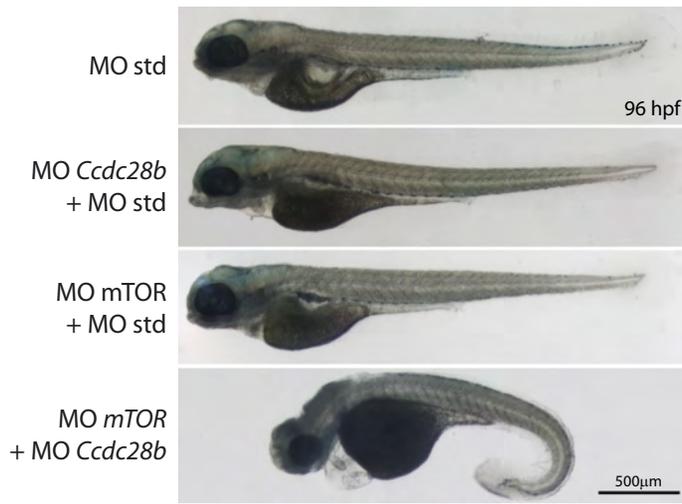
Para probar esa posibilidad un experimento que se suele realizar es el rescate del fenotipo de uno de los morfantes, con el ARNm del otro gen analizado. En nuestro caso, decidimos analizar si la sobreexpresión de *ccdc28b* podía rescatar el fenotipo de los morfantes de *mtor*, ya que a pesar de haberlo intentado, no nos fue posible sintetizar *in vitro* el ARNm completo de *mtor* por tener un tamaño de 7,7 Kb. Para esto trabajamos con la dosis completa del morfolino de *mtor* (6 ng) y buscamos rescatar el fenotipo con

el ARNm de *ccdc28b*. Centramos el análisis en la medición del ángulo del cartílago ceratohial, por ser un parámetro fácil de cuantificar. La inyección de 6 ng del MO de *mtor* resultó en un incremento del ángulo del cartílago ceratohial, pasando de $31^\circ \pm 1,5^\circ$ en los controles a $51^\circ \pm 4,6^\circ$ en los embriones morfantes ($P < 0,01$; **Figura 40C**). La inyección del ARNm de *ccdc28b* por sí solo no provocó un cambio significativo en el ángulo ($37^\circ \pm 1,6^\circ$), mientras que la sobreexpresión de *ccdc28b* en los morfantes de *mtor*, rescató el fenotipo craneofacial ($38^\circ \pm 5,2^\circ$; **Figura 40C, panel inferior**; $n=20$ por condición). Por lo tanto estos ensayos nos indicaron que existe una relación funcional entre mTOR y *Ccdc28b*.

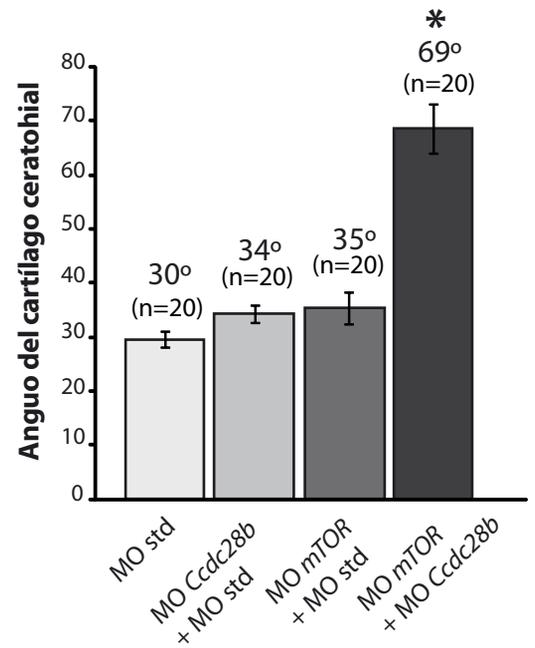
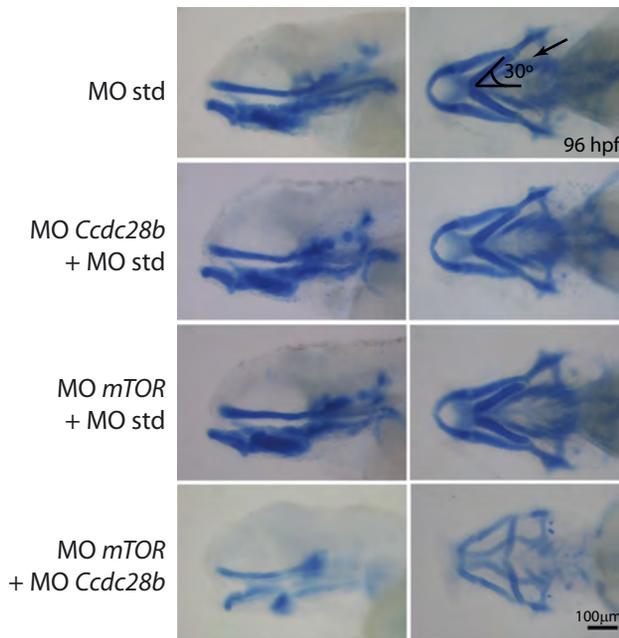
Figura 40_ *Ccdc28b* y *mtor* interactúan genéticamente en el pez cebra.

A) Análisis del fenotipo en un ensayo de interacción genética. La inyección de dosis sub-óptimas de los morfolidos *ccdc28b* (2 ng) y *mtor* (3 ng) determinaron un 11% (n=6/53) y 21% (n=12/57) de embriones con un fenotipo leve respectivamente, mientras que la co-inyección de ambos morfolidos resultó en un 76% (n=47/62) de embriones con fenotipo severo. B) Cuantificación de la interacción genética por medio de la tinción con Azul Alcian y la medida del ángulo del cartílago ceratohial (indicado con una flecha en la figura superior). Solamente la co-inyección de las dosis sub-óptimas de los morfolidos *ccdc28b* y *mtor* determinó un incremento significativo del ángulo del cartílago ceratohial. C) La alteración del ángulo del cartílago ceratohial presente en los morfantes de *mtor* (dosis completa, 6 ng) fue rescatada por la co-inyección con el ARNm de *ccdc28b*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes, se analizaron 20 embriones de cada condición por inyección.

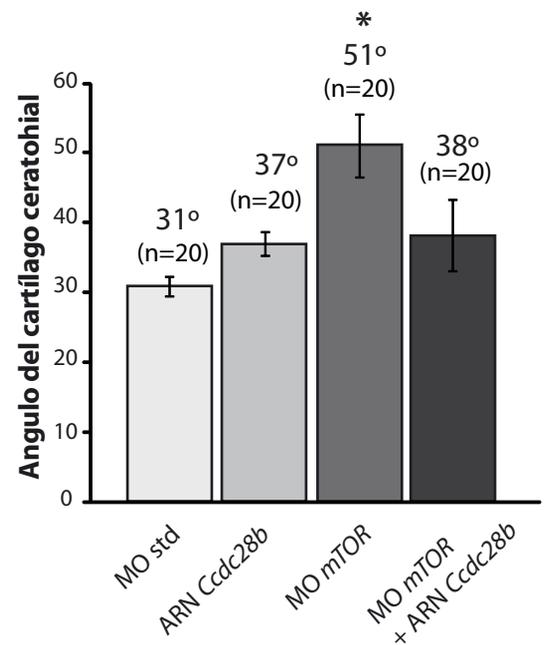
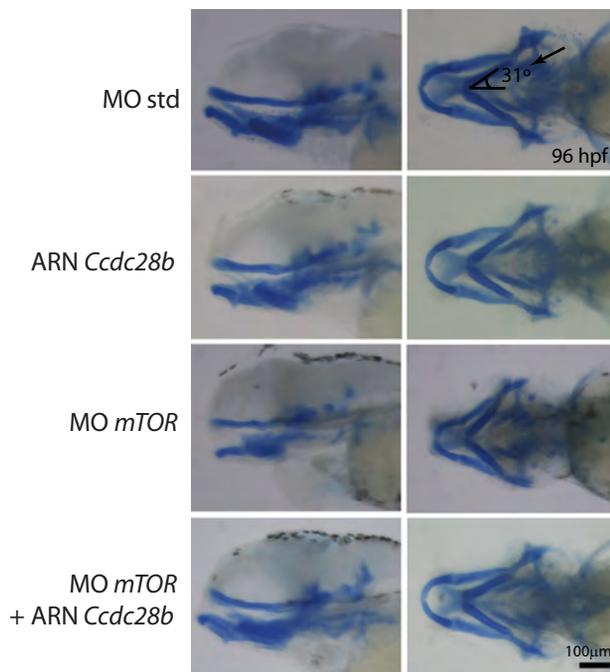
A



B



C

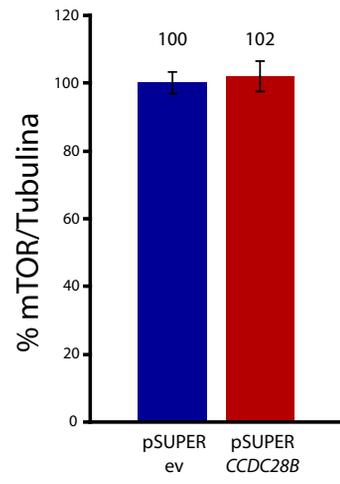
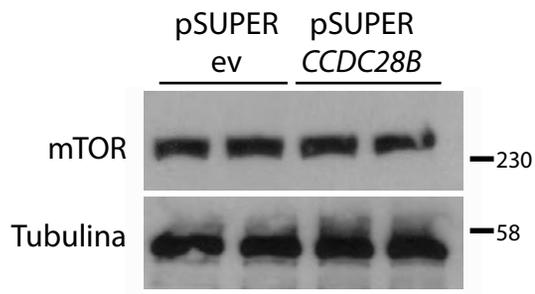


Los resultados que obtuvimos en las secciones anteriores nos estaban indicando que el mecanismo de regulación de CCDC28B sobre mTORC2 podría deberse a la modulación de los niveles de mTOR y que existía una regulación entre *ccdc28b* y *mtor*. Sin embargo, esta posibilidad no nos parecía del todo clara y nos presentaba dificultades de interpretación al tratar de entender el mecanismo. Como mencionamos con anterioridad, mTOR es una proteína central tanto para mTORC2 como para mTORC1. Por lo tanto, nuestros resultados no nos permitían explicar por qué la reducción de los niveles de mTOR no se reflejaba también en cambios en la actividad del complejo mTOR1. Pensábamos que la reducción de la cantidad de mTOR disponible, debería repercutir sobre la actividad de ambos complejos, a no ser que existieran cambios postraduccionales específicos de mTOR cuando forma parte de uno de los complejos, o que la afinidad de mTOR por uno u otro complejo fuera diferente. Sin embargo, surgió en ese momento otro resultado que nos indicó que quizás el mecanismo de regulación de CCDC28B sobre mTORC2 podía ocurrir de una manera diferente al que nosotros estábamos planteando en ese momento. Observamos que cuando cambiamos de línea celular (HEK293) e inhibimos los niveles de CCDC28B, dejamos de observar una reducción en los niveles de mTOR (**Figura 41**). Este fue un resultado claro, que como se verá más adelante, se repitió en varios de los experimentos realizados posteriormente. Entonces, por estos motivos buscamos posibilidades alternativas que también expliquen los resultados anteriores, y así poder entender el mecanismo por el cual CCDC28B regula específicamente solo al complejo mTOR2.

Una idea que decidimos abordar fue la posibilidad de que CCDC28B estuviese influyendo en el ensamblado o en la estabilidad del complejo mTOR2. En este escenario, la desestabilización del complejo llevaría a una disminución en la actividad de mTORC2 y podría explicar la reducción de los niveles de mTOR como una consecuencia indirecta de este defecto, dado que mTOR estaría siendo degradada por no estar ensamblada en alguno de los complejos. Esta idea estaba basada en dos líneas de evidencia: i) reportes previos donde demostraron que cuando mTOR no forma parte de uno de los complejos, es inestable y se observa una reducción en sus niveles (Kim, 2003; Bentzinger, 2008; Kaizuka, 2010), y ii) el rol reportado para SIN/Rictor, con quien CCDC28B interactúa, en el ensamblado y mantenimiento de mTORC2.

Figura 41_ La reducción de CCDC28B en células HEK293 no afecta los niveles de mTOR.

Análisis por *Western blot* de los niveles de mTOR al inhibir la expresión de CCDC28B. No se observó una diferencia estadísticamente diferente con respecto al control ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

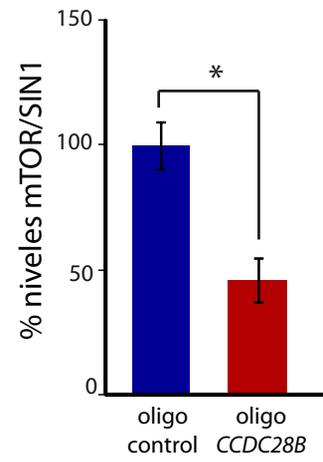
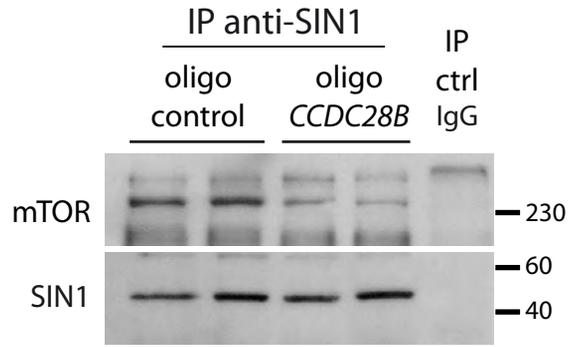
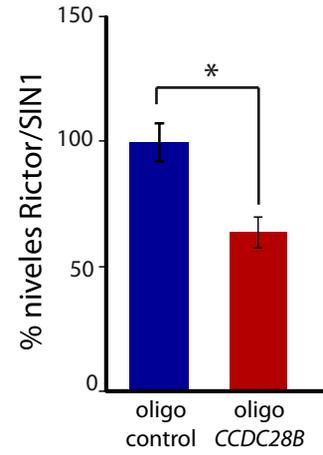
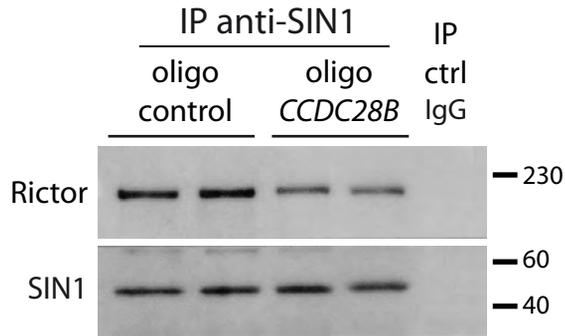
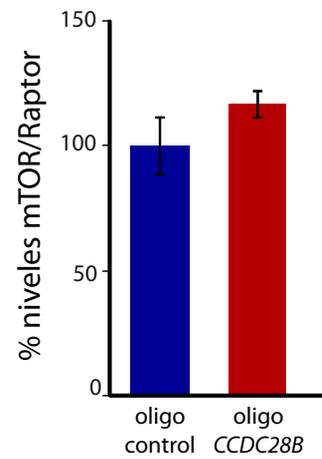
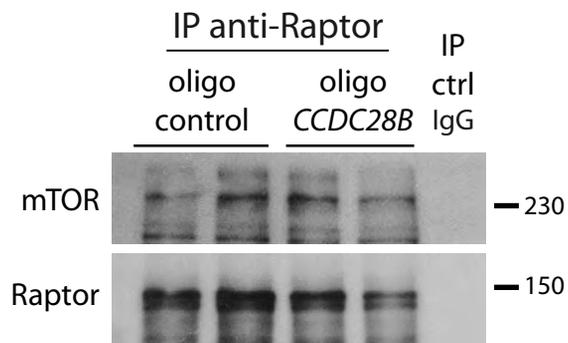
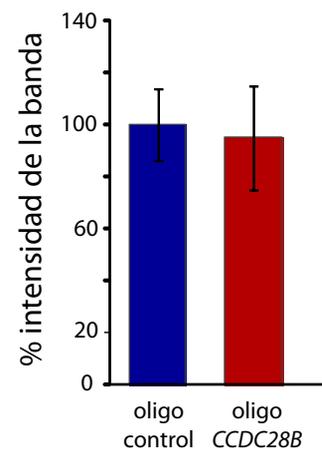
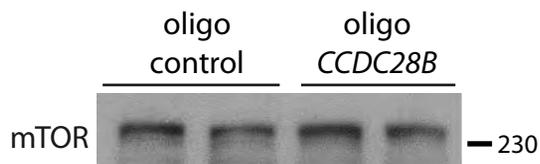


¿CCDC28B regula el ensamblado o estabilidad del complejo mTOR2?

Para testear la posibilidad de que CCDC28B sea necesaria para el ensamblado o estabilidad del complejo mTOR2, transfectamos células de la línea humana HEK293 con los oligonucleótidos de ARN de interferencia previamente descritos y realizamos Co-IPs donde analizamos las interacciones SIN1-mTOR y SIN1-Rictor. Por medio de esta técnica observamos efectivamente que la reducción de los niveles de CCDC28B provoca una reducción en la cantidad de SIN1 que se encuentra asociada tanto con mTOR, como con Rictor ($P < 0,01$; **Figura 42A y B**). En contraste, la interacción Raptor-mTOR no mostró una diferencia significativa entre las células transfectadas con el oligonucleótido de ARN de CCDC28B y el oligonucleótido control (**Figura 42C**). Como mencionamos más arriba, y a diferencia de nuestros experimentos en células HeLa, en esta línea celular (Hek293) no observamos cambios en los niveles de mTOR al inhibir a CCDC28B (**Figura 42D**). Esta aparente discrepancia entre líneas, que posiblemente se deba a diferencias en la actividad basal del proteasoma, evidencia que la bajada en los niveles de mTOR es muy probablemente una consecuencia indirecta de la acción de CCDC28B sobre mTORC2. Por lo tanto, pudimos determinar que la inhibición de CCDC28B determina una reducción en los niveles del complejo mTOR2 ensamblado, un hallazgo que es coherente con la disminución que observamos en su actividad y con la disminución (por degradación) de los niveles de mTOR que observamos en las células HeLa.

Figura 42_ CCDC28B participa en el ensamblado y/o estabilidad de mTORC2.

La reducción de los niveles de CCDC28B determina una reducción en la cantidad de SIN1 que se encuentra asociada a mTOR (A) y a Rictor (B). Se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-SIN1 en lisados de células HEK293. C) No se observaron cambios en la interacción entre Raptor y mTOR, utilizando un anticuerpo anti-Raptor. D) En los lisados celulares utilizados no se observaron cambios en los niveles de mTOR al reducir los niveles de CCDC28B. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

A**B****C****D**

¿Cómo regula CCDC28B el ensamblado del complejo mTOR2?

Una vez que obtuvimos esos resultados, decidimos profundizar en el mecanismo por el cual CCDC28B regula el ensamblado del complejo mTOR2. Se ha propuesto que mTORC2 ejerce su función principalmente a nivel de la membrana plasmática, donde fosforila a sus diversas moléculas blanco, como son Akt, SGK1, PKC α (Berchtold & Walther, 2009; Zoncu, 2011). Una posibilidad por la cual CCDC28B podría regular la disponibilidad de complejo mTOR2 ensamblado, es regular la localización de alguno de los componentes de este complejo en el sitio donde se ensambla. Para testear esta posibilidad, decidimos centrar nuestro análisis en SIN1, porque habíamos determinado que interactúa directamente con CCDC28B y porque disponíamos de un anticuerpo apropiado para realizar este ensayo. Lo primero que determinamos fue el patrón de localización de SIN1 en la línea celular HeLa. Observamos que la señal de SIN1 es de aspecto punteado y es dinámica, ya que en un mismo preparado observamos células que presentaron señal únicamente en el citoplasma (con enriquecimiento en la zona perinuclear) y células con señal en el citoplasma y con una clara señal dentro del compartimento nuclear (**Figura 43A**). Esta localización que observamos de SIN1, coincide con lo que ha sido reportado previamente (Wang & Roberts, 2004; Schroder, 2005; Rosner & Hengstschläger, 2008). Para determinar si CCDC28B influye en la localización de SIN1, inhibimos la expresión de CCDC28B en células en cultivo por medio de los oligonucleótidos de ARN y detectamos por inmunocitoquímica la localización de SIN1. Se registraron 10 campos al azar de cada condición por medio de microscopía confocal y cuantificamos el número de células en cada campo que presentaron únicamente señal citoplasmática o señal citoplasmática y nuclear. Determinamos que en ausencia de CCDC28B ocurre un aumento significativo del número de células que presentan señal de SIN1 dentro del compartimento nuclear, pasando de un $42 \pm 4\%$ a un $77 \pm 11\%$ cuando se inhibe a CCDC28B ($P < 0,01$; **Figura 43B**). Estos resultados indican que CCDC28B podría estar participando en el mecanismo de translocación de SIN1 entre el compartimento nuclear y el citoplasma y que este rol podría ser importante para entender cómo CCDC28B regula el ensamblado del complejo mTOR2 y consecuentemente su actividad.

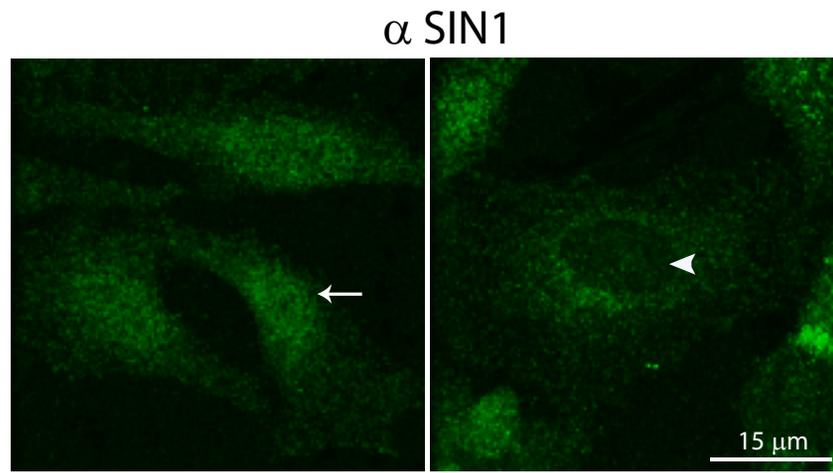
Hasta esta etapa, habíamos podido determinar que CCDC28B es una proteína que está relacionada con la biología de las cilias y que influye en el ensamblado y actividad del

complejo mTOR2, quizás a través de regular la localización de SIN1. Aún nos faltaba poder determinar si existía una conexión entre estos procesos. En ese momento de la tesis, aún no había surgido ningún trabajo que demostrara una relación clara y directa entre las cilias y la vía de mTOR, y menos aún una participación de mTORC2 en la biología de las cilias. Fue por esto que en las siguientes etapas decidimos enfocarnos en ese punto y así poder determinar si el rol de CCDC28B sobre la ciliogénesis es por medio de regular la actividad de mTORC2.

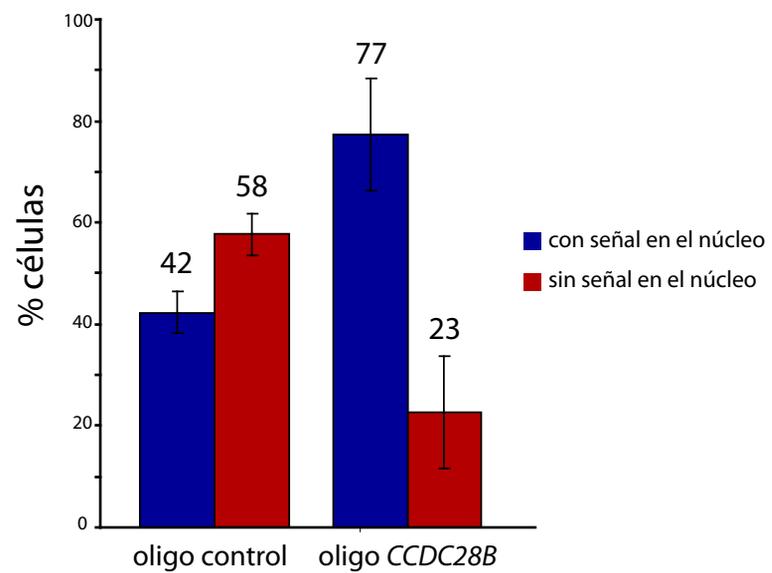
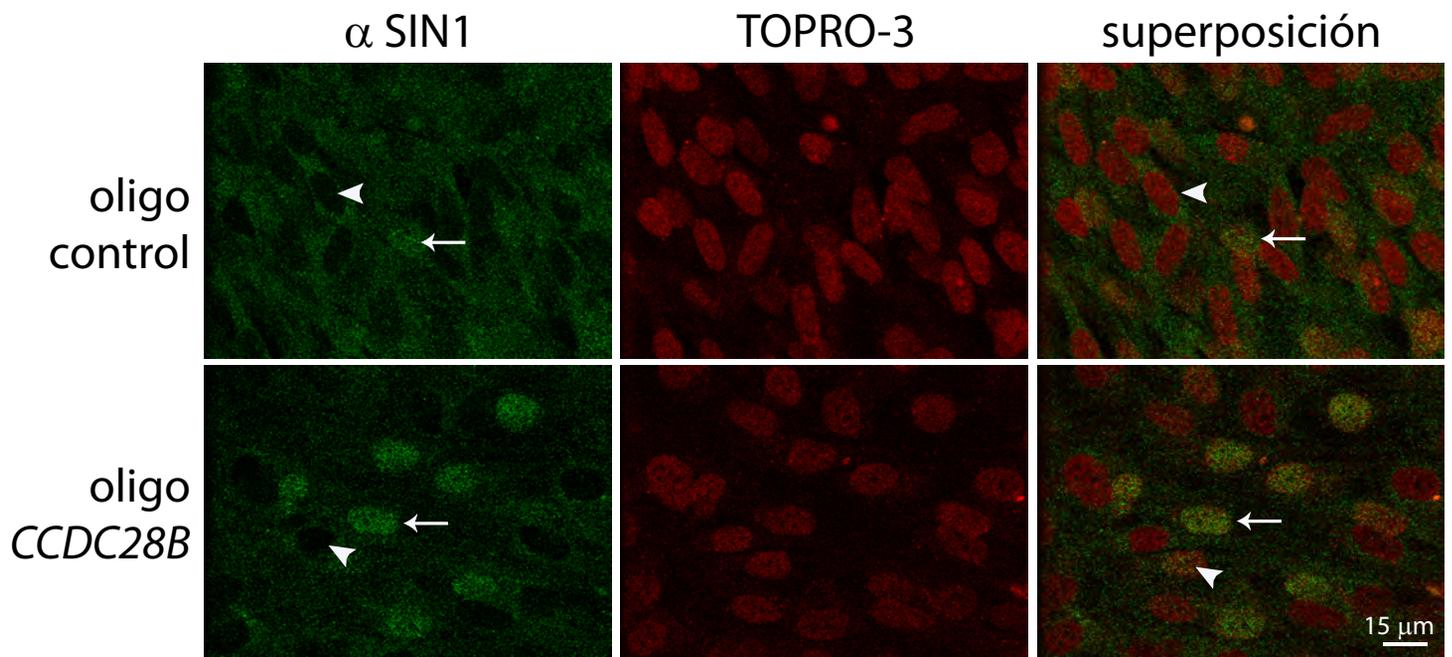
Figura 43_ CCDC28B regula la localización de SIN1.

A) Inmunocitoquímica en células HeLa utilizando un anticuerpo anti-SIN1 (verde). La señal fue de aspecto punteado y varió entre células de un mismo cultivo. En algunas células se observó una señal enriquecida en la zona nuclear, mientras que otras células presentaron señal concentrada en la zona perinuclear. B) La reducción de los niveles de CCDC28B determinó un aumento en el porcentaje de células con señal dentro del núcleo. Los núcleos fueron visualizados por la tinción con TOPRO-3 (rojo). Las imágenes corresponden a la superposición de los planos focales que incluyen al núcleo. Las flechas indican células sin señal dentro del núcleo, las cabezas de flechas indican células con señal dentro del núcleo. Las barras de error corresponden al error estándar.

A



B



Parte D_Vinculando CCDC28B/SIN1 y ciliogénesis

¿Afecta CCDC28B la ciliogénesis a través de su interacción con SIN1 y la regulación de mTORC2?

Para poder determinar si existía una conexión entre la interacción CCDC28B/SIN1 y el proceso de ciliogénesis, la primera aproximación que realizamos fue una serie de experimentos en los cuales utilizamos a la droga rapamicina. Como ya fue descrito en la Introducción, la rapamicina es una droga que se une e inhibe, de manera específica, la actividad de mTORC1. Originariamente se describió que la rapamicina no era capaz de inhibir a mTORC2, pero estudios posteriores demostraron que a dosis y tiempos mayores también es capaz de inhibir la actividad de este otro complejo (Sarbasov, 2006). Cabe mencionar que, aún al día de hoy, no se conocen inhibidores específicos para mTORC2, de modo que cuando se utilizan altas concentraciones de rapamicina, se debe tener presente que se está inhibiendo la actividad de mTORC2 pero también la actividad de mTORC1. Fue así, que nos propusimos utilizar rapamicina en una dosis que afecta a mTORC2 (y a mTORC1) y determinar si se exacerbaba el efecto que veíamos de CCDC28B sobre la actividad de mTORC2 y sobre la ciliogénesis. Es importante recalcar que al momento de realizar estos experimentos aún no se había demostrado que existe una interacción entre mTORC1 y las cilias primarias, de modo que cuando decidimos utilizar rapamicina no esperábamos sumar al resultado esperado el efecto de inhibir a mTORC1.

Experimentos con rapamicina

Lo primero que nos propusimos determinar fue si la rapamicina exacerbaba el efecto que veíamos sobre la actividad de mTORC2 cuando se inhibía la expresión de *Ccdc28b*.

Para esto, decidimos estudiar si los fenotipos asociados al funcionamiento de las cilias que se observan en los embriones morfantes de *ccdc28b* guardan una relación con la disminución de la actividad de mTORC2. De ser así, esperábamos que la rapamicina exacerbe esos fenotipos. Para probar esto, primero definimos la dosis de rapamicina que debíamos de administrarle a los embriones de pez cebra para inhibir la actividad de los complejos mTOR 1 y 2. Primero probamos una dosis de 300 nM que ha sido reportado

que inhibe a mTORC2 en células en cultivo (Foster & Toschi, 2009). Observamos que esa dosis administrada a los embriones de pez cebra es suficiente para inhibir la actividad de mTORC1 (reducción $58 \pm 2\%$) pero no la de mTORC2 ($P < 0,01$; **Figura 44A y B**). Debido a esto es que probamos dosis mayores y determinamos que una dosis de $5 \mu\text{M}$ administrada en el agua durante 48 hs, era suficiente para reducir en un $38 \pm 8\%$ la actividad de mTORC2 en los embriones ($P < 0,01$; **Figura 44C y D**). Posteriormente, utilizamos esas dosis y analizamos si el fenotipo de los morfantes de *ccdc28b* se exacerbaba en presencia de rapamicina. Para esto incubamos a los embriones controles y a los morfantes de *ccdc28b* con 300 nM o $5 \mu\text{M}$ de rapamicina y analizamos qué sucedía con el fenotipo global (largo del cuerpo y cabeza) y en más detalle qué sucedía con el fenotipo craneofacial previamente caracterizado en los morfantes *Ccdc28b* (ángulo del cartílago ceratohial). Observamos que ambas dosis de rapamicina tuvieron un efecto en el largo del cuerpo y la cabeza, tanto en los embriones controles como en los morfantes ($P < 0,01$; **Figura 45A**). Dado que la reducción de los niveles de *Ccdc28b* también resulta en embriones más cortos, y para poder descartar un simple efecto aditivo, comparamos los largos en porcentajes teniendo como referencia ya sea el largo en animales control (gráficos de la izquierda) o las medidas características de los morfantes *ccdc28b* (gráficos de la derecha). Proporcionalmente, observamos que el efecto de la rapamicina fue mayor en los morfantes. Por ejemplo, a nivel del largo del cuerpo $5 \mu\text{M}$ de rapamicina determinó una reducción de un $15 \pm 3\%$ en los morfantes, mientras que en los controles fue de un $9 \pm 1\%$ ($P < 0,01$). Con esta misma dosis, cuando se analiza el largo de la cabeza, los morfantes presentaron una reducción de un $21 \pm 2\%$ mientras que en los controles fue de un $12 \pm 1\%$. Si bien los resultados del tratamiento con 300 nM de rapamicina indican que ambos fenotipos pueden deberse al menos en parte a una reducción en la actividad de mTORC1, en el caso del fenotipo de la cabeza, la administración de $5 \mu\text{M}$ de rapamicina en los morfantes *ccdc28b* exacerbó el fenotipo sugiriendo que parte del mismo pudiera deberse a un defecto en mTORC2. Para testear esta posibilidad, cuantificamos el efecto que tiene la rapamicina sobre el desarrollo craneofacial, a través de medir el ángulo del cartílago ceratohial (**Figura 45B**). Observamos que $5 \mu\text{M}$ de rapamicina en los controles determina un incremento de $16 \pm 2^\circ$ en el ángulo, mientras que en los morfantes el incremento fue de $40 \pm 3^\circ$. Estos resultados nos indicaban que parte de los fenotipos observados en los morfantes de *ccdc28b* podrían ser consecuencia de alterar la actividad de mTORC2.

Figura 44_Determinación de las dosis de Rapamicina en embriones de pez cebra para inhibir la actividad de mTORC1 y mTORC2.

A) Análisis por medio de *western blot* donde se evidencia una reducción de la actividad de mTORC1 (niveles de Fosfo-S6-S235/236) cuando se administró 100 o 300 nM de Rapamicina. B) Administrando esas mismas dosis no se observaron cambios en la actividad de mTORC2 (Fosfo-AktS473). C) La administración de dosis mayores (600 nM y 5 μ M) afectaron significativamente la actividad de mTORC1. D) La administración de 5 μ M de Rapamicina afectó la función de mTORC2. Interesantemente, el tratamiento con 600 nM de Rapamicina resultó en un incremento de la actividad de mTORC2, posiblemente debido a la fuerte regulación cruzada entre los dos complejos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.

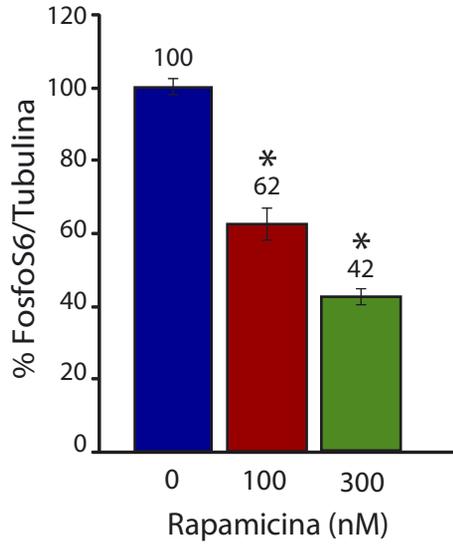
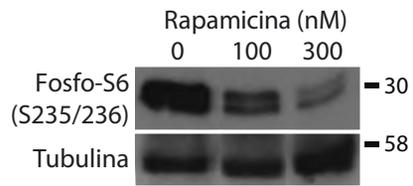
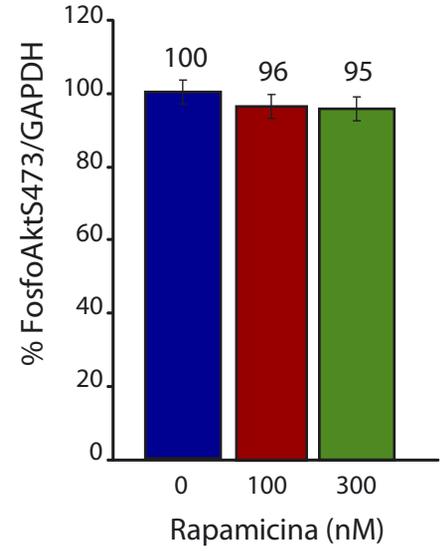
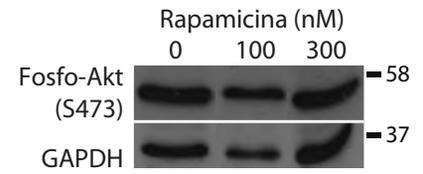
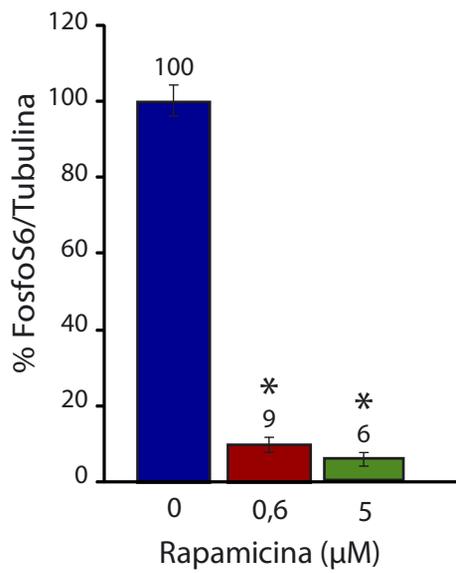
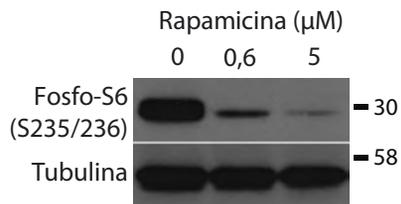
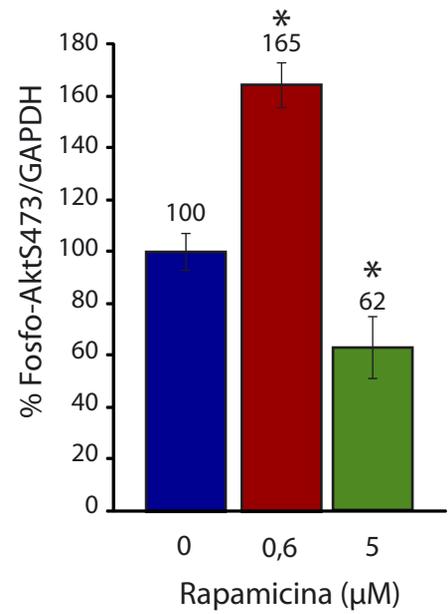
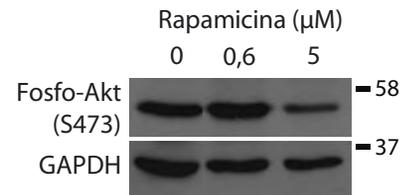
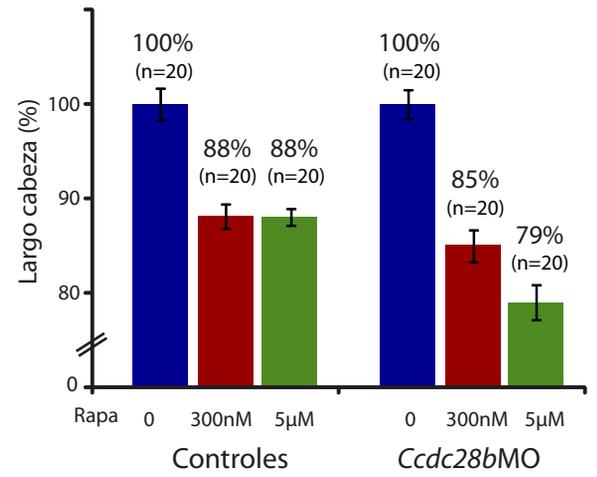
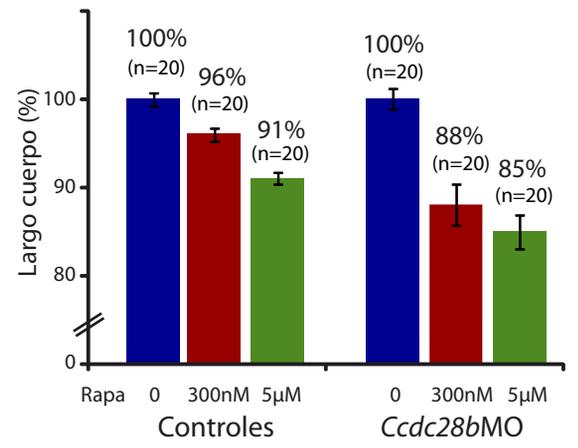
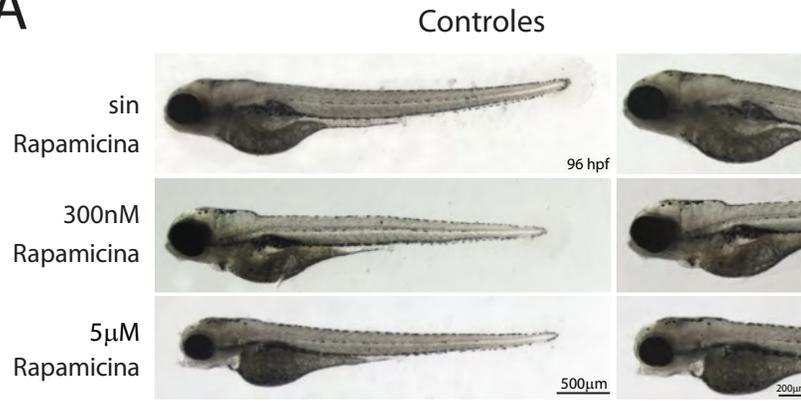
A**B****C****D**

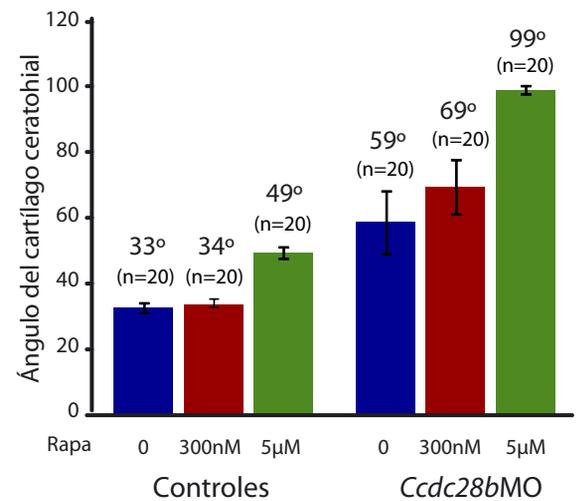
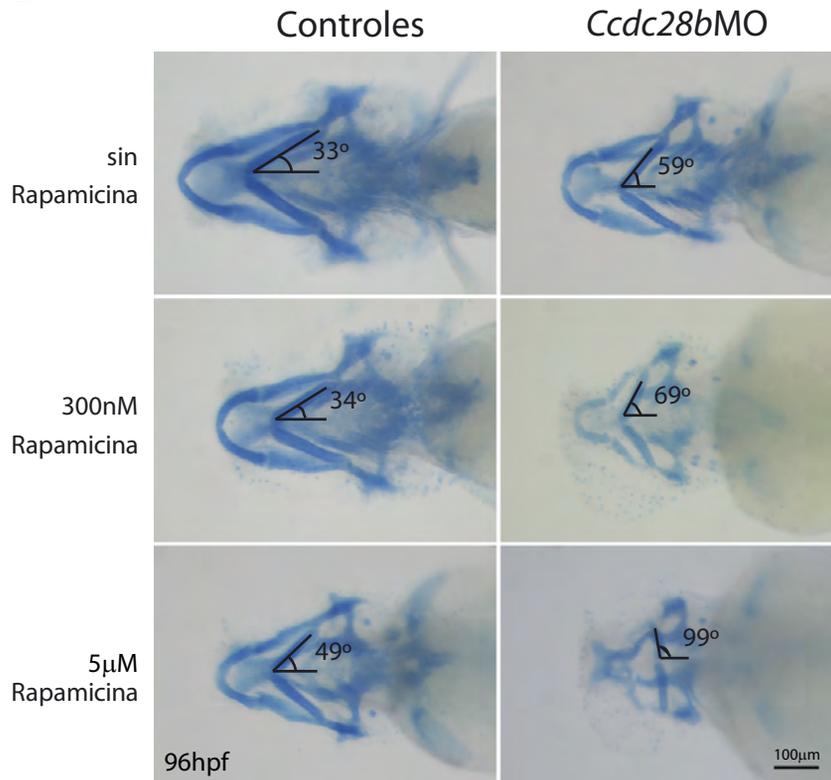
Figura 45_ La Rapamicina exagera el fenotipo de los morfantes de *ccdc28b*.

A) Análisis del efecto de la administración de Rapamicina sobre el largo del cuerpo y la cabeza. La administración de 300 nM y 5 μ M de Rapamicina afectó el largo del cuerpo y la cabeza, tanto en los embriones controles como en los morfantes. Sin embargo el efecto de la Rapamicina fue mayor en los morfantes de *ccdc28b*. B) Análisis del efecto de la administración de Rapamicina sobre el desarrollo craneofacial, medido a través del ángulo del cartílago ceratohial. El tratamiento con 5 μ M de Rapamicina determinó en los morfantes de *ccdc28b* un incremento de $40^\circ \pm 3^\circ$ en el ángulo del cartílago ceratohial. La misma dosis tuvo un efecto menor en los embriones controles ($16 \pm 2^\circ$). Todas las muestras presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles respectivos ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes. Se analizaron 20 embriones de cada condición por inyección.

A



B



Obtenidos estos resultados, decidimos analizar específicamente el efecto de la rapamicina sobre las cilias de los morfantes de *ccdc28b*. Para esto, tratamos a los embriones controles y morfantes de *ccdc28b* con 300 nM o 5 μ M de rapamicina durante 48 hs y luego los procesamos para inmunofluorescencia. Utilizamos anticuerpos contra α -tubulina acetilada y γ -tubulina para detectar las cilias y cuerpos basales, respectivamente, y registramos por microscopía confocal. La primer estructura ciliada que observamos fue el órgano olfatorio y a pesar de que no fue posible cuantificar el largo de las cilias, determinamos que en los morfantes de *ccdc28b* el tratamiento con ambas dosis de rapamicina provocó una clara reducción en el tamaño del órgano olfatorio, reducción que no observamos en los embriones controles (**Figura 46A**).

Posteriormente observamos el tubo neural, con el propósito de poder cuantificar el efecto de la rapamicina sobre el largo de las cilias. Sin embargo los resultados que obtuvimos fueron de alguna manera contradictorios. En primer lugar, es importante destacar que cuando comparamos el largo de las cilias de los embriones controles y morfantes de *ccdc28b* en ausencia de rapamicina, verificamos que a nivel del tubo neural, la inhibición de la expresión de *Ccdc28b* también determina una reducción del largo de las cilias (**Figura 46B**), resultado que confirma el rol de *Ccdc28b* en el proceso de ciliogénesis. Por otro lado, cuando analizamos el efecto de la rapamicina, no observamos cambios significativos en el largo de las cilias de los embriones controles al ser tratados con ambas dosis de rapamicina. Esto podía sugerir que mTORC1 y/o mTORC2 no participan del proceso de ciliogénesis o que por lo menos no estábamos logrando reducir la actividad de los complejos mTOR en la medida suficiente para observar un efecto (**Figura 46B**). Sin embargo, sí observamos una reducción del largo de las cilias de los embriones morfantes cuando fueron incubados con rapamicina, pero esa reducción solo la observamos con la dosis de 300nM ($P < 0,01$; **Figura 46B**).

Por lo tanto, los resultados que obtuvimos en estos experimentos nos indicaban que al menos parte de los fenotipos de los morfantes *ccdc28b* podrían estar causados por un defecto a nivel de mTORC2 pero no quedaba clara la participación de este complejo en el proceso de ciliogénesis. Además, al mismo tiempo que estábamos realizando estos experimentos surge el primer reporte demostrando una asociación directa entre las cilias y la vía de mTOR, aunque específicamente con mTORC1. En ese trabajo, demostraban que

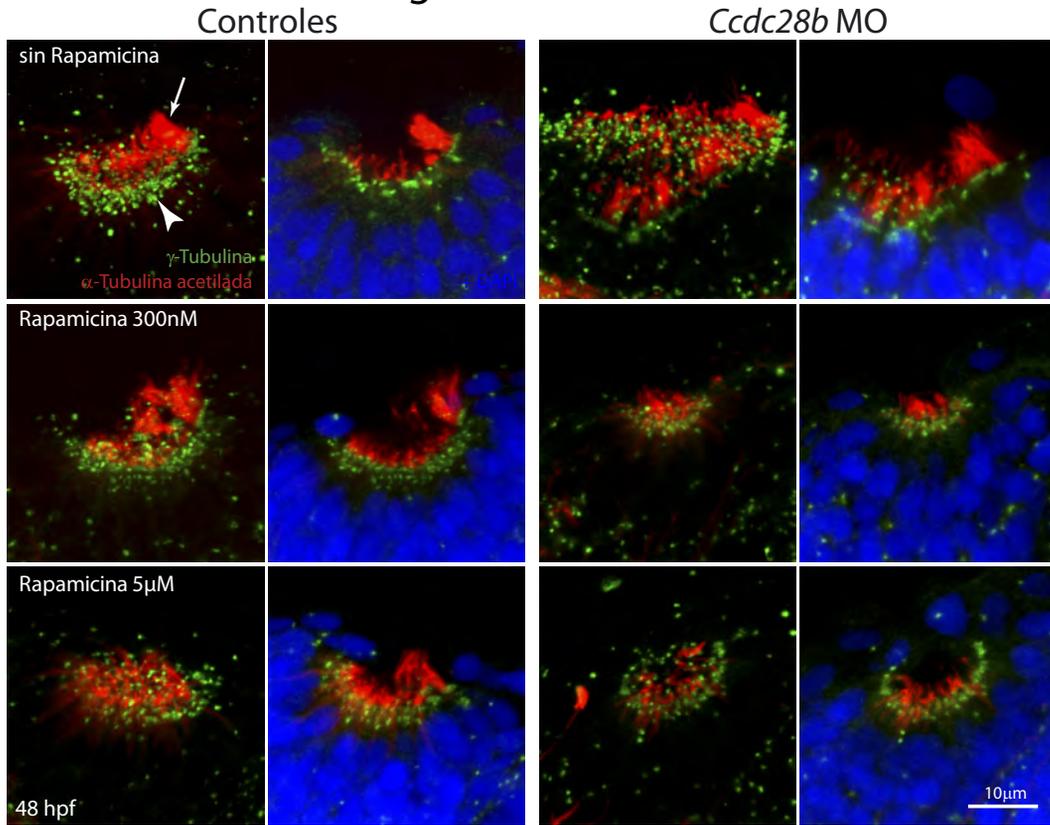
la flexión de las ciliarias primarias determina una inhibición de la actividad de mTORC1 y la consecuente reducción en el tamaño celular (Boehlke, 2010). Por estos motivos, pensamos que era fundamental utilizar una aproximación que nos permitiera afectar la actividad de los complejos mTOR en forma específica dejándonos distinguir entre mTORC1 y mTORC2. Para esto, decidimos realizar experimentos en el pez cebra y utilizar morfolidos específicos para los componentes de cada uno de los complejos. De este modo, a diferencia de lo que sucedía cuando usábamos rapamicina, íbamos a poder observar el efecto sobre la ciliogénesis cuando se inhibe la actividad de mTORC2 y no se afecta la actividad de mTORC1 y viceversa.

Figura 46_Efecto de la Rapamicina sobre las cilias de los morfantes de *ccdc28b*.

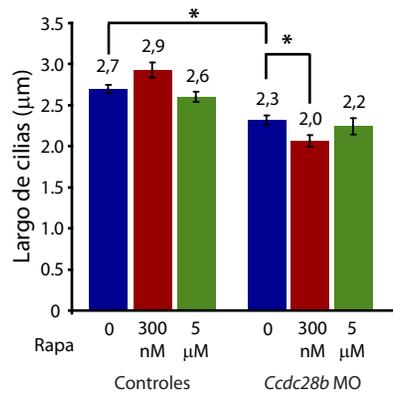
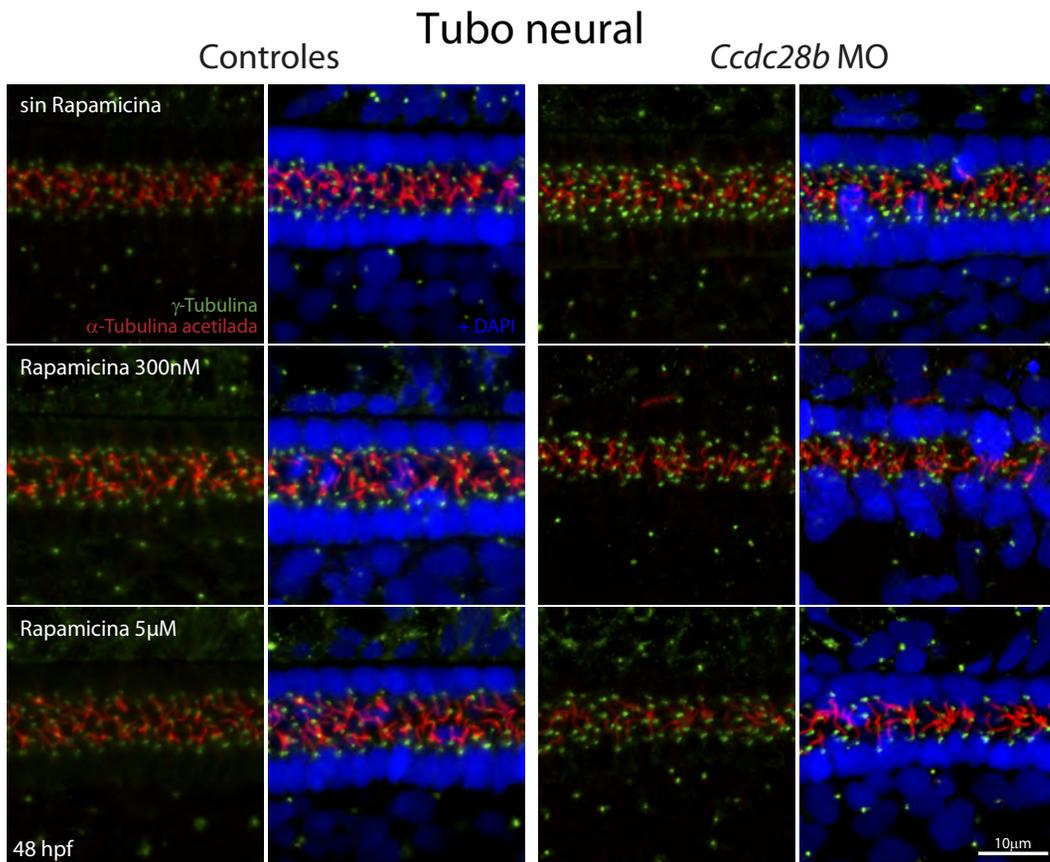
A) La administración de dosis de Rapamicina que afectan a mTORC1 (300 nM) y a mTORC1 y mTORC2 (5 μ M) provocó una reducción del tamaño del órgano olfatorio únicamente en los morfantes de *ccdc28b*. Las cilias y cuerpos basales fueron evidenciados con un anticuerpo anti α -tubulina acetilada (rojo, flecha) y un anticuerpo anti γ -tubulina (verde, cabeza de flecha), respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). No fue posible cuantificar allí el largo de las cilias. B) Por medio del programa ImageJ se cuantificó a nivel del tubo neural el largo de las cilias y no se observó un efecto por la administración de 300 nM o 5 μ M de Rapamicina en los embriones controles. En los morfantes de *ccdc28b* únicamente la administración de 300 nM provocó una reducción estadísticamente significativa del largo de las cilias. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar.

Órgano olfatorio

A



B



Estudio de la relación CCDC28B/mTORC2/ciliogénesis: bloqueo específico de mTORC1 o mTORC2 en embriones del pez cebra.

Diseño y puesta a punto de las dosis de los morfolidos

Lo primero que realizamos fue la búsqueda de los genes ortólogos de *Raptor*, *SIN1* y *Rictor* en el pez cebra y diseñamos morfolidos que afecten el procesamiento de sus ARN mensajeros (MO *splice*). En el caso de *raptor*, detectamos un único gen ortólogo, el cual codifica para dos variantes de ARNm (XM_001919253 y XM_002662358). Diseñamos un morfolido que se une y bloquea la unión entre el exón 2 y el intrón 2, la cual es compartida por ambas isoformas de ARNm. La unión de este MO determina un corrimiento en el marco abierto de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro 126 pb dentro del intrón 2. De traducirse estos ARN mensajeros, codificarían solo para los primeros 130 aa de un total de 1332 aa o 1174 aa correspondientes a las isoformas de la proteína salvaje. Para bloquear la expresión de *sin1*, diseñamos un morfolido que afecta el procesamiento de las tres isoformas de ARNm (XM_003198574, XM_003198575 y XM_003198576) codificadas por el único gen ortólogo detectado. Este morfolido bloquea la unión entre el exón 1 y el intrón 1, lo que genera la aparición de un codón de terminación prematuro 6 pb dentro del intrón. De traducirse estos ARN mensajeros, codificarían una proteína de 94 aa de un total de 527 aa, 480 aa o 491 aa que contienen las variantes salvajes. Por último, en el caso de *rictor*, detectamos un único gen ortólogo que presenta una única variante de procesamiento del ARNm (XM_001921872). El morfolido diseñado se une en la unión entre el exón 3 y el intrón 3 y determina la aparición de un codón de terminación prematuro a unas 7 pb dentro del intrón 3. De traducirse este ARN mensajero, codificaría para una proteína de 67 aa de un total de 1729 aa que contiene la proteína salvaje.

Lo primero que realizamos fue la puesta a punto de las dosis a utilizar de cada uno de los morfolidos. Evaluamos para cada uno de ellos un rango de dosis y determinamos, por medio de rt-PCR y *primers* específicos, la mejor dosis en términos de bloqueo del procesamiento del ARNm y porcentaje de animales viables con fenotipo (>80% de animales con fenotipo y letalidad <5%). Debido a que en los tres casos los intrones retenidos son mayores a 5 Kb, utilizamos dos juegos de *primers* que hibridan de forma

exón/intrón y exón/exón de manera de observar la aparición o la desaparición del producto de amplificación, respectivamente. Observamos una alteración del procesamiento de los ARNm en una manera dependiente de la dosis de MO inyectada y determinamos una dosis de trabajo de 1 ng para *raptor*, 3 ng para *sin1* y 4 ng para *riCTOR* (**Figura 47A**).

Observamos que la inhibición de *raptor* determinó en los embriones la aparición de un fenotipo severo, caracterizado por una curvatura y acortamiento del eje del cuerpo, defectos craneofaciales y alteraciones del patrón de la pigmentación (**Figura 47B**). En contraste, la inhibición de *riCTOR* no resultó en un fenotipo aparente, quizás una leve reducción del tamaño de la cabeza. Los embriones morfantes de *sin1* presentaron un acortamiento del eje del cuerpo y una reducción tanto del largo como del ancho de la cabeza (**Figura 47B**).

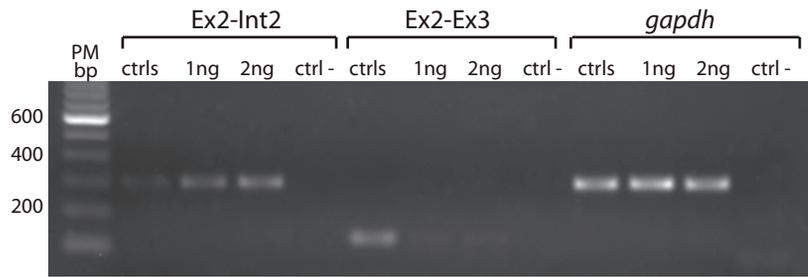
Debido a que los fenotipos que observamos en los morfantes de *riCTOR* y *sin1* eran leves, decidimos confirmar si nuestros morfolininos efectivamente estaban afectando la actividad de los complejos mTORC1 y 2. Para esto inyectamos cada uno de los morfolininos a las dosis seleccionadas y posteriormente procesamos los embriones para *Western blot*. Como era esperado, solo la inyección del morfolino de *raptor* resultó en una reducción significativa de la función de mTORC1, medida a través de los niveles de fosfo-S6 ($49 \pm 31\%$ con respecto a los controles, $P < 0,01$; **Figura 48A**). Por otro lado, solo la inhibición de *sin1* o *riCTOR*, pero no *raptor*, afectó la actividad de mTORC2 comparada a la de los controles ($65 \pm 11\%$ y $27 \pm 1\%$, respectivamente; $P < 0,01$; **Figura 48B**). Estos resultados confirmaron que los morfolininos utilizados afectaban la función de *raptor*, *sin1* y *riCTOR*.

Figura 47_Caracterización fenotípica y funcional de los morfolinós para componentes de mTORC1 y mTORC2.

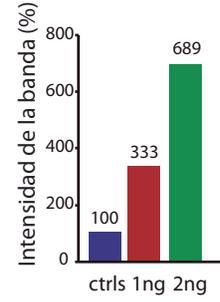
A) Para determinar la funcionalidad de cada uno de los morfolinós se inyectaron dos dosis y se realizaron tres rt-PCRs diferentes. Un primer PCR utilizando un *primer* reverso que hibrida con el intrón que se retiene y se amplifica a partir del ARNm mal procesado (izquierda). La banda en los controles corresponde a ARNm no procesados por haber utilizado hexámeros de *primers* al azar para la síntesis del ADN copia. El segundo PCR fue utilizando un juego de *primers* que flanquean al intrón retenido para amplificar a partir del ARNm correctamente procesado (centro). En los tres casos el tamaño del intrón que se retiene impide la amplificación de este PCR, por lo que la unión del morfolino determina la desaparición de la banda de PCR (las bandas marcadas con asterisco son inespecíficas). En el tercer PCR se amplificó *gapdh* como control (derecha). Se muestran las cuantificaciones de los productos de PCR normalizados con respecto a *gapdh*. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. B) Imágenes representativas de embriones de 48hpf inyectados con las dosis experimentalmente seleccionadas de los MOstd, *sin1*, *raptor* y *rictor* MOspl. Los morfantes de *raptor* presentaron un cuerpo más corto y curvado, defectos craneofaciales y alteraciones en la pigmentación (flecha). Los morfantes de *sin1* presentaron cuerpo más corto y una reducción del largo y ancho de la cabeza. En cambio, los morfantes de *rictor* no presentaron un fenotipo morfológicamente evidente.

A

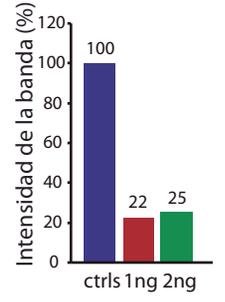
raptor MOspl



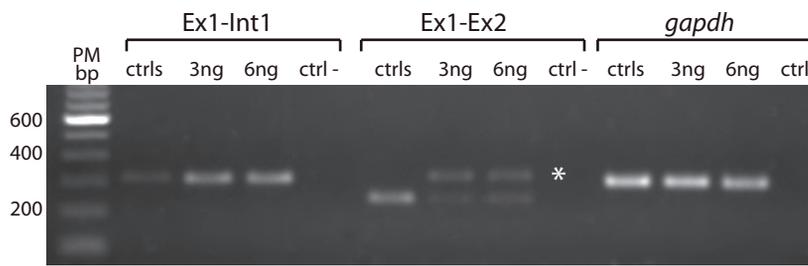
Ex2-Int2/*gapdh*



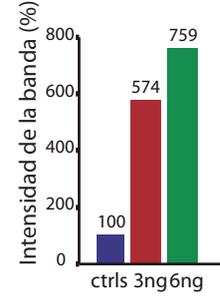
Ex2-Ex3/*gapdh*



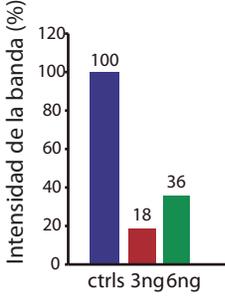
sin1 MOspl



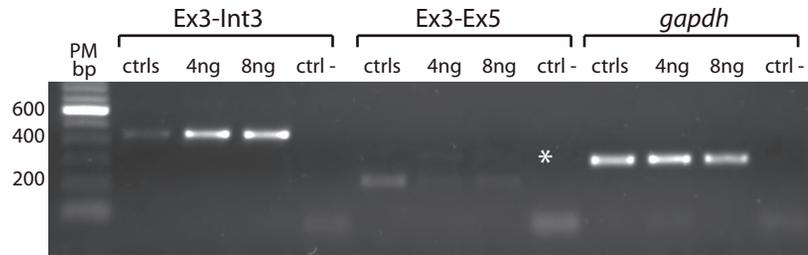
Ex1-Int1/*gapdh*



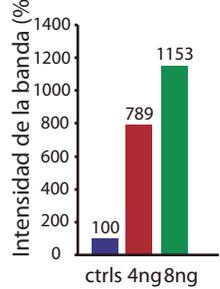
Ex1-Ex2/*gapdh*



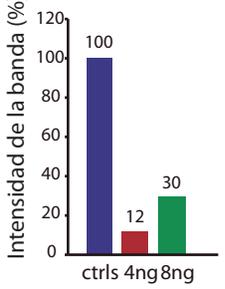
ric1 MOspl



Ex3-Int3/*gapdh*



Ex3-Ex5/*gapdh*



B

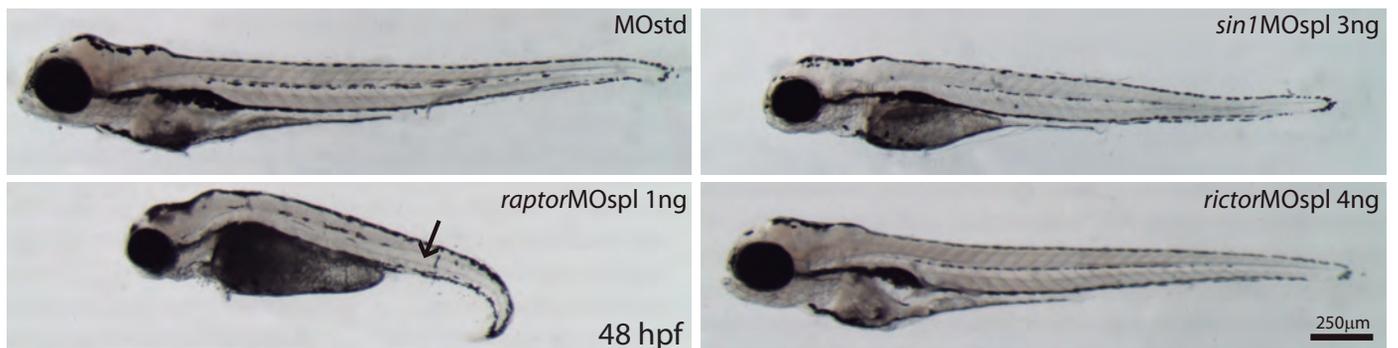
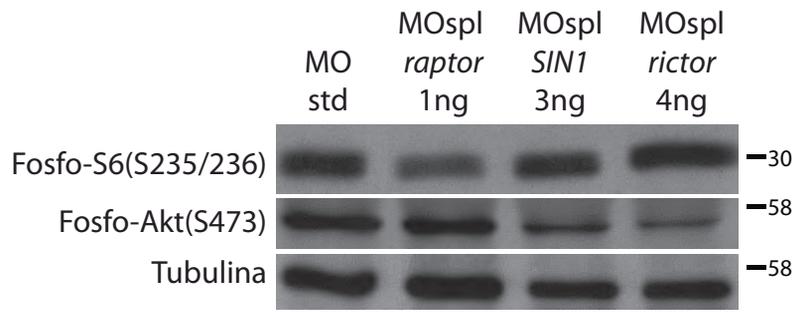
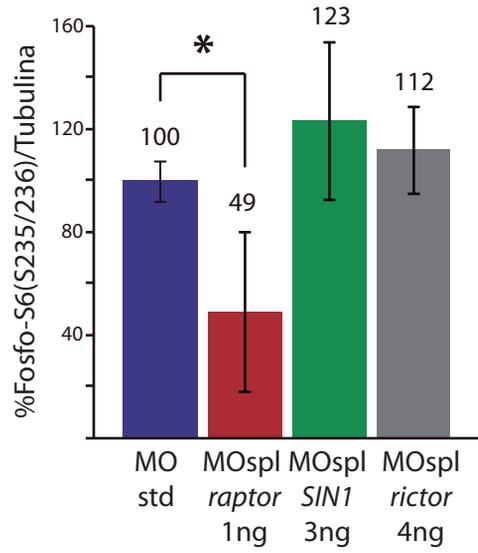


Figura 48_ Efecto de los morfolidos de *sin1*, *raptor* y *ricor* sobre la actividad de mTORC1 y mTORC2.

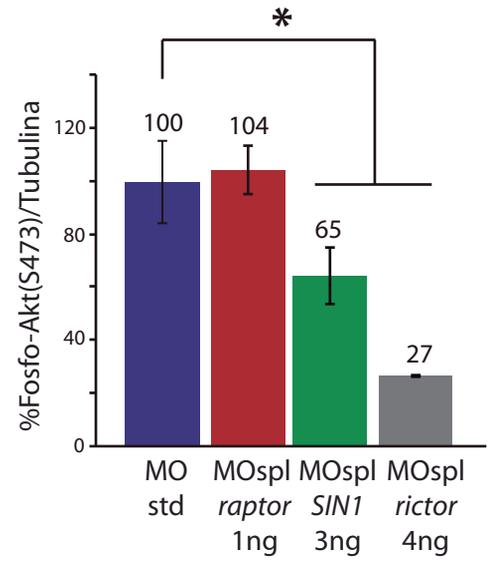
A) La actividad de mTORC1 (Fosfo-S6 S235/236) y mTORC2 (Fosfo-Akt S473) fue analizada en cada morfante. La inyección del morfolido de *raptor* afectó únicamente la actividad mTORC1 mientras que los morfolidos de *sin1* y *ricor* determinaron una reducción de los niveles de Fosfo-Akt S473. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los pesos moleculares se indican en kDa.



A



B

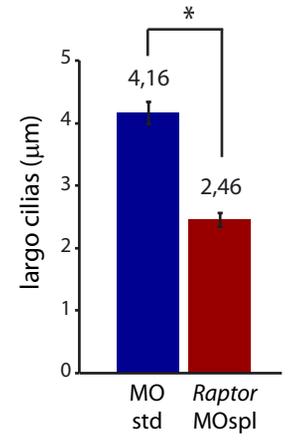
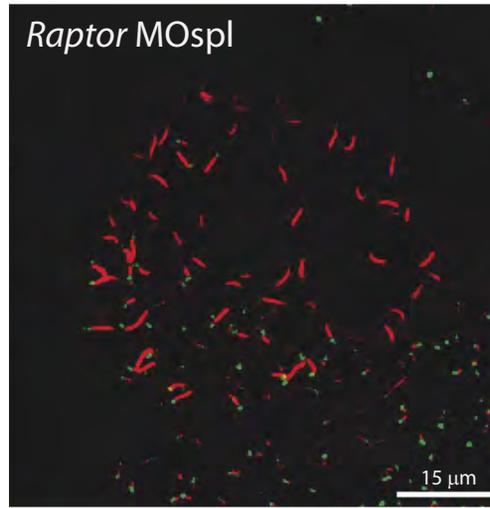
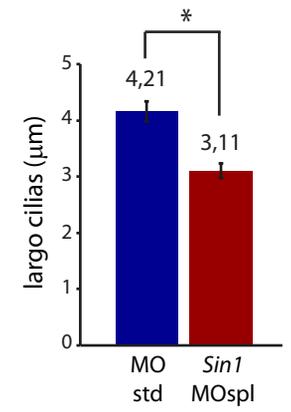
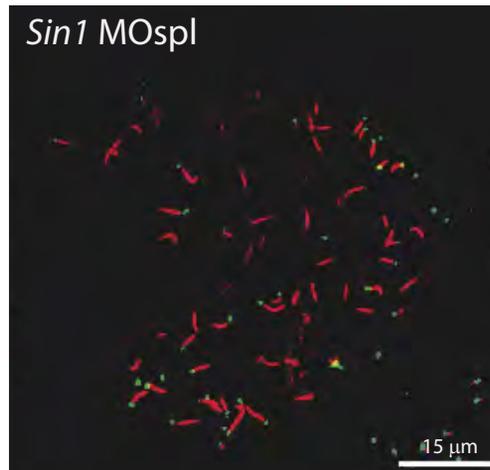
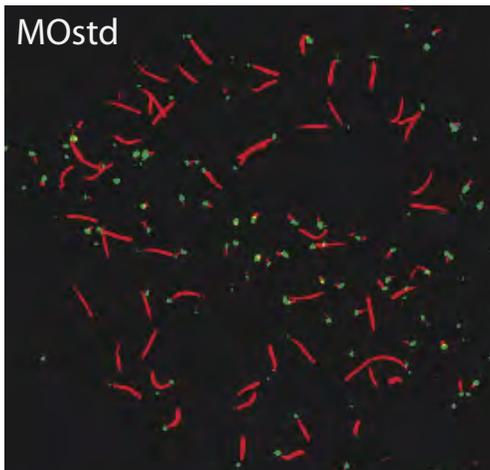
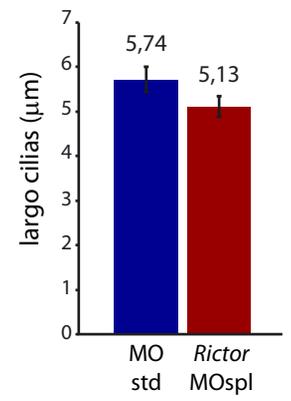
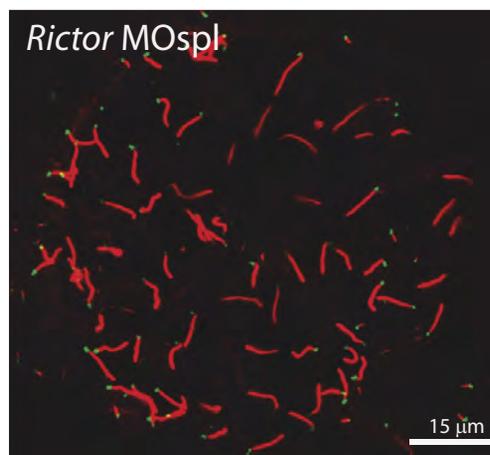
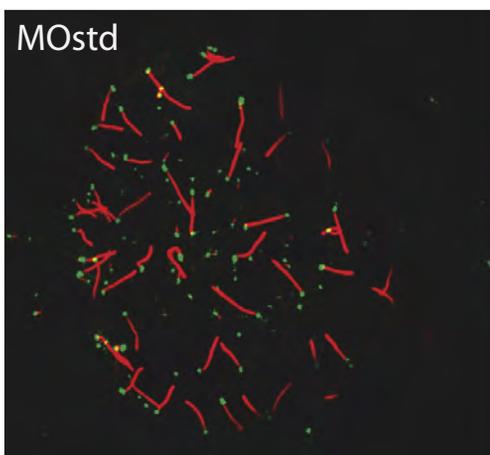


Evaluación de la ciliogénesis en los morfantes de *raptor*, *sin1* y *rictor*.

Una vez definida la dosis y el funcionamiento de los morfolidos, decidimos evaluar la estructura ciliar en estos embriones morfantes. Para eso, estudiamos las cilias de la vesícula de Kupffer (KV), utilizando anticuerpos contra γ -tubulina y α -tubulina acetilada, y midiendo por lo menos 500 cilias de 18 a 20 KVs para cada condición. Comparamos los diferentes embriones morfantes con embriones controles en la misma etapa de desarrollo (etapa de 10-12 somites) y calculamos la longitud promedio de las cilias. De este modo, observamos que la inhibición de los niveles de Raptor determina una reducción significativa en la longitud de las cilias de la KV, pasando de $4,16 \pm 0,18 \mu\text{m}$ en los controles a $2,46 \pm 0,11 \mu\text{m}$ en los morfantes ($P < 0,001$; **Figura 49A**). Este resultado confirma lo que ha sido reportado recientemente sobre el papel de mTORC1 en la regulación de la longitud de las cilias (Yuan, 2012). Cuando analizamos las cilias de los embriones morfantes de *sin1*, también observamos una reducción significativa de su longitud ($4,21 \pm 0,16 \mu\text{m}$ en los embriones control vs $3,11 \pm 0,13 \mu\text{m}$ en los morfantes, $P < 0,001$; **Figura 49B**). En contraste, no observamos cambios significativos en el largo de las cilias cuando utilizamos el morfolino de *rictor* (**Figura 49C**).

Figura 49_ Evaluación de las cilias en los morfantes de *raptor*, *sin1* y *ric1*.

A-C) 18-20 vesículas de Kupffer (KV) de embriones inyectados con cada uno de los morfalinos fueron analizadas por inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando anticuerpos contra γ -tubulina (verde) y α -tubulina acetilada (rojo) para visualizar los cuerpos basales y las cilias, respectivamente. Se midió el largo de más de 500 cilias en cada condición y el largo promedio se presenta en las gráficas de la derecha. La reducción de los niveles de Raptor (A) y Sin1 (B), pero no de Ric1 (C), resultó en un acortamiento estadísticamente significativo del largo de las cilias de la KV. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes.

A**B****C**

Estos resultados fueron sorprendentes porque nos estaban indicando que el efecto o la conexión que buscábamos establecer entre el proceso de ciliogénesis y la actividad de mTORC2 podría no existir o estar restringida solamente a una función de *sin1* por fuera del complejo mTOR2. Para poder determinar con total seguridad que *riCTOR* no cumple un rol en el proceso de ciliogénesis, evaluamos que era necesario también bloquear la expresión de los ARNm maternos de *riCTOR* que están presentes en el vitelo del embrión y que no son alterados por el uso de un morfolino *splice*. Para esto diseñamos un nuevo grupo de morfolinos que bloquean la traducción de los ARNm (MOatg), de modo de afectar tanto al ARNm embrionario como al materno. Diseñamos un MOatg para *sin1* y *riCTOR*, los cuales se unen por complementariedad en una región que abarca al 5'UTR y al codón de inicio de la traducción. Como era de esperar, el fenotipo global de ambos morfantes fue notablemente más severo en comparación con los embriones inyectados con el morfolino *splice* (**Figura 50A**). Los morfantes de *sin1* presentaron un eje corporal acortado y curvo, con claras alteraciones craneofaciales mientras que los morfantes de *riCTOR* presentaron un acortamiento del cuerpo y marcados defectos craneofaciales, así como hidrocefalia (**Figura 50A**). Posteriormente, medimos la longitud de las cilias de la KV en estos morfantes y nuevamente observamos una reducción significativa en el largo de las cilias solo al reducir los niveles de *Sin1* pero no de *Rictor*. Las cilias en los morfantes de *sin1* tuvieron una longitud promedio de $3,41 \pm 0,04 \mu\text{m}$ en comparación con $4,54 \pm 0,08 \mu\text{m}$ en los controles, mientras que los morfantes de *riCTOR* presentaron cilias con un promedio de largo de $4,48 \pm 0,07 \mu\text{m}$ en comparación con $4,27 \pm 0,06 \mu\text{m}$ en los controles ($P < 0,001$; **Figura 50B y C**). Por lo tanto, la inhibición de *riCTOR* utilizando tanto un morfolino *splice* como un *atg*, no provocó un acortamiento significativo de las cilias de la KV. En particular, es importante notar que no observamos defectos en las cilias de la KV en los morfantes de *riCTOR*, incluso cuando usamos una dosis del morfolino *splice* de *riCTOR* que afectó la actividad de mTORC2 en un grado inclusive mayor que el morfolino *splice* de *sin1* (ver **Figura 48**).

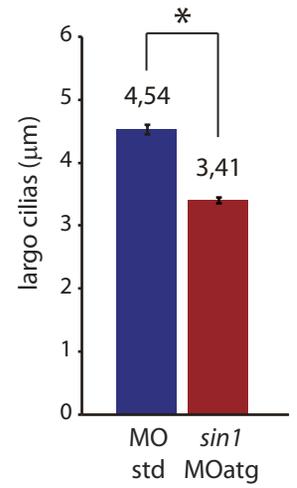
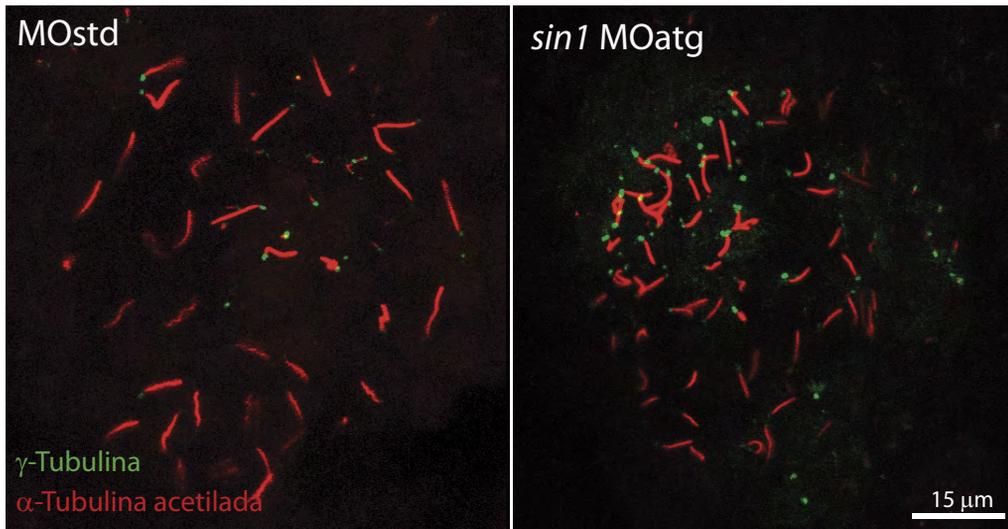
Figura 50_Determinación del efecto de Sin1 y Rictor sobre la ciliogénesis utilizando morfolinós atg.

A) Imágenes representativas de embriones controles e inyectados con morfolinós inhibidores de la traducción para *sin1* y *rictor*. Los morfantes de *sin1* presentan un fenotipo severo con acortamiento y curvatura del cuerpo y alteraciones craneofaciales. Los morfantes de *rictor* presentan acortamiento del cuerpo e hidrocefalia. B) Se visualizaron las ciliás de las KV utilizando anticuerpos contra γ -tubulina (verde) y α -tubulina acetilada (rojo). Se midieron más de 500 ciliás de 18-20 KVs y se determinó el largo promedio. Únicamente se observó un acortamiento estadísticamente significativo en los morfantes de *sin1*. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes.

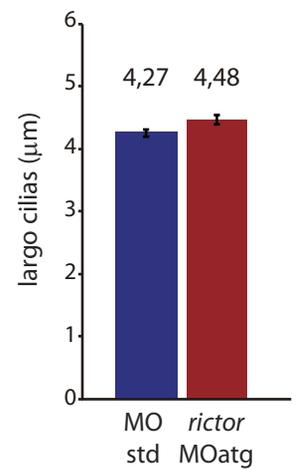
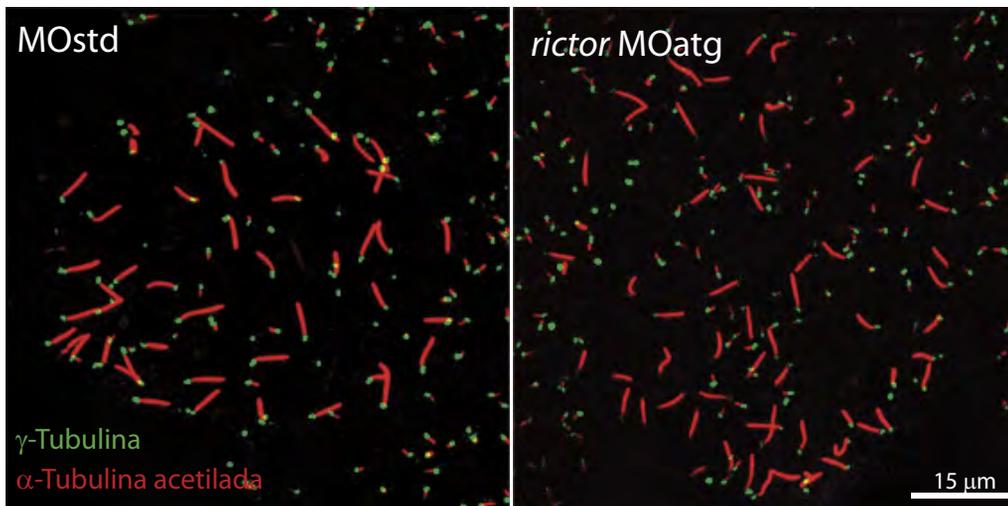
A



B



C



Debido a la importancia de esos resultados para entender e interpretar la relación funcional entre *ccdc28b*, *sin1* y las cilias, decidimos evaluar en otro modelo experimental la relación de Sin1, Rictor y Raptor con el proceso de ciliogénesis. Para esto, diseñamos y adquirimos oligonucleótidos de ARN antisentido (Stealth RNAi™ siRNAs de Invitrogen) que bloquean la expresión de los ARNm de *SIN1*, *Rictor* y *Raptor*. Lo primero que realizamos fue transfectar células de la línea humana hTERT-RPE con esos oligonucleótidos y verificar por medio de *Western blot* su efectividad para reducir los niveles de estas proteínas. Determinamos que el oligonucleótido de *Raptor* reduce un 40% los niveles de la proteína, el oligonucleótido de *SIN1* reduce un 25% y el oligonucleótido de *Rictor* un 61% (**Figura 51**). Luego transfectamos células hTERT-RPE con esos oligonucleótidos de ARN y con el oligonucleótido de *IFT88* como control, y medimos el largo de más de 400 cilias en cada condición. Determinamos que la reducción de *Raptor* y *SIN1* provocan una reducción del largo de las cilias de manera comparable a *IFT88* ($2,7 \pm 0,05 \mu\text{m}$ en los controles, $2,4 \pm 0,06 \mu\text{m}$ en *Raptor*, $2,2 \pm 0,05 \mu\text{m}$ en *SIN1* y $2,2 \pm 0,04 \mu\text{m}$ en *IFT88*; $P < 0,001$; **Figura 52**). En contraste, tampoco observamos una reducción en el largo de las cilias al bloquear la expresión de *Rictor* en este modelo experimental ($2,6 \pm 0,03 \mu\text{m}$; **Figura 52**).

Figura 51_ Caracterización del funcionamiento de los oligonucleótidos de ARN de *Raptor*, *SIN1* y *Rictor*.

Células hTERT-RPE fueron transfectadas con los oligonucleótidos de ARN (Invitrogen) y se analizaron los niveles de Raptor, SIN1 y Rictor por *Western blot*. Como control se utilizó un oligonucleótido con el mismo porcentaje GC y se cuantificaron las bandas normalizando con respecto a la cantidad de α -Tubulina. Los pesos moleculares se indican en kDa.

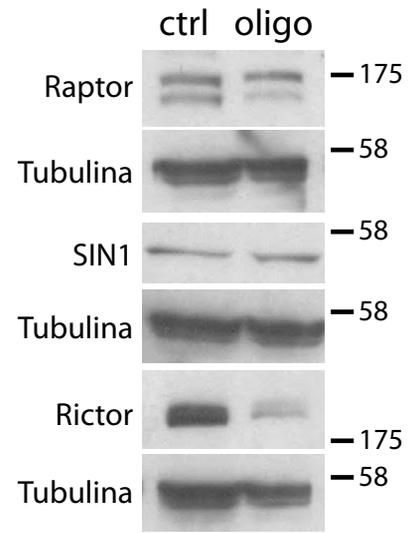
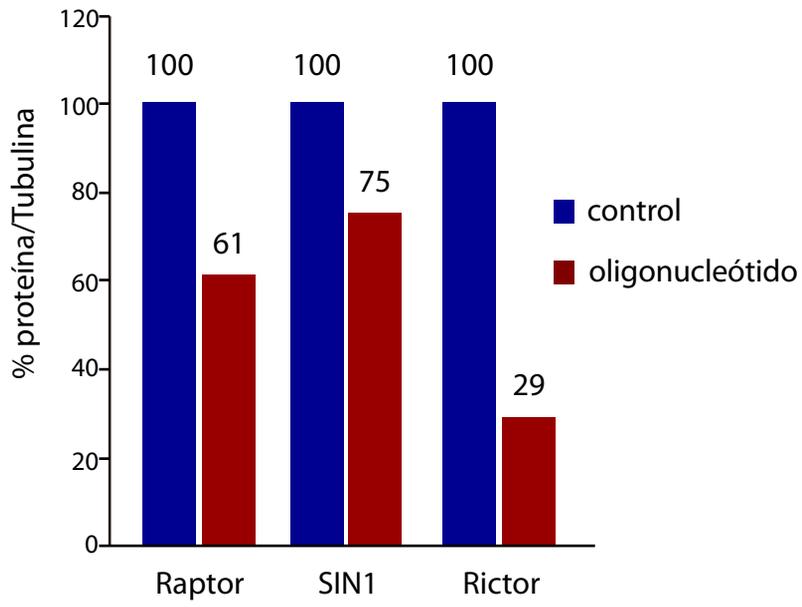
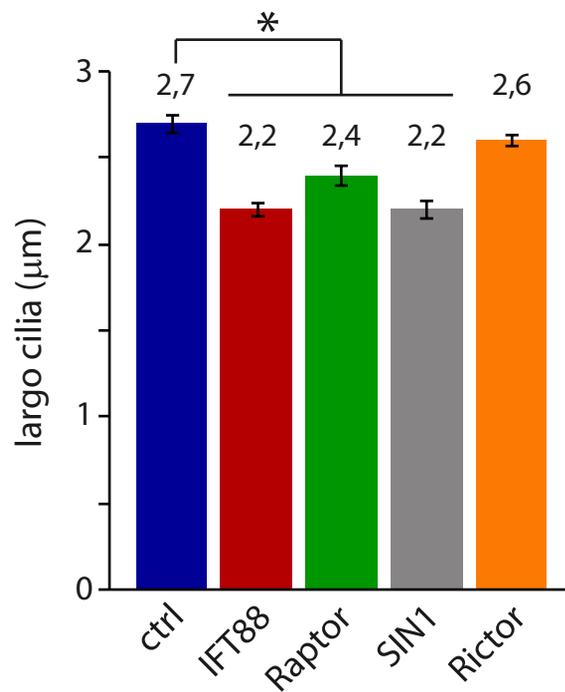
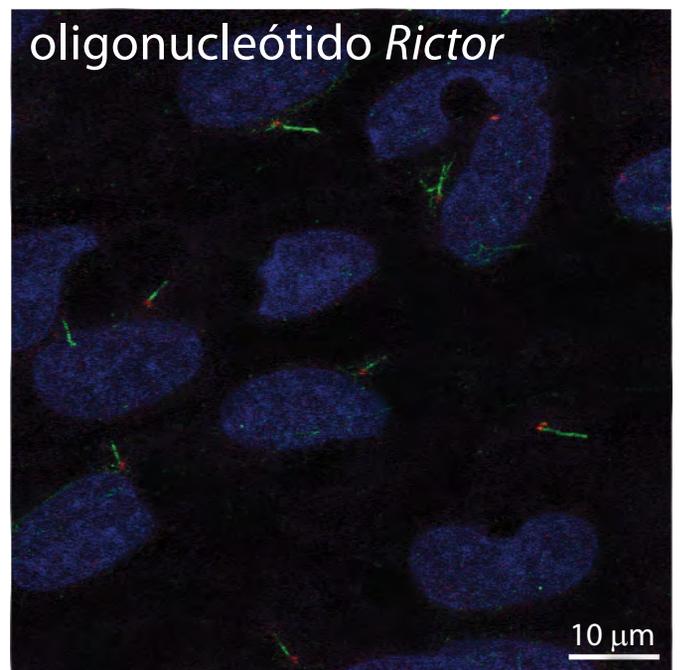
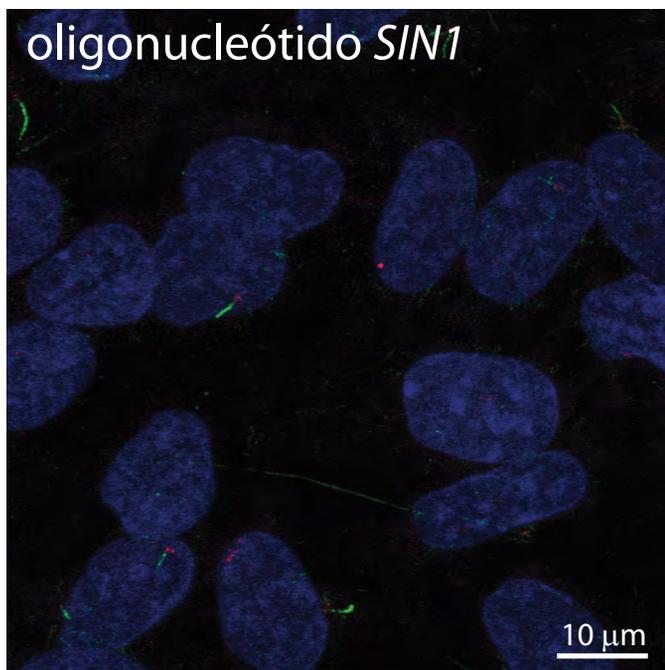
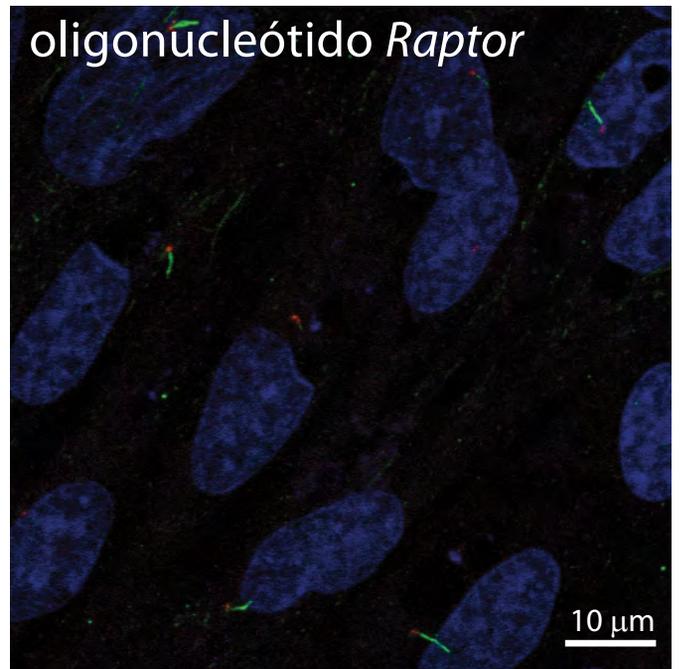
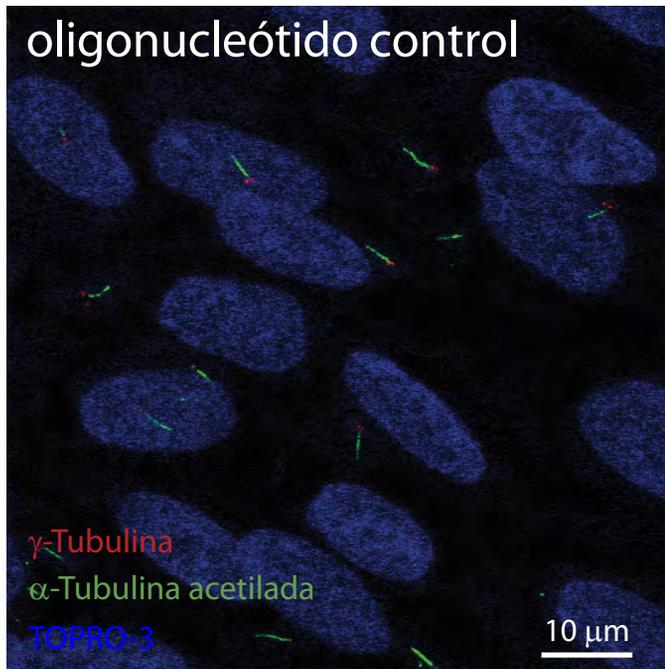


Figura 52_ Determinación del largo de las cilias en células hTERT-RPE transfectadas con los oligonucleótidos de ARN.

Las cilias y cuerpos basales fueron visualizadas por medio de anticuerpos anti α -tubulina acetilada (verde) y γ -tubulina (rojo) respectivamente. Se analizaron más de 400 cilias y se determinó el largo promedio. También en este sistema la reducción de los niveles de Raptor y SIN1, pero no de Rictor, resultó en un acortamiento estadísticamente significativo de las cilias. Como control del sistema se evaluó el efecto de la reducción de los niveles de IFT88 sobre el largo de las cilias. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de duplicados biológicos y técnicos.



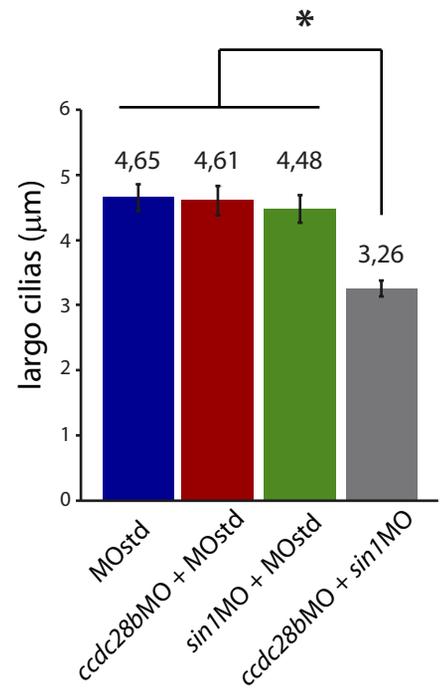
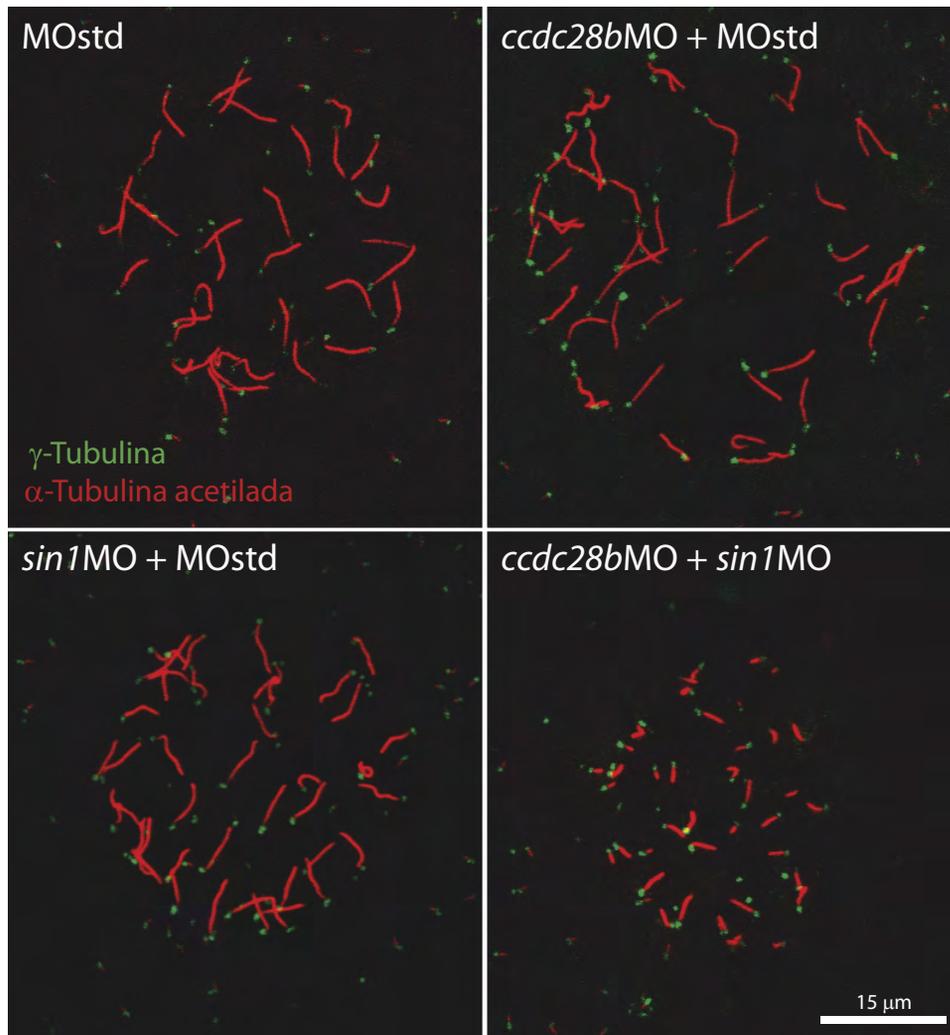
De este modo, determinamos en dos modelos experimentales diferentes, que SIN1 es una proteína que cumple un rol en el proceso de ciliogénesis pero interesantemente, nuestros resultados indican que esa función es independiente de su rol en el contexto de mTORC2.

Esos resultados nos llevaron a formular la idea de que la conexión entre CCDC28B y ciliogénesis podía ser a través de su interacción con SIN1 pero independientemente de mTORC2. Para probar esta idea, realizamos un ensayo de interacción genética entre *ccdc28b* y *sin1* en el pez cebra, cuyo principio ya fue explicado anteriormente. Utilizamos dosis sub-óptimas de los MOspl de *ccdc28b* y *sin1* tanto en inyecciones individuales como en inyecciones dobles, de modo de bloquear la expresión de cada gen por separado o ambos al mismo tiempo. Trabajamos con una dosis de 2 ng del MOspl de *ccdc28b* y 2 ng del MOspl de *sin1* y evaluamos la longitud de las cilias de la KV. Las inyecciones individuales no generaron un cambio en el largo de las cilias ($4,65 \pm 0,21 \mu\text{m}$ en los controles, $4,61 \pm 0,23 \mu\text{m}$ en los *ccdc28b* MOspl y $4,48 \pm 0,21 \mu\text{m}$ en los *sin1* MOspl). En contraste, la co-inyección de estas mismas dosis subóptimas de los morfolinós resultó en una reducción significativa del largo de las cilias ($3,26 \pm 0,12 \mu\text{m}$, $P < 0,001$; **Figura 53A**). Decidimos evaluar en esas mismas condiciones experimentales, qué sucedía con la actividad de mTORC1 y especialmente con la de mTORC2. Utilizando el anticuerpo contra fosfo-S6(S235/236) no observamos cambios en la actividad de mTORC1 tanto en las inyecciones individuales como en la doble inyección de morfolinós. Cuando analizamos la actividad de mTORC2 (fosfo-AktS473) determinamos que las subdosis de los *ccdc28b*MOspl y *sin1*MOspl por sí solas ya resultaban en una reducción de la actividad de mTORC2 ($16 \pm 1,1\%$ *ccdc28b* MOspl, $12 \pm 1,6\%$ *sin1*MOspl) la cual está en el mismo rango de reducción que la observada con la doble inyección de morfolinós ($12 \pm 4,6\%$; **Figura 53B**). Este resultado nos indicaba que *ccdc28b* y *sin1* interactúan genéticamente para afectar la longitud de las cilias pero que ésta no depende de la actividad de mTORC2.

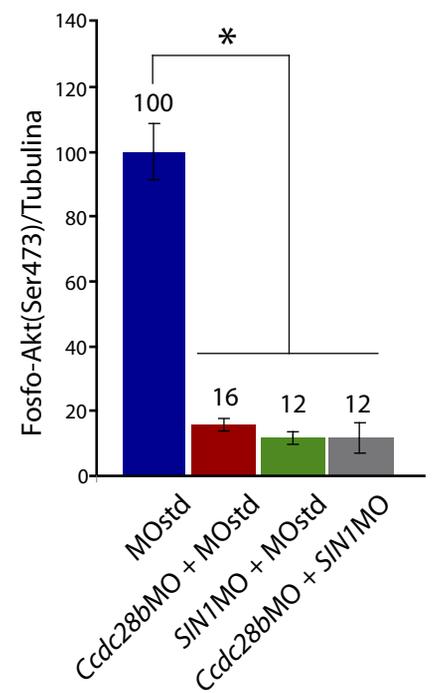
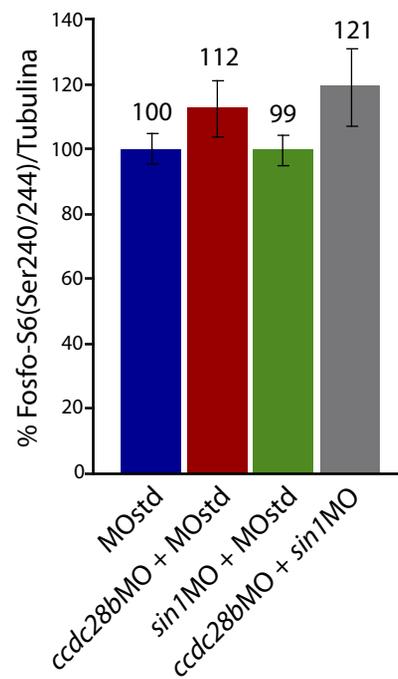
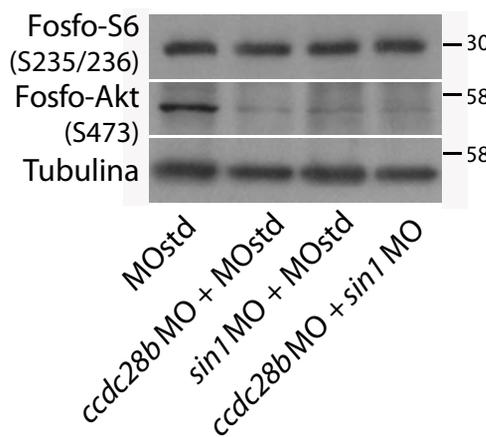
Figura 53_ *ccdc28b* y *sin1* interactúan genéticamente.

A) Dosis sub-óptimas de *ccdc28b* y *sin1* MOspl fueron utilizados para analizar la interacción genética entre estos dos genes. La inyección del MOstd o de los Mospl por separado (2 ng de cada uno) no resultó en un acortamiento de las cilias de la vesícula de Kupffer (KV). Sin embargo, la co-inyección de las dosis subóptimas de cada morfolino determinó una reducción significativa en el largo de las cilias de la KV. Se analizaron 18 KV por cada condición y se midieron más de 500 cilias por condición. Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). B) Este efecto sobre el largo de las cilias no puede ser explicado por una alteración de la actividad de mTORC1 (Fosfo-S6 S240/244) o mTORC2 (Fosfo-Akt S473) ya que por *Western blot* no observamos una reducción aumentada en la condición de la doble inyección. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Los pesos moleculares se indican en kDa.

A



B

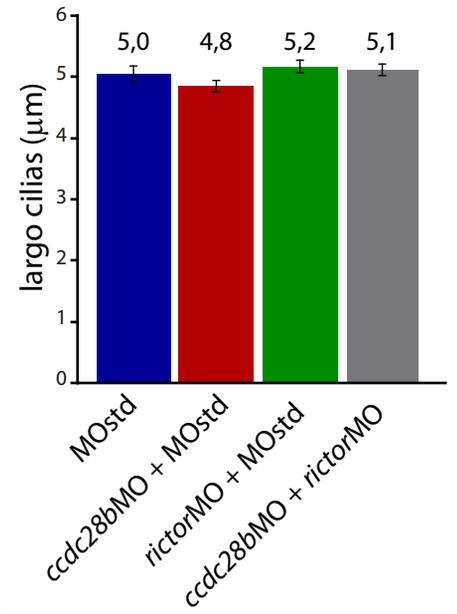
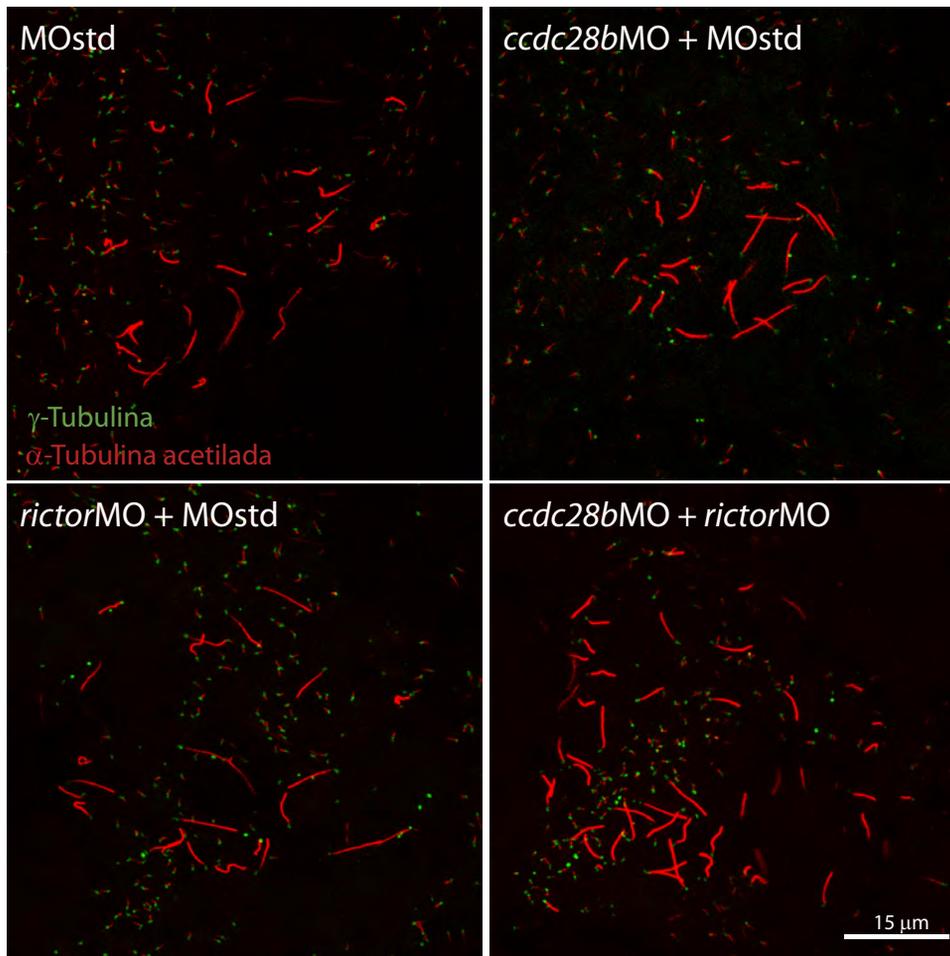


A pesar de que no observamos un efecto sobre las cilias al inhibir la expresión de *rictor*, y dada la dificultad para excluir a Rictor basado en la ausencia de un efecto, decidimos a modo de control, evaluar si *ccdc28b* y *rictor* interactuaban genéticamente y afectaban las cilias. Apoyando nuestros resultados anteriores, la inyección de subdosis de cada uno de los morfolinós (2 ng *ccdc28b*MOSpl y 3 ng de *rictor*MOSpl) juntos o separados, no determinó una reducción del largo de las cilias (controles $5,0 \pm 0,13 \mu\text{m}$, *ccdc28b*MOSpl $4,8 \pm 0,09 \mu\text{m}$, *rictor*MOSpl $5,2 \pm 0,10 \mu\text{m}$, doble $5,1 \pm 0,09 \mu\text{m}$; **Figura 54A**). A su vez, aunque nuestros datos bioquímicos no indicaban que la inhibición de *ccdc28b* afecte la actividad de mTORC1, igual decidimos probar si se observaba una interacción genética entre *ccdc28b* y *raptor*. En este caso trabajamos con 2 ng del MOSpl de *ccdc28b* y 0,5 ng del MOSpl de *raptor* y observamos que estas dosis subóptimas individuales no provocaron una reducción significativa de la longitud de las cilias de KV: $4,82 \pm 0,06 \mu\text{m}$ en los controles, $4,57 \pm 0,07 \mu\text{m}$ en MOSpl *ccdc28b* y $4,51 \pm 0,06 \mu\text{m}$ MOSpl *raptor*. La inyección conjunta de ambos morfolinós tampoco afectó la longitud de las cilias ($4,57 \pm 0,05 \mu\text{m}$; **Figura 54B**). Esto sugiere que *ccdc28b* y *raptor* no interactúan para regular la longitud de las cilias.

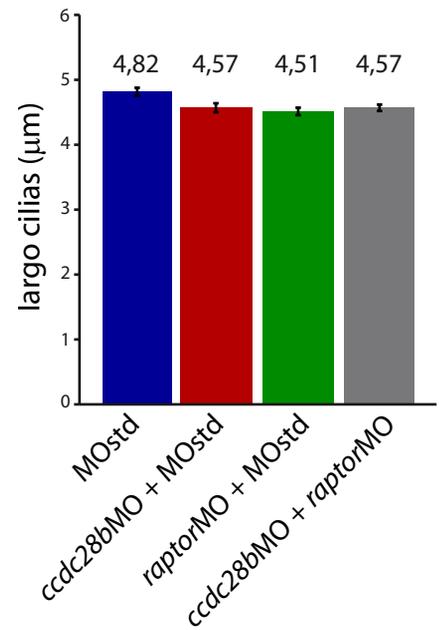
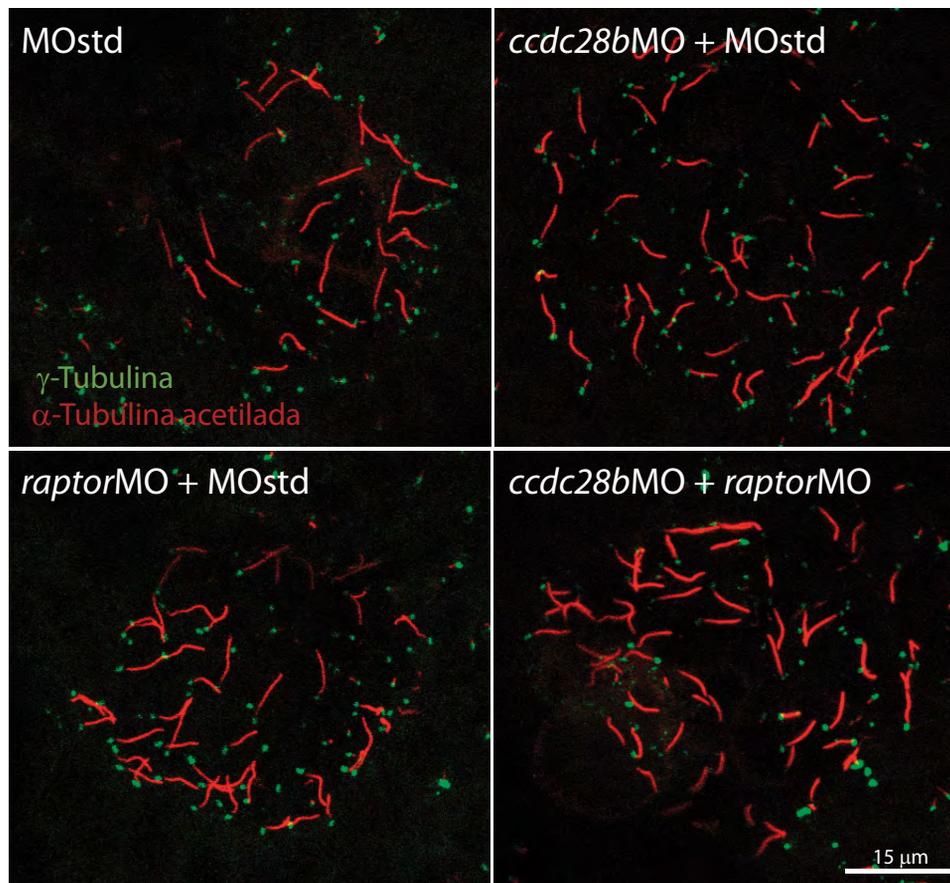
Figura 54_ Estudio de la interacción genética entre *ccdc28b* y *rictor* o *raptor*.

Dosis sub-óptimas de los *ccdc28b*, *rictor* y *raptor* MOspl fueron usadas para evaluar la interacción genética entre estos genes. A) Las inyecciones individuales de los morfolinós de *ccdc28b* y *rictor* (2 ng y 3 ng), o la co-inyección de estos morfolinós en estas dosis no resultaron en un acortamiento de las cilias. B) Tampoco se observó una interacción entre *ccdc28b* y *raptor* (dosis utilizadas 2 ng y 0,5 ng). Estos resultados sugieren que *rictor* y *raptor* no interactúan con *ccdc28b* para controlar el largo de las cilias. Se analizaron 18 KV por cada condición y se midieron más de 500 cilias por condición. Las barras de error corresponden al error estándar.

A



B



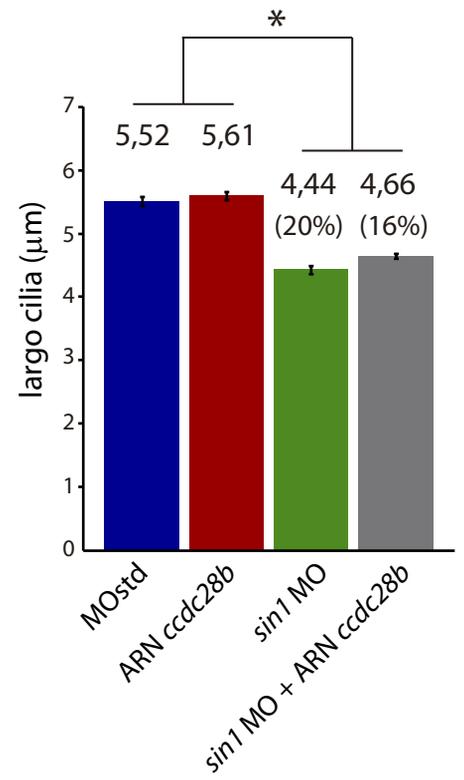
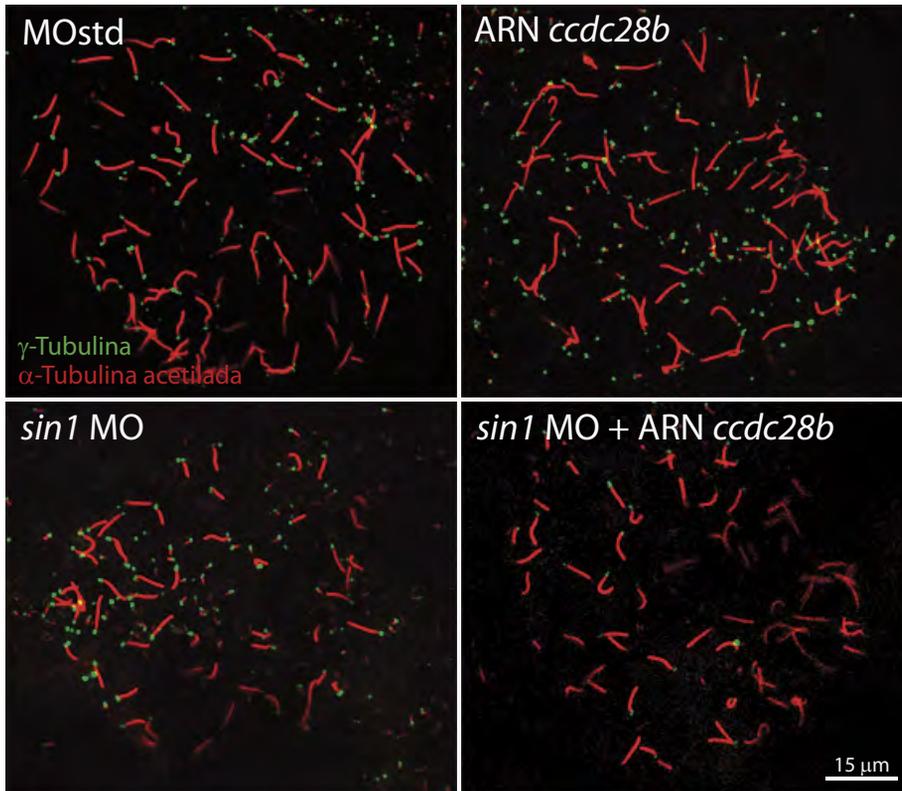
Finalmente, y para caracterizar aún más la relación funcional entre *Ccdc28b* y *Sin1* en el contexto de las cilias, decidimos realizar un experimento en el cual buscamos rescatar el defecto ciliar por medio de sobre-expresar a *ccdc28b* en los morfantes de *sin1*. También realizamos el experimento inverso (ARN de *sin1* y MOspl *ccdc28b*) para poder así obtener información sobre el orden en que actúan *Sin1* y *Ccdc28b* sobre las cilias. Para esto primero sintetizamos *in vitro* los ARNm de *ccdc28b* y *sin1* del pez cebra y luego analizamos si el efecto que provoca la inhibición de cada uno de estos genes sobre las cilias, podía ser rescatado por la inyección del ARNm del otro gen. En el primer experimento comparamos la longitud de las cilias de los controles (inyectados con el MO estándar), con las de los embriones inyectados únicamente con el ARNm de *ccdc28b*, con los inyectados con el MOspl de *sin1* y con los embriones que fueron co-inyectados con el ARNm de *ccdc28b* y el MOspl de *sin1*. Como se observa en la **Figura 55A**, observamos una reducción significativa de las cilias entre los morfantes de *sin1* y los controles, pero la sobre-expresión de *ccdc28b* no rescató la longitud de las cilias. Cuando realizamos el experimento inverso, observamos un rescate, parcial pero significativo, del largo de las cilias por la co-inyección del ARNm de *sin1* en los morfantes de *ccdc28b* ($3,75 \pm 0,07 \mu\text{m}$ en los morfantes de *ccdc28b* y $4,05 \pm 0,05 \mu\text{m}$ en los co-inyectados con el ARNm de *sin1*; $P < 0,001$; **Figura 55B**). Debido a la participación de *raptor* en el proceso de ciliogénesis, y a modo de control, decidimos analizar si el ARN de *ccdc28b* era capaz de rescatar el acortamiento de las cilias en los morfantes de *raptor*. En este caso, no observamos diferencias en el largo de las cilias de los morfantes de *raptor* con los morfantes co-inyectados con el ARN de *ccdc28b* ($P < 0,001$; **Figura 56**).

El conjunto de nuestros resultados nos indican que el rol de *Ccdc28b* sobre el proceso de ciliogénesis puede ser a través de *Sin1* pero en forma independiente de mTORC2. Algunas posibilidades que surgen de estos resultados se discuten más adelante.

Figura 55_ Ccdc28b afecta el largo de las cilias *upstream* de *Sin1*.

Experimentos de rescate con el ARN de *ccdc28b* o *sin1* para analizar la interacción de estas proteínas sobre el largo de las cilias. A) El acortamiento de las cilias de la KV en los morfantes de *sin1* (3 ng) no fue rescatado por la co-inyección del ARNm de *ccdc28b* (100 pg). La sobre-expresión de *ccdc28b* no afectó el largo de las cilias. B) En cambio, la inyección del ARNm de *sin1* (100 pg) en los morfantes de *ccdc28b* (3 ng) rescató parcialmente el largo de las cilias. La sobre-expresión de *sin1* no afectó el largo de las cilias. En las gráficas se presenta el largo promedio de más de 500 cilias medidas en cada condición. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar de dos inyecciones independientes.

A



B

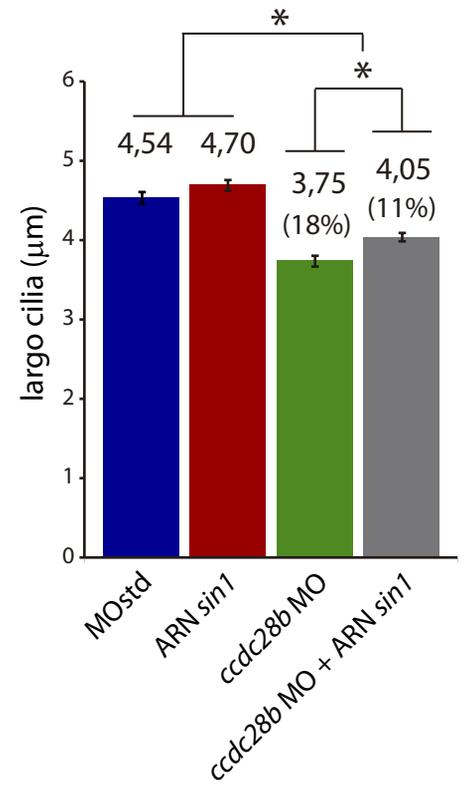
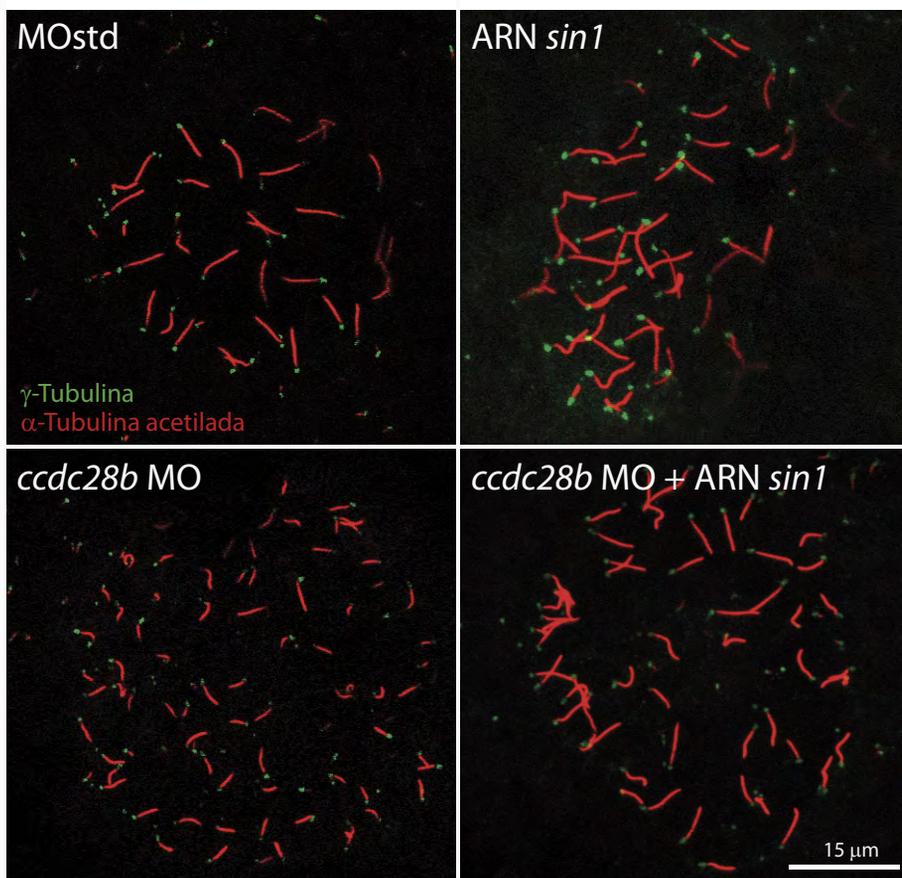
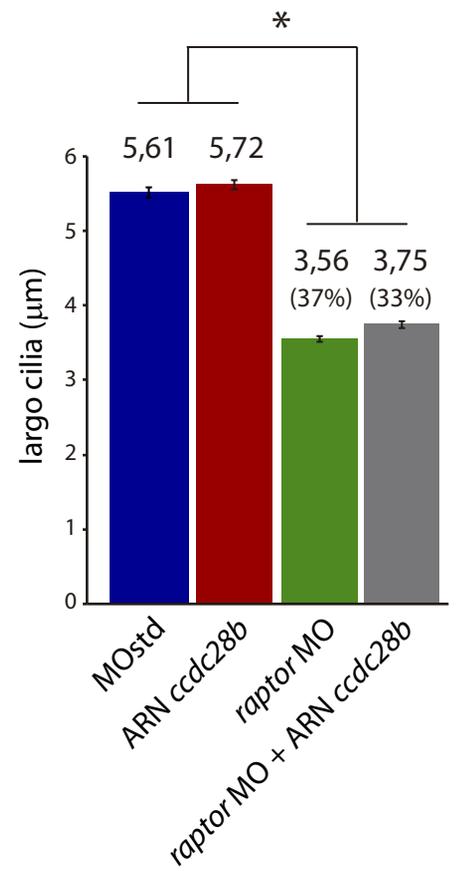
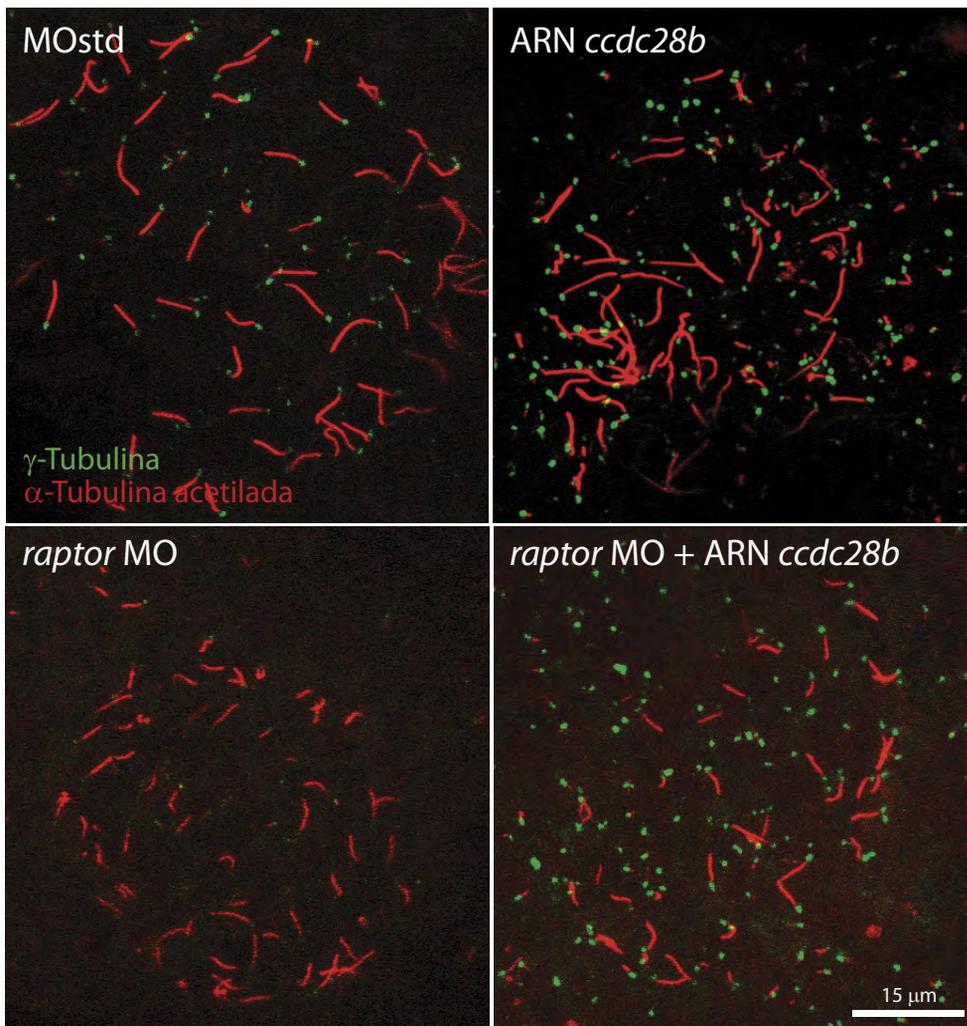


Figura 56_ La sobre-expresión de *ccdc28b* no rescató el defecto ciliar en los morfantes de *raptor*.

La co-inyección del ARNm de *ccdc28b* (100 pg) no rescató el acortamiento de las cilias de la KV en los morfantes de *raptor* (1 ng). Se analizaron más de 500 cilias en cada condición de 18 KV. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras de error corresponden al error estándar.



Las siguientes dos últimas secciones (Parte E y F) corresponden a un conjunto de experimentos realizados durante esta tesis que aún no han sido culminados. En la Parte E nos propusimos profundizar en el estudio de la localización a nivel celular de CCDC28B. Para eso, desarrollamos una serie de anticuerpos y llegamos a realizar una caracterización parcial de algunos de ellos. En la Parte F se presentan los resultados del proyecto donde buscamos desarrollar una línea transgénica *knock-out* en ratón.

Consideramos que el trabajo que realizamos en cada una de estas secciones ameritaba incluirlas dentro de la tesis aunque no estén finalizadas.

Parte E_ Estudio de la localización de CCDC28B

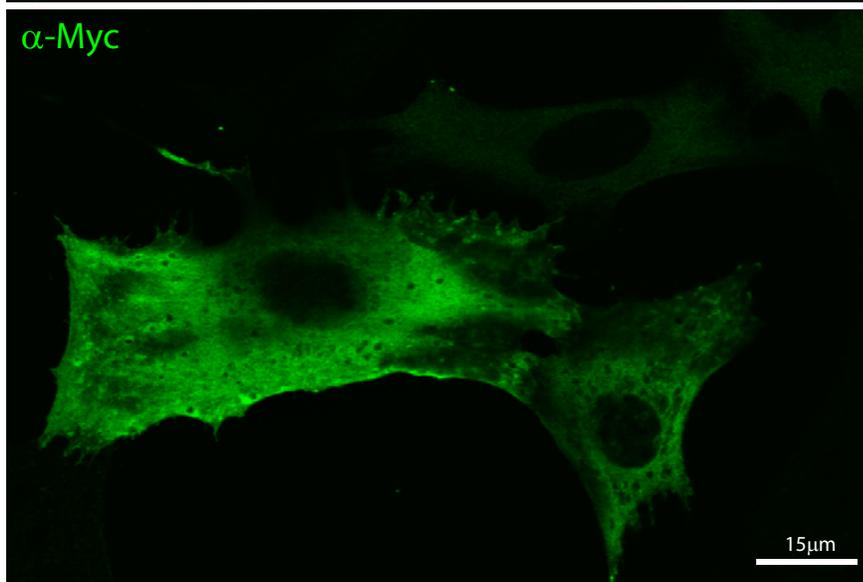
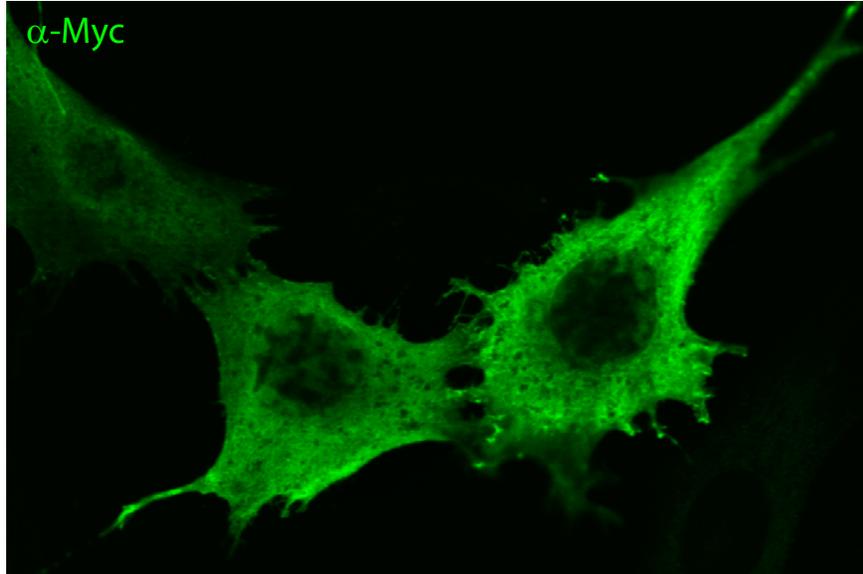
Uno de los objetivos que nos planteamos para esta tesis fue el de estudiar en mayor profundidad la localización celular de CCDC28B y así poder entender mejor su rol biológico, y en particular su relación con las cilias. Cuando se caracterizó a CCDC28B se determinó que es una proteína que se localiza en centrosomas y cuerpos basales (Badano, 2006). Esa localización fue determinada utilizando un anticuerpo policlonal, el cual fue producido por el laboratorio del Dr. Katsanis y para el cual se utilizó como antígeno un péptido sintético correspondiente a una región de la isoforma humana.

Debido a que cuando comenzamos esta tesis no contábamos con ese anticuerpo para trabajar, decidimos como primer estrategia experimental, sobre-expresar la proteína con un “tag” y analizar su patrón de localización. Para esto, contábamos con los plásmidos pMyc y pHA (Clontech) con el ORF de CCDC28B clonado y con anticuerpos comerciales para reconocer esos “tags”. Se transfectaron células NIH3T3 con el plásmido pMyc y se analizó la localización de Myc-CCDC28B por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Myc, Como se observa en la **Figura 57** no pudimos determinar una localización específica por medio de esta técnica ya que la proteína sobre-expresada se distribuyó homogéneamente por toda la célula y no presentó un patrón de marca definido. Esto pudo deberse a que estos vectores contienen el promotor CMV (del inglés *Cito Megalo Virus*), el cual es un promotor de alta expresión y determina una tasa de síntesis muy elevada. Se probó transfectar con dosis menores de plásmido, así como analizar a menores o mayores tiempos post-transfección, pero en ninguno de los casos se obtuvieron mejores resultados.

Figura 57_ Localización de Myc-CCDC28B en células NIH3T3.

Se transfectaron células con el plásmido pMycCCDC28B y se analizó la localización de la proteína de fusión por medio de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-Myc. Debido a la sobre-expresión no fue posible determinar una localización específica.

pMycCCDC28B



Producción de un suero inmune contra CCDC28B

Debido a que no contábamos con un anticuerpo y a que no pudimos estudiar la localización de CCDC28B por medio de la técnica de sobre-expresión, nos propusimos producir un anticuerpo nuevo. Para esto se trabajó en colaboración con la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo (UPR), quienes produjeron de manera recombinante a la isoforma humana de CCDC28B (isoforma BC). Se clonó el ORF en el vector de expresión de procariontes pET21d y luego de su incorporación a bacterias *E. coli*, se indujo su expresión. Fue posible producir la proteína de manera soluble y se determinó por gel filtración que forma complejos oligoméricos de alto peso molecular, los cuales dependen de la formación de puentes disulfuros. La proteína purificada fue enviada al Polo Tecnológico de Pando donde se inmunizó un conejo, para producir un suero inmune conteniendo anticuerpos anti-CCDC28B.

Una vez obtenido el suero inmune, analizamos el patrón de señal que se obtenía por medio de una inmunocitoquímica en células NIH3T3. Para definir el patrón de localización, probamos diferentes combinaciones de fijación/permeabilización y diversas concentraciones del suero inmune. Las combinaciones que se utilizaron fueron las siguientes: Metanol/TritónX100 0,1%, PFA 4%/Metanol y PFA 4%/TritónX100 0,1%. Para visualizar a las cilias y cuerpos basales se utilizó una mezcla de los anticuerpos monoclonales (producidos en ratón, Sigma) contra α -Tubulina acetilada y γ -Tubulina, respectivamente. Notablemente, con ninguno de los protocolos utilizados se pudo recapitular la localización reportada en centrosomas o cuerpos basales, incluso cuando utilizamos el mismo protocolo que se utilizó en ese trabajo (Metanol/TritónX100 0,1%; (Badano, 2006; **Figura 58**). En todos los casos, la distribución que observamos fue tanto en el citoplasma como en el núcleo y principalmente fue concentrada en la región perinuclear. La señal más definida se obtuvo con el protocolo de fijación con PFA 4% y permeabilización con TritónX100 al 0,1% (**Figura 58**). Para determinar la especificidad de esta señal, se aplicaron los mismos protocolos pero utilizando una misma concentración del suero preinmune, el cual fue extraído del mismo conejo previo a ser inmunizado (**Figura 59**). En este caso, observamos una disminución general de la intensidad de la señal y cuando comparamos entre iguales protocolos, observamos la mayor diferencia entre los patrones de la condición PFA/TritónX100. De cualquier manera, parte de la señal

del suero preinmune era similar a la del suero inmune sugiriendo que al menos parte de la misma fuese inespecífica. Interesantemente, con los tres protocolos se observaron células que presentaron una señal concentrada en la región de centrosomas/cuerpos basales, lo que indica una posible reacción inespecífica de esa zona.

Figura 58_ Señal del suero anti-CCDC28B en células NIH3T3.

Se analizó por medio de inmunocitoquímica la señal del suero anti-CCDC28B utilizando tres protocolos de fijación diferentes. En el panel superior se observa la señal luego de una fijación con metanol y permeabilización con TritonX100 0,1%. El panel del medio corresponde a un protocolo de fijación con PFA 4% y permeabilización con metanol. En el panel inferior las células fueron fijadas con PFA 4% y permeabilizadas con TritonX100 0,1%. Se utilizaron anticuerpos anti γ -tubulina y α -tubulina acetilada para visualizar las cilias (rojo) y DAPI (azul) para los núcleos.

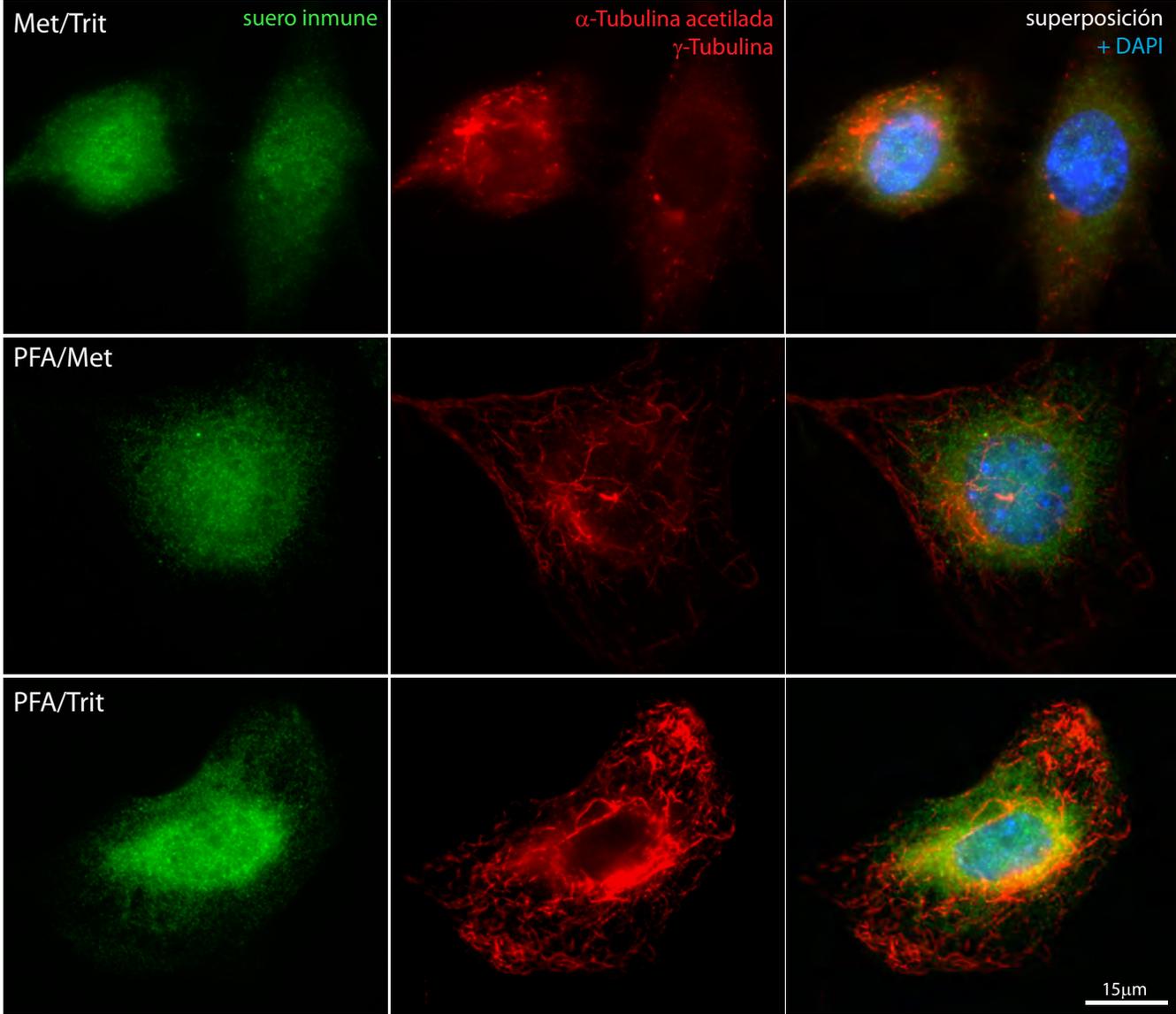
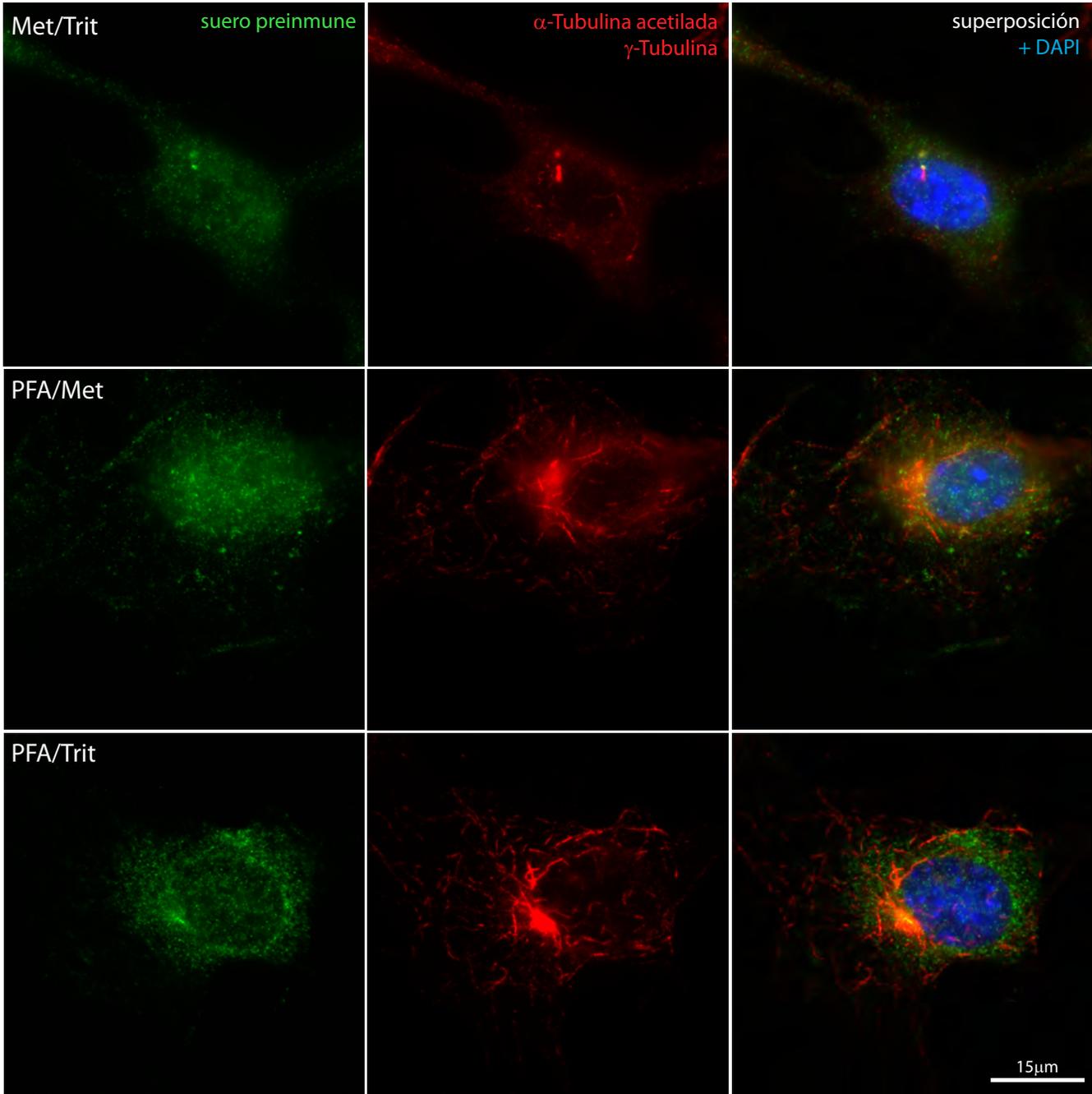


Figura 59_ Señal del suero preinmune en células NIH₃T₃.

Se aplicaron los mismos protocolos utilizados con el suero inmune y se analizó el patrón de la señal. Las ciliias fueron evidenciadas por medio de anticuerpos anti γ -tubulina y α -tubulina acetilada (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). A pesar de que la intensidad de la señal fue menor, se observó algo de señal. Cuando se compararon entre iguales protocolos y con los resultados del suero inmune, la mayor diferencia se observó en la condición PFA/Tritón.

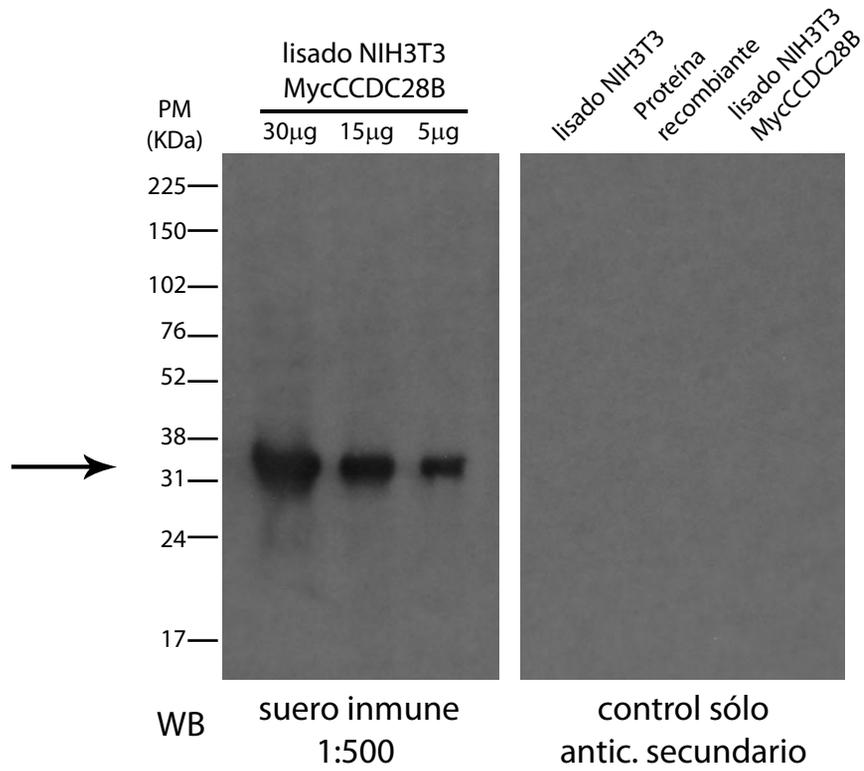
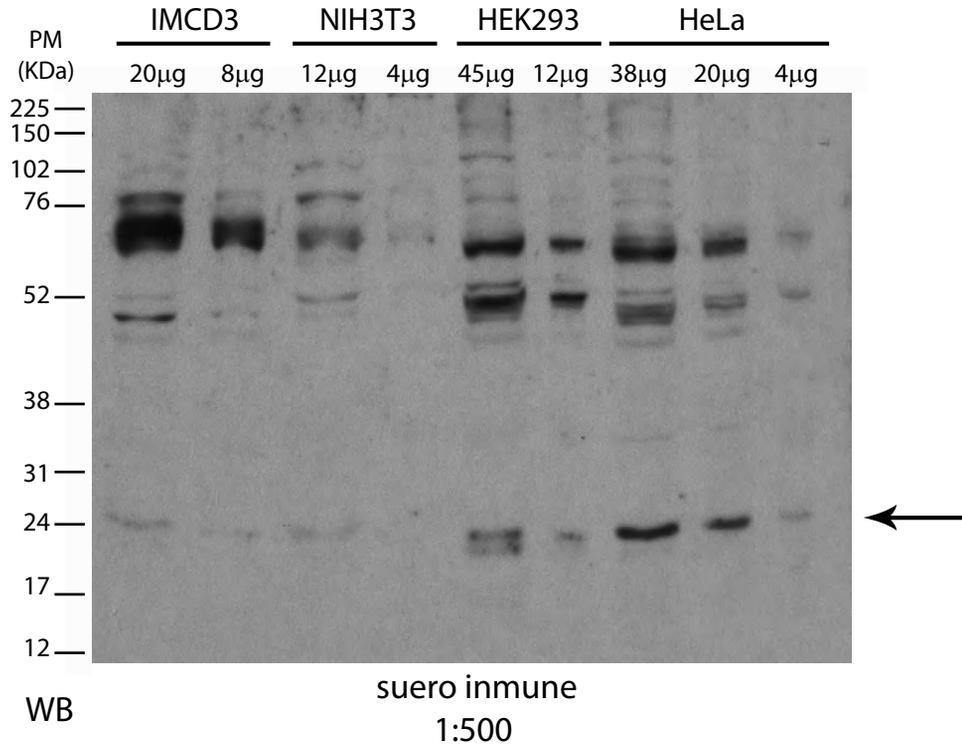
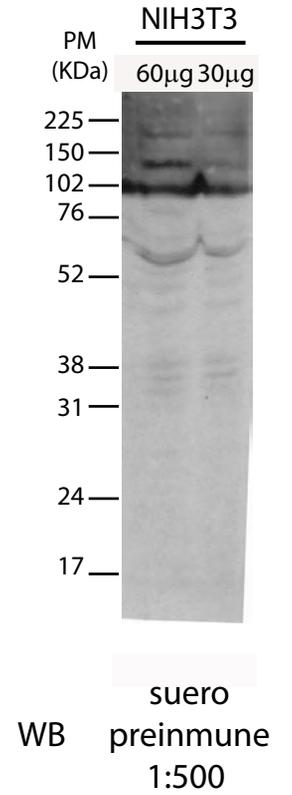


A continuación decidimos analizar por *Western blot* el patrón de marcación del suero inmune en lisados celulares. En primera instancia corrimos distintas concentraciones de un lisado de células NIH3T3 que habían sido transfectadas con el plásmido pMycCCDC28B (isoforma BC; **Figura 60A**). La isoforma BC de CCDC28B tiene un peso molecular teórico de 27 kDa y el “tag” Myc consiste de unos 11 aa, lo que le incrementa su peso teórico a 29 kDa. Observamos que el suero inmune es capaz de detectar una banda aproximadamente en la altura esperada, incluso cuando se sembraron pocos μg de proteína total del lisado. Como control, realizamos un *Western blot* incubando únicamente con el anticuerpo secundario y verificamos que la señal que observamos era específica del suero inmune, ya que no se detectó ninguna señal (**Figura 60A**). Estos resultados indicaron que bajo condiciones de sobre-expresión, el suero inmune es capaz de detectar a CCDC28B y no se detecta señal de otras proteínas. Posteriormente, analizamos si el suero inmune es capaz de detectar a CCDC28B cuando no es sobre-expresada, o sea cuando se encuentra en sus niveles de expresión endógenos. Como se describió en la Parte A, en *Homo sapiens* existen dos isoformas de CCDC28B (BC y NM), las cuales tienen un peso molecular teórico de 27 kDa y 22 kDa, respectivamente. En *Mus musculus* se predicen también dos isoformas, ambas con un peso molecular teórico de 22 kDa. Para detectar a CCDC28B endógena corrimos lisados de distintas líneas celulares murinas (IMCD3 y NIH3T3) y humanas (HEK293 y HeLa) y analizamos el patrón de bandas obtenido con el suero inmune (**Figura 60B**). En todos los lisados observamos una banda de aproximadamente 24 kDa, la cual fue mucho más intensa en las muestras de las líneas celulares humanas. Pensamos que en las líneas humanas el suero inmune podría estar reconociendo principalmente a CCDC28B_NM endógena (22 kDa), ya que esa banda migra a la misma distancia que la banda detectada en las líneas murinas (22 kDa). Esto nos estaría indicando que quizás CCDC28B_BC podría no estar expresándose, o hacerlo en niveles tan bajos que no es detectada por este suero inmune.

Figura 60_ Caracterización por *Western blot* del suero anti-CCDC28B.

A) Lisados de células NIH₃T₃ transfectadas con pMycCCDC28B fueron sometidos a un SDS-PAGE (gel 12%) y se analizó la señal del suero anti-CCDC28B. El suero reconoció a Myc-CCDC28B sobre-expresada incluso cuando se sembraron pequeñas cantidades de proteína total (izquierda). La señal fue específica ya que no se obtuvo señal cuando se realizó el *Western blot* solo con el anticuerpo secundario (derecha).

B) Análisis de la señal del suero inmune para detectar a CCDC28B endógena. En lisados de líneas murinas (IMCD₃ y NIH₃T₃) y humanas (HEK293 y HeLa) se observó una banda de 24 kDa y otras bandas de mayor peso molecular. La señal fue más intensa en las líneas humanas. C) No se observó una banda a la altura de 24 kDa cuando se realizó el *Western blot* con el suero preinmune en lisados de NIH₃T₃.

A**B****C**

Un dato importante que surgió fue que en todas las muestras el suero inmune también detectó otras bandas de alto peso molecular (>52 kDa) y con igual intensidad. Observamos que al disminuir los μg de proteína total sembrado, las intensidades de esas bandas disminuyeron en igual proporción a la banda de ~ 22 kDa. Cuando utilizamos el suero preinmune (**Figura 60C**), también se detectaron bandas de alto peso molecular, pero en ninguna de las líneas se observaron bandas a la altura esperada para CCDC28B.

Se buscó eliminar las bandas no “específicas” y para ello se probaron distintos protocolos de obtención de los lisados celulares (cambio de detergente), así como se probó un protocolo de *Western blot* con condiciones más astringentes. En ningún caso se logró mejorar el resultado del *Western blot*. Estos resultados nos indicaban que el suero inmune no solo contenía inmunoglobulinas contra CCDC28B sino que también contra otras proteínas. Este resultado reforzó por tanto la posibilidad de que la señal obtenida en inmunocitoquímica pueda ser inespecífica.

Debido a esto, nos propusimos purificar por afinidad el suero inmune para poder eliminar la reacción no específica. Para esto, trabajamos una vez más en colaboración con la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo, quienes produjeron nuevamente la proteína recombinante. A pesar de la purificación que se realizó, el suero purificado continuó detectando las bandas de alto peso molecular y no se observaron cambios significativos en su patrón de señal.

Producción de nuevos anticuerpos contra CCDC28B

Debido a la necesidad de contar con un buen anticuerpo contra CCDC28B para el trabajo de esta tesis y porque otros proyectos del laboratorio también lo requerían, decidimos producir nuevos sueros contra CCDC28B. En este nuevo intento, se realizaron dos estrategias diferentes. Por un lado, se produjeron sueros inmunes en conejo utilizando como inmunógenos a péptidos sintéticos. Para poder identificar y estudiar por separado a ambas isoformas de CCDC28B (BC y NM), decidimos diseñar tres péptidos diferentes. Un primer péptido correspondiente a una región común a ambas isoformas (Q49 a C61), un segundo péptido correspondiente a los aminoácidos L228 a N241 presentes solo en la isoforma BC y el tercer péptido correspondiente a los aminoácidos H187 a A200 presentes solo en la isoforma NM (**Figura 61**). La síntesis de estos péptidos, así como la producción de los sueros inmunes en conejo y su posterior purificación por afinidad, fueron realizadas por la compañía GenScript de New Jersey, EEUU. La nomenclatura que utilizamos para identificarlos fue la siguiente: anticuerpo GenScript_Gral, anticuerpo GenScript_BC y anticuerpo GenScript_NM, respectivamente.

Por otro lado mandamos a producir un nuevo suero inmune en el Polo Tecnológico de Pando utilizando como inmunógeno a la proteína recombinante humana (en este caso, la isoforma NM, producida por la UPR). Para obtener mejores resultados que con el suero hecho anteriormente, en este caso se produjo mayor cantidad de proteína y se modificó el protocolo de purificación. Se utilizó como inmunógeno solo la fracción monomérica, la cual fue purificada a partir de un gel de poliacrilamida.

Figura 61_Secuencias de los péptidos para la producción de anticuerpos anti-CCDC28B.

En las secuencias de CCDC28B_BC y NM se indican las secuencias de los péptidos con los cuales fueron producidos los tres anticuerpos diferentes.

Genscript_Gral

	10	20	30	40	50	60																								
CCDC28B_200aa (isof NM)	MDD	KKK	RS	PK	PCL	AQ	PA	QAP	GT	LR	RV	PV	PT	SH	SG	SL	AL	GL	PH	LP	SP	PK	QR	AK	FK	RV	GG	KE	KE	CC
CCDC28B_241aa (isof BC)	MDD	KKK	RS	PK	PCL	AQ	PA	QAP	GT	LR	RV	PV	PT	SH	SG	SL	AL	GL	PH	LP	SP	PK	QR	AK	FK	RV	GG	KE	KE	CC

	70	80	90	100	110	120																					
CCDC28B_200aa (isof NM)	RP	VLA	GGG	SGS	AG	TPL	QHS	FL	TE	VT	DV	YEM	EG	GL	LN	LN	DF	HSG	R	LQ	AF	GK	EC	SF	EQ	LE	HV
CCDC28B_241aa (isof BC)	RP	VLA	GGG	SGS	AG	TPL	QHS	FL	TE	VT	DV	YEM	EG	GL	LN	LN	DF	HSG	R	LQ	AF	GK	EC	SF	EQ	LE	HV

	130	140	150	160	170	180																						
CCDC28B_200aa (isof NM)	RE	MQE	KL	AR	LHF	SL	DV	CG	EE	ED	EE	ED	GV	TE	GL	PE	EQ	KT	MA	DR	NL	DQ	LL	SN	LE	DL	SN	SI
CCDC28B_241aa (isof BC)	RE	MQE	KL	AR	LHF	SL	DV	CG	EE	ED	EE	ED	GV	TE	GL	PE	EQ	KT	MA	DR	NL	DQ	LL	SN	LE	DL	SN	SM

Genscript_NM

	190	200	210	220	230																						
CCDC28B_200aa (isof NM)	QKL	HL	AEN	AEP	EE	QS	AA	-----																			
CCDC28B_241aa (isof BC)	YP	FQ	GT	RL	CV	CV	PERS	VSS	SP	AL	QE	YS	HT	TN	FP	TS	CS	PV	RF	SHR	LP	KP	RY	RN	LE	FP	QN

Genscript_BC

Una vez que se obtuvieron todos los anticuerpos nuevos, comenzamos su caracterización. Para facilitar la interpretación de los resultados que obtuvimos, los datos serán divididos en dos secciones separadas a pesar de que fueron realizados en forma paralela. Por un lado, se presentan los resultados de los ensayos de *Western blot* y en una segunda parte todos los resultados de los ensayos de inmunocitoquímica. Debido a que los anticuerpos nuevos fueron desarrollados en la última etapa de la tesis, es importante mencionar que los resultados que aquí presentamos deben ser considerados como parciales, ya que aún seguimos trabajando en determinar la localización de CCDC28B.

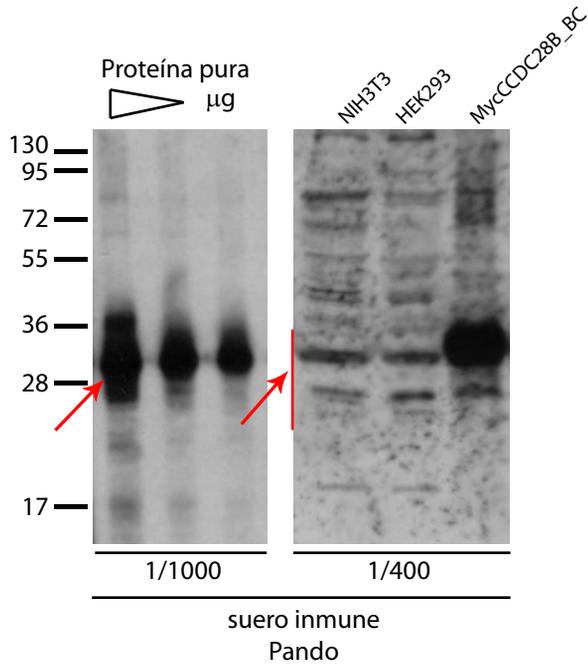
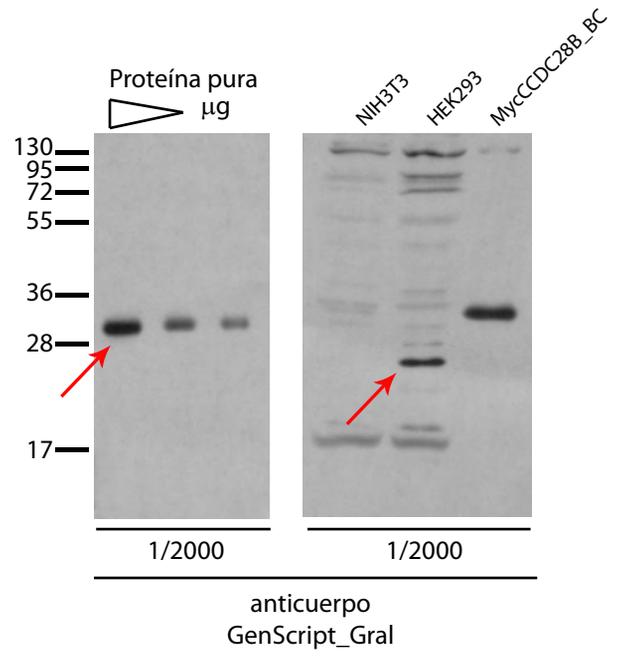
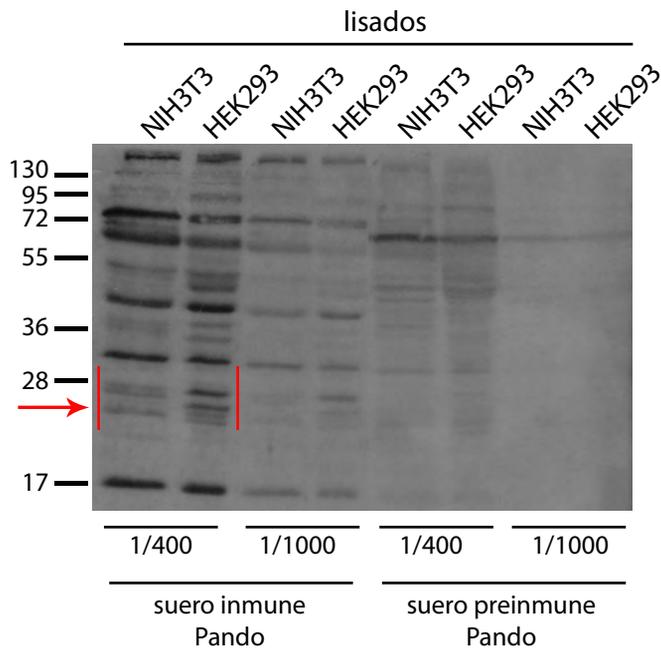
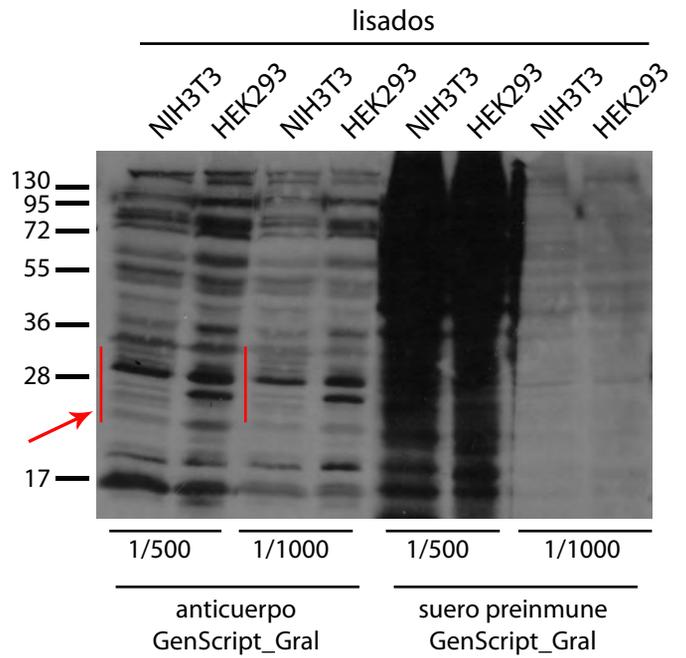
Puesta a punto de nuevos anticuerpos contra CCDC28B: Ensayos de Western blot

Lo primero que realizamos fue la puesta a punto de los anticuerpos que reconocen a ambas isoformas de CCDC28B (suero Pando y anticuerpo GenScript_Gral). Utilizamos distintas diluciones de estos sueros inmunes y analizamos su patrón de señal en una muestra que contenía a la proteína pura (CCDC28B_BC), en un lisado de la línea murina NIH3T3 con Myc-CCDC28B_BC sobre-expresada y en lisados de la línea humana HEK293 o la murina NIH3T3 para detectar a la proteína endógena. En el caso del suero de Pando, éste detectó fuertemente a la proteína purificada y a Myc-CCDC28B_BC sobre-expresada. En cambio en los lisados sin sobre-expresión, se observaron dos bandas con mayor intensidad en el rango de 20-36 kDa así como otras bandas con menor intensidad (**Figura 62A**). Cuando analizamos al anticuerpo GenScript_Gral, observamos que la señal fue más “limpia” y detectó fuertemente a la proteína pura así como a Myc-CCDC28B_BC sobre-expresada. En el lisado de la línea humana HEK293 se observa una banda intensa cercana a 28KDa, así como otras bandas de diversos pesos moleculares pero con una intensidad notoriamente mucho menor (**Figura 62B**). En la línea murina NIH3T3 con la dilución que utilizamos, no observamos ninguna banda en el entorno de 28kDa pero sí otras bandas de muy baja intensidad. Posteriormente, decidimos ajustar las diluciones utilizadas, así como analizar el patrón de señal de los respectivos sueros preinmunes. En el caso del suero de Pando, incubamos con una dilución de 1/400 y 1/1000 y en ambos casos detectamos varias bandas en un amplio rango de pesos moleculares (**Figura 62C**). Si se analiza en la región de pesos moleculares donde deberían migrar las isoformas de

CCDC28B, se observan dos bandas de mayor intensidad, de las cuales la que migra a una altura ~28 kDa está presente tanto en la línea celular humana como en la murina. Con la dilución 1/1000 mejoró la señal de las bandas inespecíficas, pero la intensidad de todas las bandas disminuyó proporcionalmente. Las diluciones equivalentes del suero preinmune presentaron un patrón de bandas que fue diferente y no se observaron bandas definidas en el rango de 17-28 kDa. Cuando analizamos el anticuerpo GenScript_Gral (**Figura 62D** izquierda) con diluciones más concentradas (1/500 y 1/1000), se observaron varias bandas de diversos pesos moleculares pero se detectó en la región cercana a 28 kDa una banda de intensidad mucho mayor en la línea murina o dos bandas en la línea humana. La dilución 1/1000 fue la que presentó una mejor relación si consideramos la intensidad de las bandas “específicas” con la de las “no específicas”. El suero preinmune utilizado a las mismas diluciones presentó un patrón de bandas diferente (**Figura 62D** derecha).

Figura 62_ Caracterización por Western blot de los nuevos anticuerpos anti-CCDC28B.

A) Se analizó el patrón de señal del nuevo suero de Pando por *Western blot* en muestras de la proteína pura o en lisados de células NIH3T3 y HEK293. El suero reconoce fuertemente a la proteína purificada o cuando es sobre-expresada (MycCCDC28B_BC). En los lisados se observaron varias bandas de peso molecular >36 kDa y dos bandas cercanas a 28 kDa. B) La señal de anticuerpo GenScript_Gral fue más limpia y reconoció únicamente una banda de ~28 kDa en las muestras de la proteína purificada o cuando se sobre-expresó a MycCCDC28B. En los lisados de células HEK293 reconoció una banda <28 kDa con mayor intensidad. Esta banda no se detectó en los lisados de células NIH3T3. C-D) Se analizó la señal de distintas diluciones del suero de Pando y de su suero preinmune (C) y del anticuerpo GenScript_Gral y su suero preinmune (D) en lisados de células NIH3T3 y HEK293. Geles al 15%.

A**B****C****D**

En una segunda etapa analizamos la especificidad de los sueros realizados con los péptidos isoforma específicos en las mismas muestras usadas anteriormente. En el caso del anticuerpo GenScript_BC, detectó con mucha intensidad a la proteína recombinante y a Myc-CCDC28B_BC sobre-expresada y no así a Myc-CCDC28B_NM. Sin embargo no observamos ninguna banda en los lisados de las líneas celulares e incluso no se detectaron bandas en pesos moleculares distintos al esperado (**Figura 63A**). Esto podría indicar que la isoforma BC podría no expresarse o bien que la dilución que utilizamos o el propio anticuerpo no sea capaz de detectar a CCDC28B_BC en sus niveles endógenos. De ser así, esto nos indicaría que las bandas observadas con el suero de Pando o con el anticuerpo GenScript_Gral corresponden a CCDC28B_NM o a variantes no conocidas. Este punto, deberá ser estudiado en mayor profundidad en futuros experimentos.

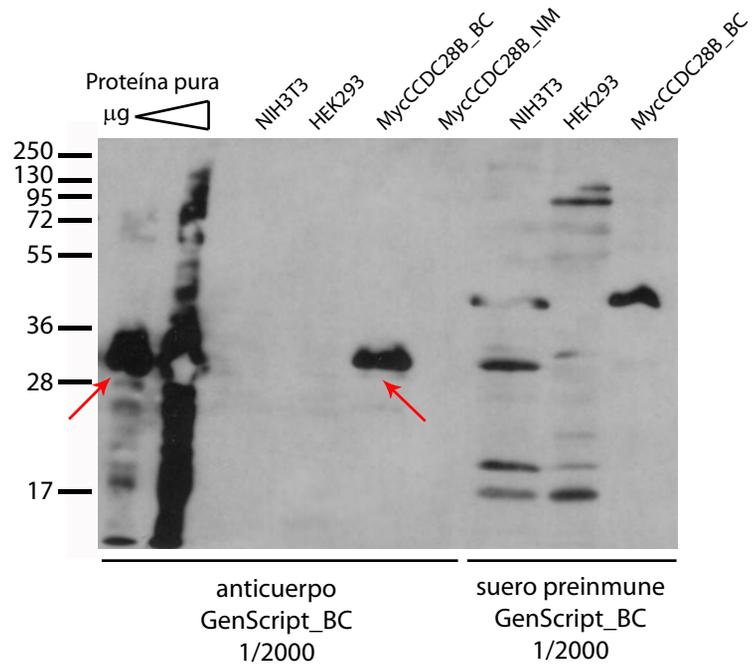
El anticuerpo GenScript_NM fue el que presentó el patrón de señal más “limpio” (**Figura 63B**). En el lisado de la línea murina detectó tres bandas entre ~25-40 kDa y en la línea humana detectó cuatro bandas en ese rango. Las dos bandas de menor peso molecular parecen corresponder con las dos bandas que detectan el anticuerpo GenScript_Gral y el suero de Pando. Estas bandas no se correlacionaron con las bandas que identificó el suero preinmune.

Probamos si era posible enriquecer o aumentar la cantidad de CCDC28B endógena en los lisados y definir mejor cual es la banda que corresponde a CCDC28B. Debido a que no conocíamos la localización real de CCDC28B, probamos lisar las células con dos tipos de buffers diferentes. Por un lado con un buffer que contiene al detergente NP40 al 1%, el cual permite obtener proteínas provenientes tanto del núcleo como del citoplasma y por otro lado, probamos con un buffer que contiene al detergente TritónX100 al 1%, el cual enriquece el lisado en proteínas que se encuentran unidas al citoesqueleto.

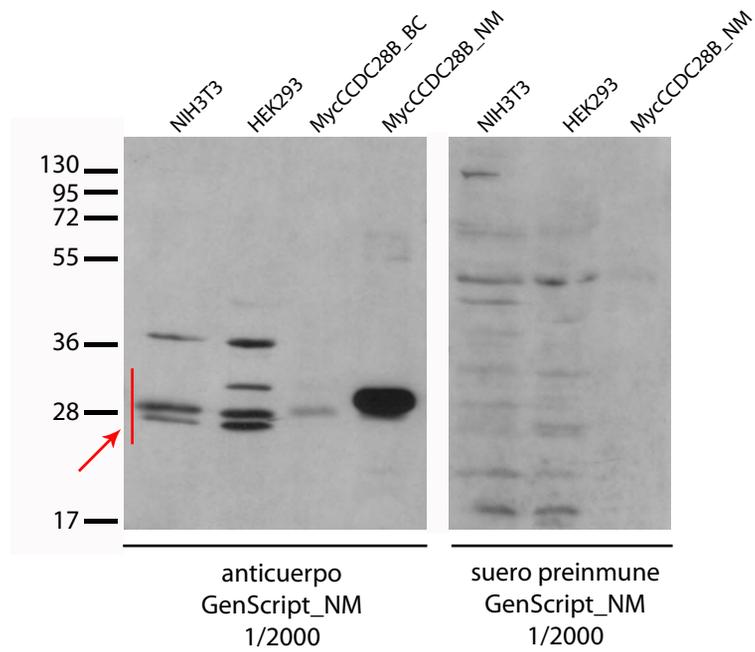
Figura 63_ Caracterización de los nuevos anticuerpos anti-CCDC28B isoforma específicos por *Western blot*.

A) Análisis del patrón de señal del anticuerpo GenScript_BC en muestras de proteína pura o en lisados de células NIH3T3 y HEK293. El anticuerpo reconoció a CCDC28B pura o sobreexpresada pero no se observó señal de la proteína endógena. El suero preinmune dio un patrón de señal diferente. B) El anticuerpo GenScript_NM detectó 3 o 4 bandas en los lisados de células murinas o humanas, respectivamente. Dos de las bandas tienen un peso molecular cercano a 28 kDa. El suero preinmune dio un patrón de bandas tenue y diferente. Geles al 15%.

A



B

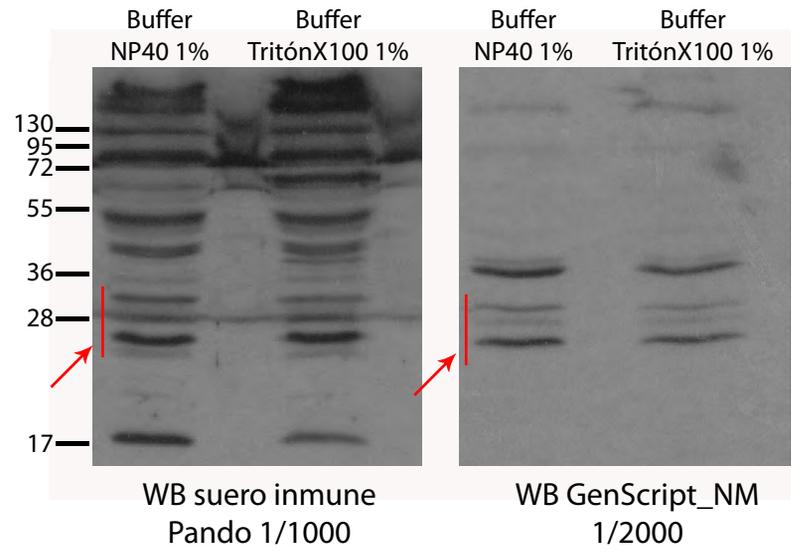


Realizamos un *Western blot* sobre estos lisados con el suero de Pando y el anticuerpo GenScript_NM y no observamos diferencias en la señal en ninguno de los dos casos (**Figura 64A**). No observamos un aumento en la intensidad de ninguna de las bandas, así como tampoco cambió el patrón de bandas que se obtuvo. A pesar de que desconocíamos si alguno de los anticuerpos servía para realizar una inmunoprecipitación, decidimos probarla como nueva estrategia para enriquecer el lisado en CCDC28B. Para esto, utilizamos el anticuerpo GenScript_Gral para inmunoprecipitar a CCDC28B a partir de un lisado de la línea celular HEK293. Como control de la IP, utilizamos la misma proporción de inmunoglobulinas purificadas de conejo (Sigma). Como se observa en la **Figura 64B**, no observamos ninguna banda en la zona de 20-36 kDa que se enriquezca únicamente en la IP con el anticuerpo GenScript_Gral. Incluso con exposiciones mayores no se observó ningún cambio en el patrón de bandeos. En el lisado se observaron las dos bandas en torno a 28 kDa que ya habíamos caracterizado para este anticuerpo y el anticuerpo detectó claramente a la proteína purificada.

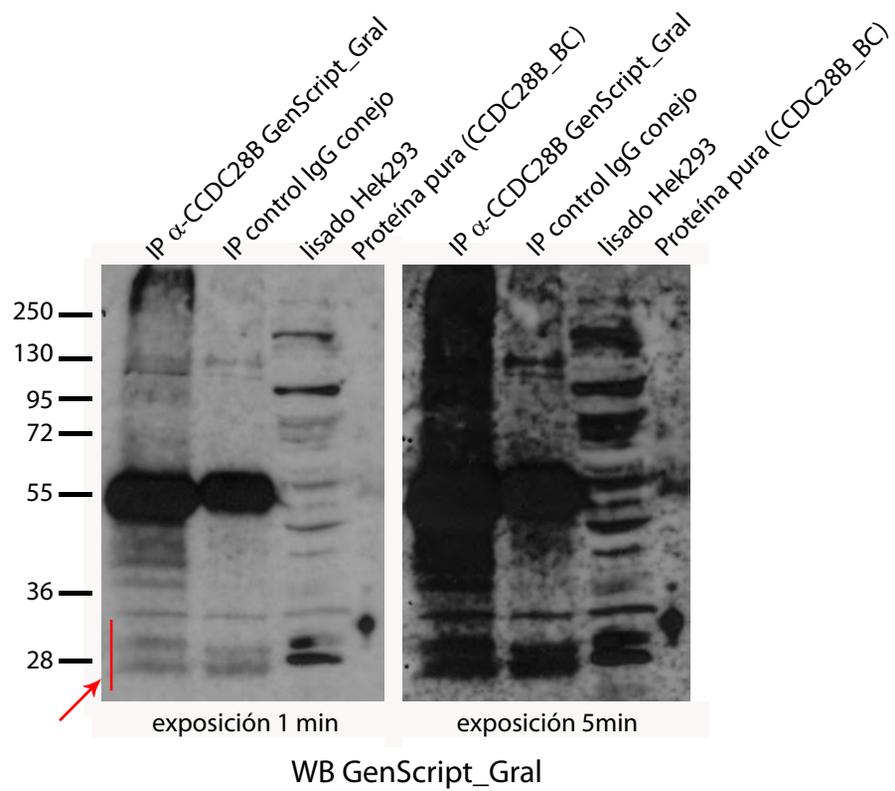
Figura 64_ Prueba para enriquecer lisados en CCDC28B.

A) Análisis de la señal de los anticuerpos anti-CCDC28B (Pando izquierda; GenScript_NM derecha) utilizando dos protocolos diferentes para obtener los lisados celulares. No se observaron cambios por utilizar el detergente NP40 o TritonX100. B) Inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo GenScript_Gral a partir de lisados de HEK293. No se observó un enriquecimiento en alguna de las bandas. Geles al 15%.

A



B

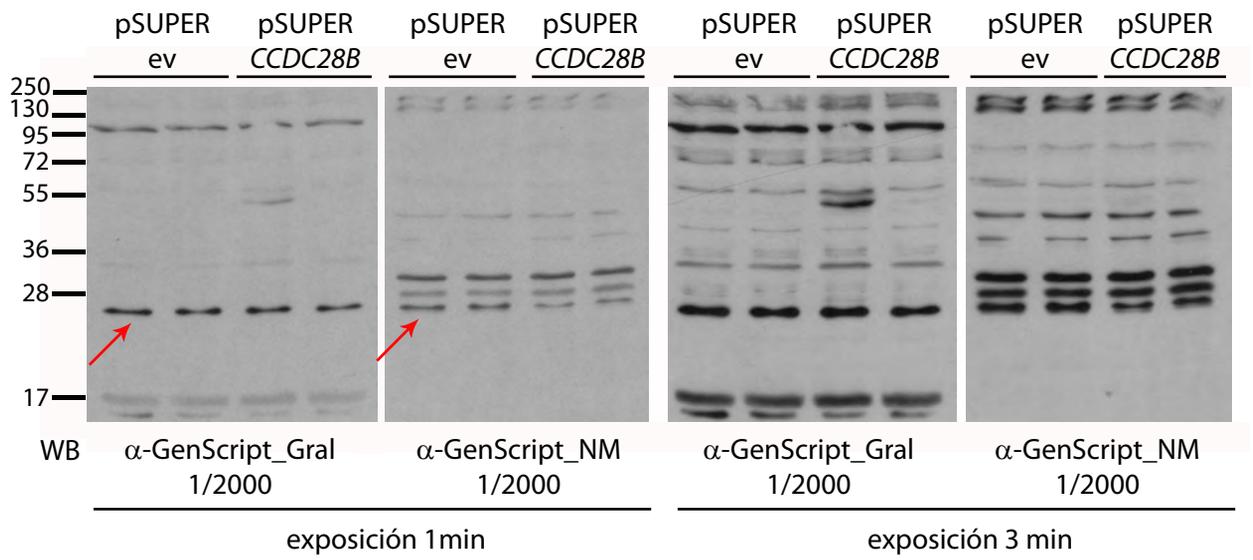
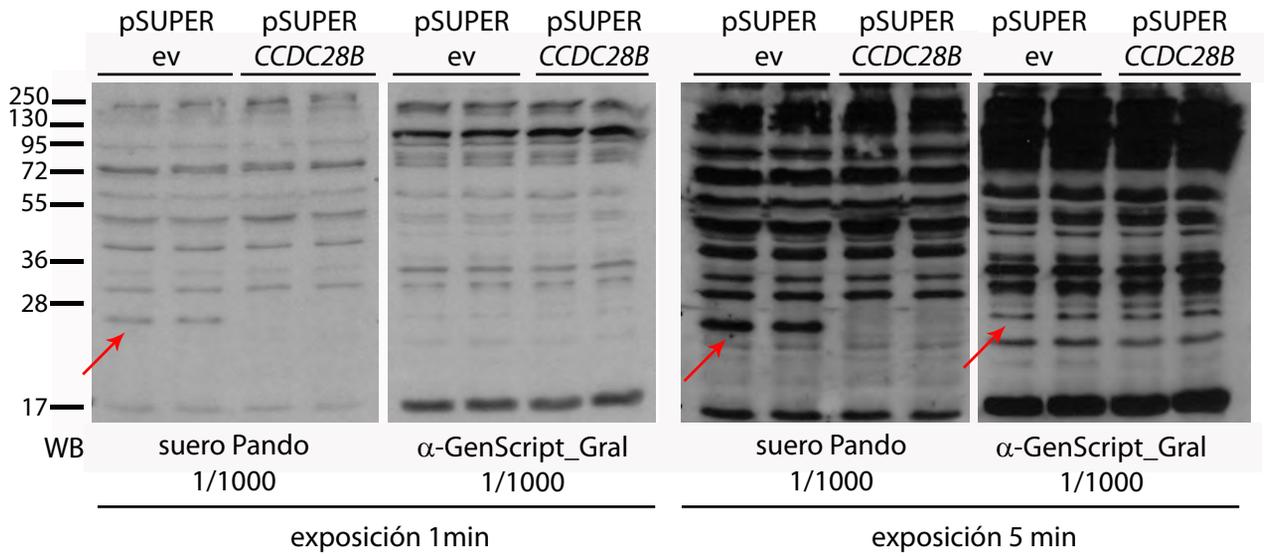


Debido a que ninguno de los experimentos anteriores nos permitió establecer la especificidad de las bandas, decidimos probar la estrategia de inhibir la expresión de CCDC28B y analizar cuál es la banda que desaparece o disminuye en intensidad. En la primera etapa, transfectamos células HEK293 con el pSUPERCCDC28B y analizamos por *Western blot* con los anticuerpos GenScript_Gral y GenScript_NM, qué banda cambiaba. En el caso del anticuerpo GenScript_Gral, observamos una banda mucho más intensa a la altura de 28 kDa, pero no vimos una diferencia clara en la intensidad de esta banda cuando se inhibió la expresión de CCDC28B (**Figura 65A**). Con el anticuerpo GenScript_NM observamos el patrón de tres bandas que caracterizamos previamente y a pesar de que no lo cuantificamos, observamos una disminución en la intensidad de la banda de menor peso molecular. Esta diferencia también se observó cuando se realizaron exposiciones mayores. Interesantemente, esta banda es la que parece migrar a la misma altura que la banda observada con el anticuerpo GenScript_Gral para la que no observamos diferencias. Para determinar si la banda cercana a 28 kDa que reconoce cada uno de estos anticuerpos corresponde a la misma banda que reconocen los otros anticuerpos, decidimos realizar un “stripping” a esas membranas y someterlas a un nuevo *Western blot* cambiando los anticuerpos utilizados. En la membrana que utilizamos con el anticuerpo GenScript_Gral, ahora realizamos un *Western blot* con el suero de Pando. Notablemente observamos que la banda que reconoce en los 28 kDa, desaparece en las muestras transfectadas con el pSUPERCCDC28B (**Figura 65B**). Por medio de superponer las placas de ambos *Western blot*, determinamos que la banda que observamos para el anticuerpo GenScript_Gral corresponde a la banda cercana a 28 kDa que se observa con el suero de Pando. La banda en las muestras de pSUPERCCDC28B no apareció incluso cuando hicimos exposiciones mayores. En la membrana que fue incubada con el anticuerpo GenScript_NM, ahora realizamos el *Western blot* con el anticuerpo GenScript_Gral. En el tiempo de exposición mayor, pudimos determinar que la banda cercana a 28 kDa que reconoce el anticuerpo GenScript_Gral, corresponde a la banda de menor peso molecular reconocida por el anticuerpo GenScript_NM y ésta es la banda que disminuye en las muestras de pSUPERCCDC28B. Este experimento nos permitió definir que la banda cercana a 28 kDa reconocida por todos los anticuerpos podría corresponder a CCDC28B, ya que fue la única que desapareció en las muestras con el pSUPERCCDC28B. Pensamos que la diferencia en la sensibilidad a los cambios en los

niveles de expresión de los distintos anticuerpos puede deberse a diferencias en su afinidad.

Figura 65_ Caracterización por *Western blot* de los anticuerpos anti-CCDC28B por medio de inhibir la expresión con pSUPERCCDC28B.

A) Se utilizaron los anticuerpos GenScript_Gral y NM y se analizó la disminución en la intensidad de alguna de las bandas detectadas en las muestras de pSUPERCCDC28B y con dos tiempos de exposición. Únicamente se detectó una leve disminución de la banda de menor peso molecular que se observa con el anticuerpo GenScript_NM. B) Las mismas membranas fueron sometidas a “stripping” y se realizó un *Western blot* con el suero de Pando y el anticuerpo GenScript_Gral. Con el suero de Pando se observó la desaparición de la banda <28 kDa. Geles al 15%.

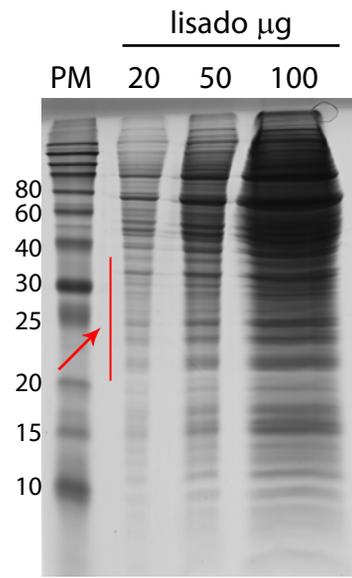
A**B**

Para confirmar con total exactitud que la banda cercana a 28 kDa corresponde a CCDC28B procedimos a la identificación por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF) de esa banda. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo/Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, quienes nos asesoraron, brindaron reactivos y realizaron algunos de los experimentos aquí planteados. En un primer experimento realizamos una electroforesis unidimensional donde corrimos distintas cantidades de un lisado de HEK293 por duplicado. Luego de la electroforesis, el gel fue recortado y una parte fue teñida con azul de Coomassie (**Figura 66A**), mientras que la otra parte fue transferida a una membrana y sometida a un *Western blot* utilizando el anticuerpo GenScript_NM ya que es el que reconoce menos bandas y el que presentó un patrón de bandas más reproducible (**Figura 66B**). A pesar de que en el gel se observaron muchas bandas en la región 20-40 kDa, recortamos las bandas que podrían corresponder a las bandas presentes en el *Western blot*. Esas bandas fueron analizadas por MALDI-TOF-TOF pero no fue posible identificar a ninguna de ellas como CCDC28B. En todos los casos se identificaron proteínas muy abundantes como son un activador del proteasoma o actina.

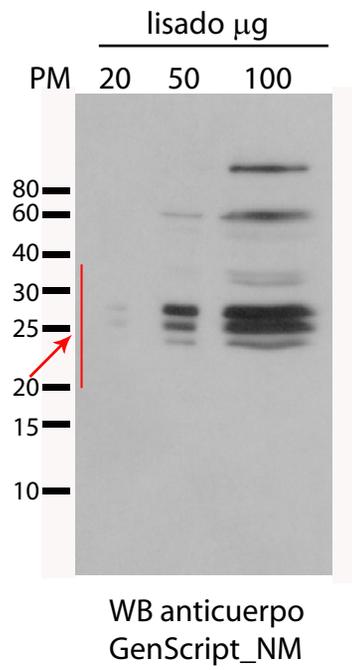
Figura 66_Identificación de las bandas reconocidas por el anticuerpo GenScript_NM por espectrometría de masa. Geles 1D.

A) SDS-PAGE y tinción con Coomassie de lisado de células HEK293 para recortar e identificar las bandas detectadas por el anticuerpo GenScript_NM (Gel al 15%). B) La mitad del gel fue electrotransferido a una membrana y se realizó un *Western blot* con el anticuerpo GenScript_NM. Se recortaron bandas en el rango de 20-40 kDa y se analizaron por MALDI-TOF-TOF.

A



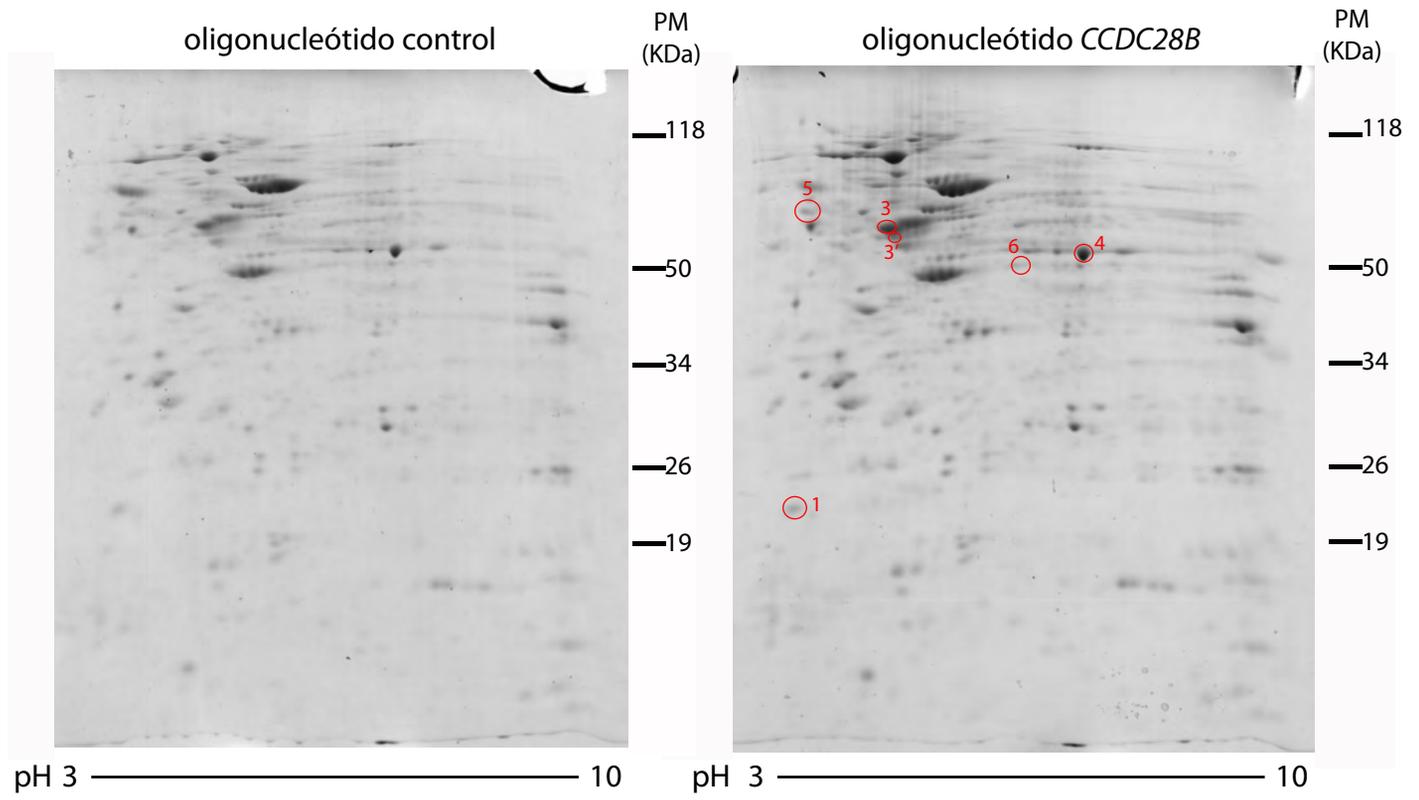
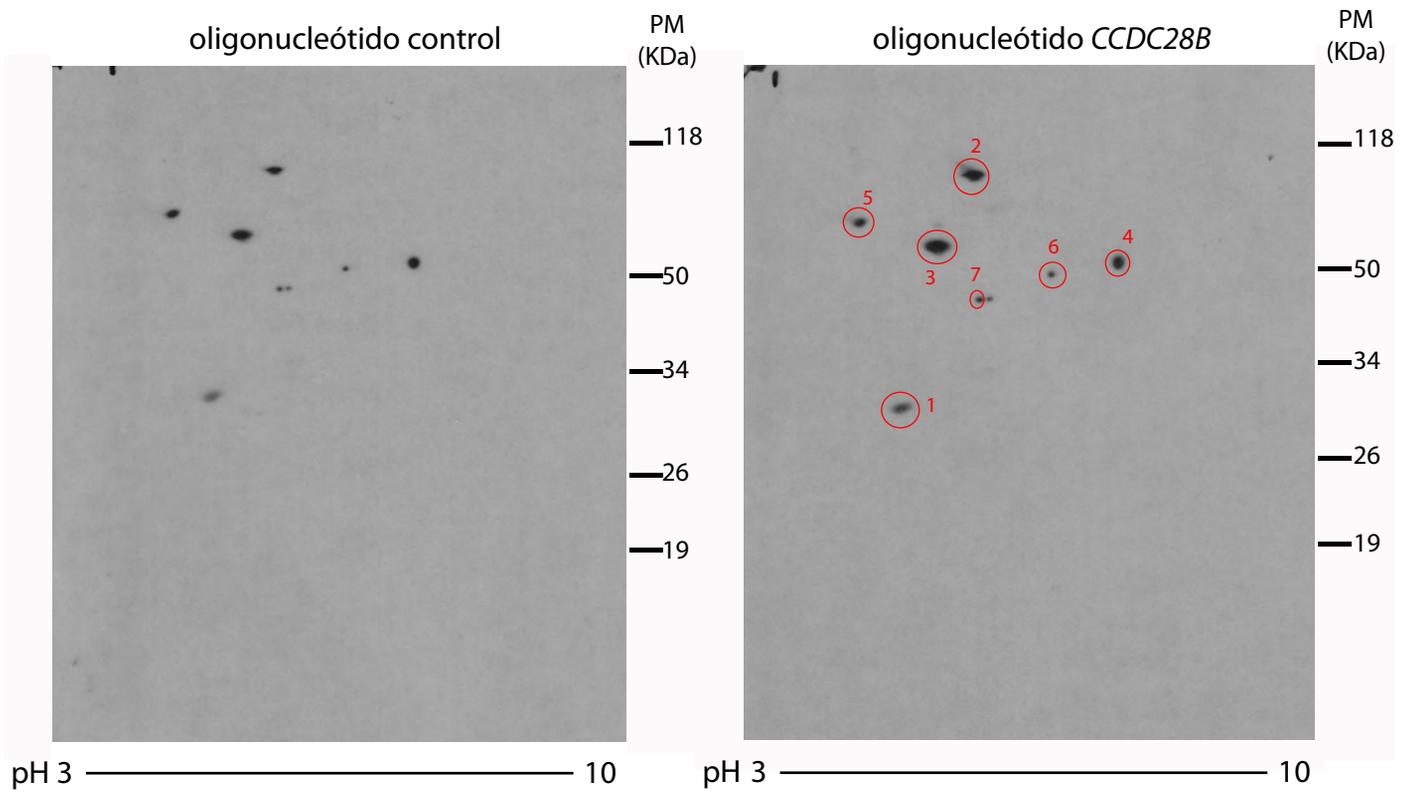
B



Realizamos un segundo intento, el cual consistió en realizar la separación de las proteínas por una electroforesis bidimensional. En este caso utilizamos por un lado unas muestras de células HEK293 en las cuales se inhibió por medio del oligonucleótido de ARN la expresión de CCDC28B. Por otro lado se trabajó con unas muestras de células HEK293 las cuales fueron transfectadas con el oligonucleótido control. Se corrieron cada una de estas muestras y dos de estos geles (oligonucleótido CCDC28B y oligonucleótido control) fueron teñidos con azul de Coomasie (**Figura 67A**) y los otros dos transferidos a una membrana de nitrocelulosa para realizar un posterior *Western blot* (**Figura 67B**). Primero analizamos si se observaban diferencias en la expresión de alguna proteína al inhibir a CCDC28B y no observamos cambios importantes. Notamos que en general la intensidad de todos los “spots” fue más intensa en todo el gel oligonucleótido CCDC28B. Esto pudo deberse a algún error en la cuantificación de las proteínas del lisado. Cuando realizamos el *Western blot* utilizando al anticuerpo GenScript_NM, detectamos la señal de cinco “spots” más fuertes y dos más tenues, numerados como 1-7 en el gel oligonucleótido CCDC28B de la **Figura 67B**. Por el peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos (22 kDa y PI 5,23), el único “spot” que podría corresponder a CCDC28B_NM es el número uno, sin embargo no observamos diferencias en su intensidad comparado con el gel control. Esto quizás fue debido a que la intensidad de todos los “spots” del *Western blot* en el gel oligonucleótido CCDC28B fueron más intensos porque como se determinó por la tinción por azul de Coomasie, se sembró mayor cantidad de proteína total. Utilizamos el programa Melanie 6.0 (Genebio. Swiss Institute of Bioinformatics) para determinar en el gel teñido con azul de Coomasie la localización posible de esos siete “spots” detectados en el *Western blot*. Se identificaron cinco de esos “spots”, los cuales se indican en el gel oligonucleótido CCDC28B de la **Figura 67A**. Se recortó un sexto “spot” (numerado como 3’) por no estar del todo seguros de la localización del spot número 3. Estas muestras fueron analizadas por MALDI-TOF-TOF y nuevamente no pudimos identificar a CCDC28B en ninguno de los “spots” analizados. Todas las proteínas identificadas fueron proteínas de muy alta abundancia, como son Prostaglandin E sintasa 3, β -Tubulina, Enolasa 1, entre otras. Se probó hacer una digestión teórica de la secuencia de CCDC28B_NM y se buscó específicamente si se identificaba algún espectro de esos péptidos trípticos en los “spots” analizados. Tampoco se encontraron evidencias de la presencia de ellos en ninguna de las muestras.

Figura 67_ Identificación de las bandas reconocidas por el anticuerpo GenScript_NM por espectrometría de masa. Geles 2D.

A) SDS-PAGE bidimensional y tinción con Coomassie de lisados de células HEK293 transfectadas con el oligonucleótido de *CCDC28B* (derecha) o el oligonucleótido control (izquierda, Geles al 12.5%). B) Las muestras de A) fueron corridas por duplicado y las réplicas fueron transferidas a una membrana sobre la cual se realizó un *Western blot* con el anticuerpo GenScript_NM. Con círculos rojos se indican los “spots” que fueron seleccionados para ser recortados de los geles mostrados en A) y analizados por MALDI-TOF-TOF.

A**B**

A pesar de los experimentos realizados aún no hemos podido determinar la identidad de las bandas que se observan con los diferentes anticuerpos de CCDC28B. Pudimos sí definir que la banda cercana a 28 KDa es compartida por todos los anticuerpos y que esa banda podría corresponder a CCDC28B, ya que es la que disminuye en intensidad o desaparece cuando inhibimos su expresión. Actualmente seguimos trabajando en esta parte de la tesis, con el propósito de poder determinar la especificidad de las bandas que reconocen los anticuerpos de CCDC28B, sin descartar nuevos intentos para producir otros anticuerpos.

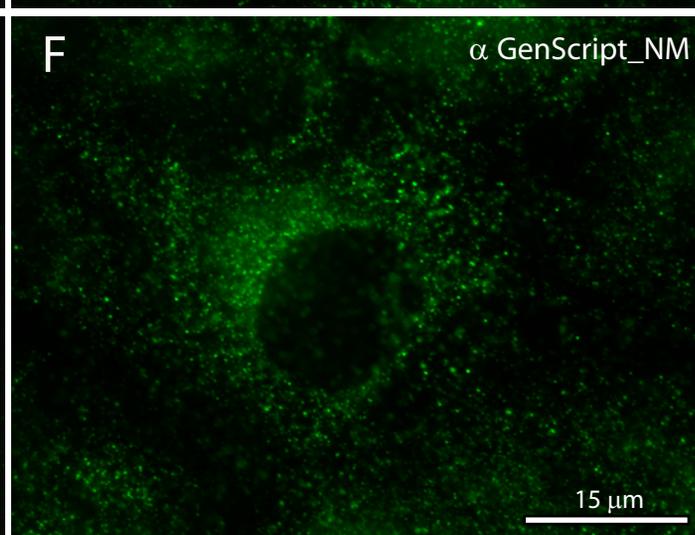
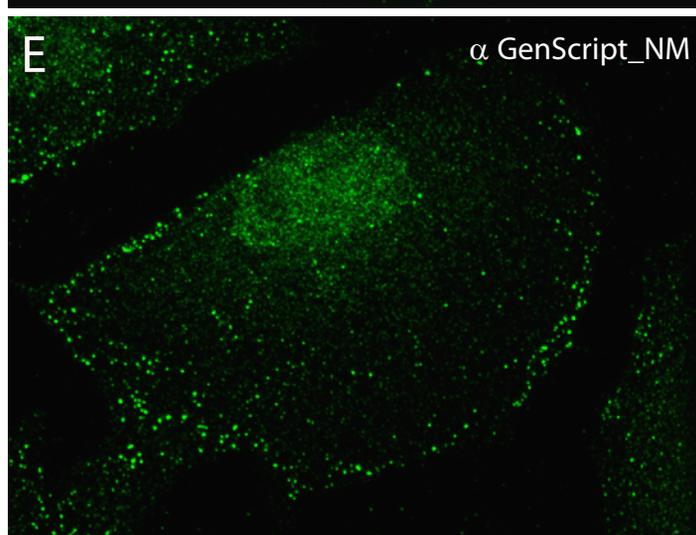
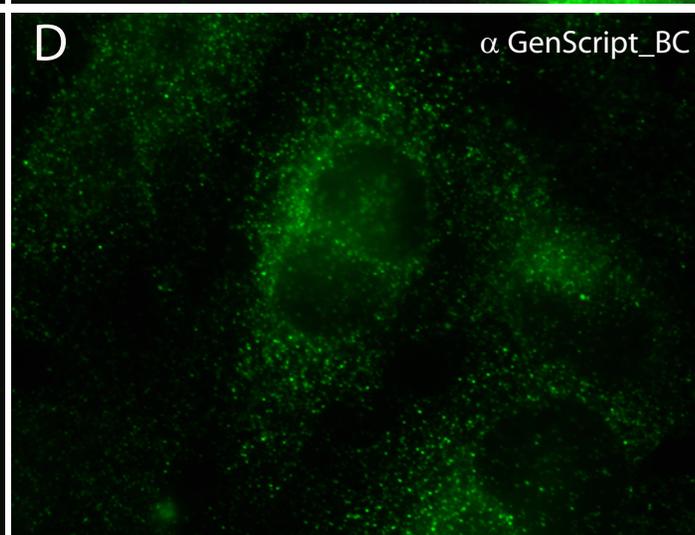
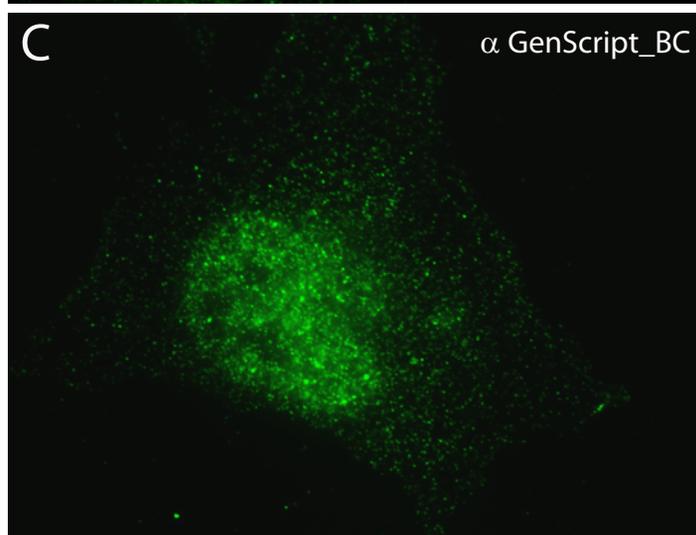
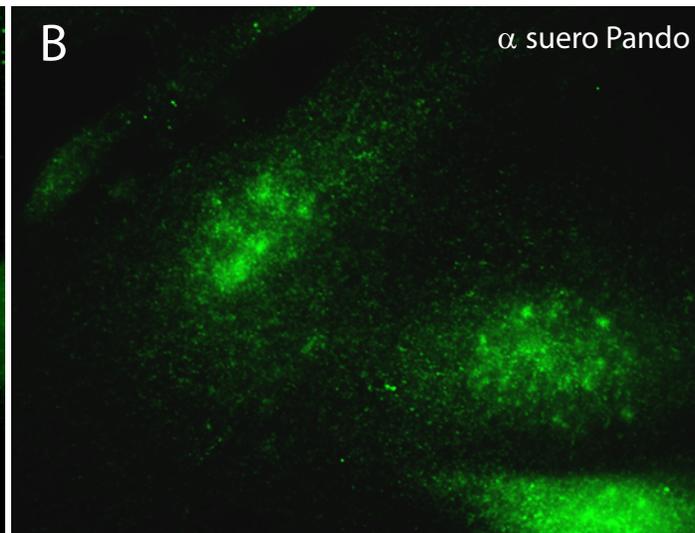
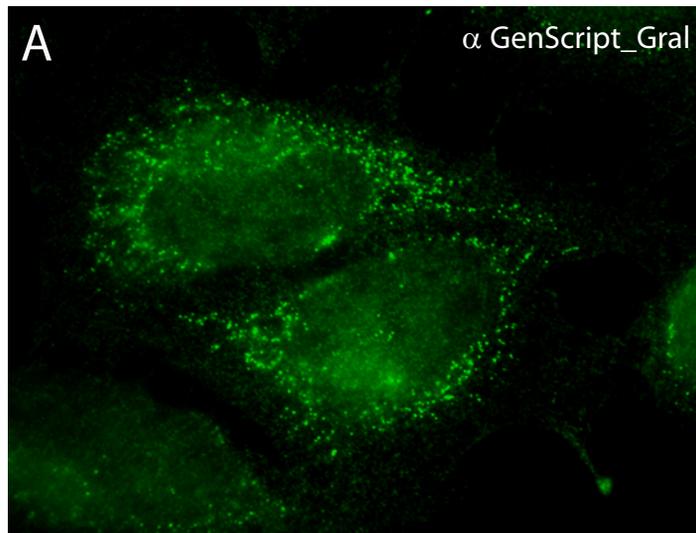
Puesta a punto de nuevos anticuerpos contra CCDC28B: Ensayos de inmunocitoquímica

De manera paralela a los ensayos de *Western blot*, decidimos determinar el patrón de señal de los anticuerpos nuevos en inmunocitoquímica (IC). Para reducir las variaciones propias de cada línea celular y teniendo en cuenta que la isoforma CCDC28B_BC solo está presente en *H. sapiens*, trabajamos únicamente con la línea celular humana HeLa. Lo primero que realizamos fue determinar la mejor dilución para cada uno de estos anticuerpos y en todos los casos utilizamos el protocolo de fijación con PFA 4% y permeabilización con TritónX100 0,1%. Se probaron varias diluciones y en función de la intensidad de la señal, seleccionamos como diluciones de trabajo las de 1:1000 para el anticuerpo GenScript_Gral, 1:500 para GenScript_BC, 1:500 para GenScript_NM y 1:500 para el suero Pando. Como se observa en la **Figura 68A**, el anticuerpo GenScript_Gral presentó una señal de aspecto puntuado, tipo vesicular, fuertemente concentrada en la región perinuclear y con una leve señal a nivel nuclear. Cuando analizamos el suero de Pando, la señal que observamos fue muy diferente (**Figura 68B**). Observamos una señal muy concentrada en el compartimento nuclear, donde incluso se observaron zonas de mayor concentración de la señal. A nivel citoplasmático la señal fue de aspecto puntuado pero de intensidad mucho menor. A pesar de que los dos patrones de señal observados fueron diferentes, ambos fueron reproducibles en los distintos experimentos que realizamos y observamos muy poca variación de la señal entre células de un mismo cultivo. Sin embargo, cuando analizamos la señal de los anticuerpos GenScript_BC y NM, observamos una gran variación del patrón de la señal entre células de un mismo cultivo.

Por ejemplo, para el anticuerpo GenScript_BC observamos células que presentaron una fuerte marcación a nivel nuclear y una leve señal citoplasmática (**Figura 68C**), así como células que presentaron una señal concentrada en la región perinuclear y sin señal nuclear (**Figura 68D**). En el caso del anticuerpo GenScript_NM observamos células que presentaron señal a nivel nuclear y una clara señal puntuada localizada en el borde de la célula (**Figura 68E**), así como células con señal puntuada concentrada en la región perinuclear y excluida del núcleo (**Figura 68F**). Las diferencias en la señal de estos dos anticuerpos, nos dificultó el poder definir cual de todas las señales corresponde realmente a CCDC28B. Sin embargo y a pesar de que las señales no parecen ser exactamente iguales, creemos que existe una cierta similitud entre el patrón de señal de las imágenes B, C y E por un lado y el de A, D y F por otro. Es importante mencionar que tampoco con ninguno de estos anticuerpos pudimos recapitular la localización reportada de CCDC28B en centrosomas y/o cuerpo basal. El patrón de señal concentrada en la región perinuclear y nuclear que observamos con estos anticuerpos, es similar a la que determinamos con el primer suero de Pando que realizamos contra CCDC28B (ver **Figura 58**).

Figura 68_Caracterización de los nuevos anticuerpos contra CCDC28B por inmunocitoquímica.

A) Patrón de señal del anticuerpo GenScript_Gral en células HeLa. La señal observada fue concentrada en la región perinuclear. B) Patrón de señal del suero Pando donde se observa una fuerte marcación a nivel nuclear. C-D) El patrón de señal del anticuerpo GenScript_BC varió entre células de un mismo cultivo, siendo concentrada en la región nuclear (C) o en la región perinuclear (D). E-F) Con el anticuerpo GenScript_NM también se observó una variación intra-cultivo del patrón de señal, observándose células con marcación nuclear y en la periferia celular (E) y otras con marcación citoplasmática (F).

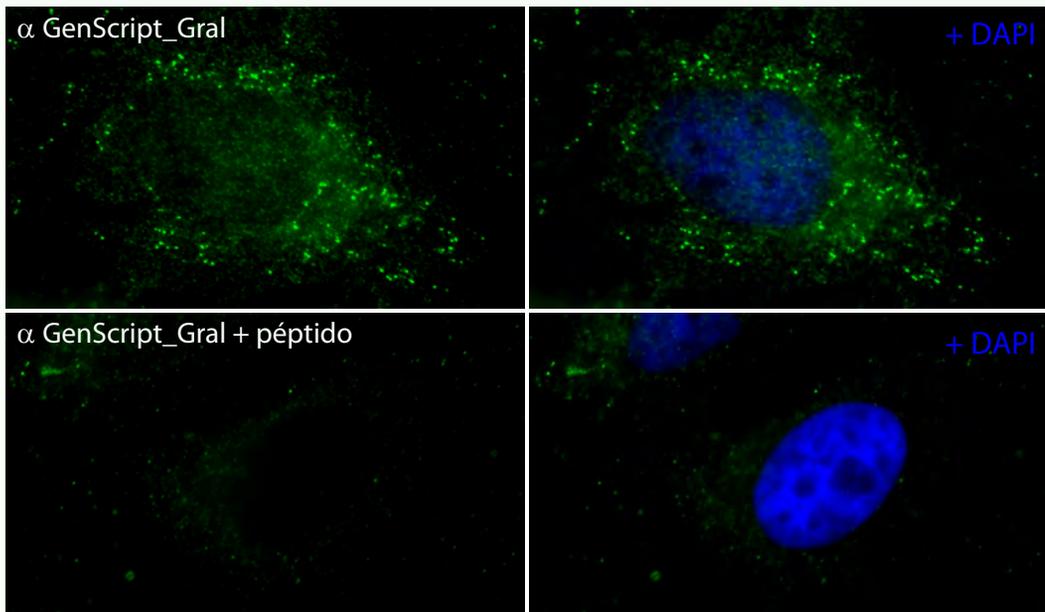


Debido a las diferencias que observamos entre las señales de nuestros distintos anticuerpos así como la posible discrepancia con la localización reportada previamente, consideramos que era extremadamente importante definir si la señal que observábamos era específica de CCDC28B. Para esto, el primer experimento que realizamos consistió en verificar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos GenScript por los péptidos con los cuales fueron diseñados. Para esto, realizamos un experimento donde previamente a realizar la IC, incubamos los anticuerpos GenScript con su péptido correspondiente. Estos péptidos fueron aportados por la empresa GenScript junto con los anticuerpos y fueron los péptidos que se utilizaron para inmunizar a los conejos para producir los sueros inmunes y posteriormente para purificar por afinidad esos sueros. Se incubó toda la noche el anticuerpo con el péptido correspondiente (en igual número de moles) y se realizó la IC con el mismo protocolo utilizado anteriormente, solo que en este caso utilizamos la mezcla anticuerpo+péptido como anticuerpo primario. Como se puede observar en la **Figura 69**, en los tres casos la señal de los anticuerpos GenScript desapareció casi completamente al ser incubados con el péptido. Esto nos indicó que los tres anticuerpos son capaces de reconocer eficientemente a esas secuencias peptídicas y que la señal que observamos en las IC podrían deberse al reconocimiento de esos epítopes endógenos. Sin embargo, con ese experimento y considerando los resultados de los *Western blots*, aún no era posible definir si la señal que observábamos era CCDC28B o alguna otra(s) proteína(s) con secuencia similar y también reconocida por estos anticuerpos.

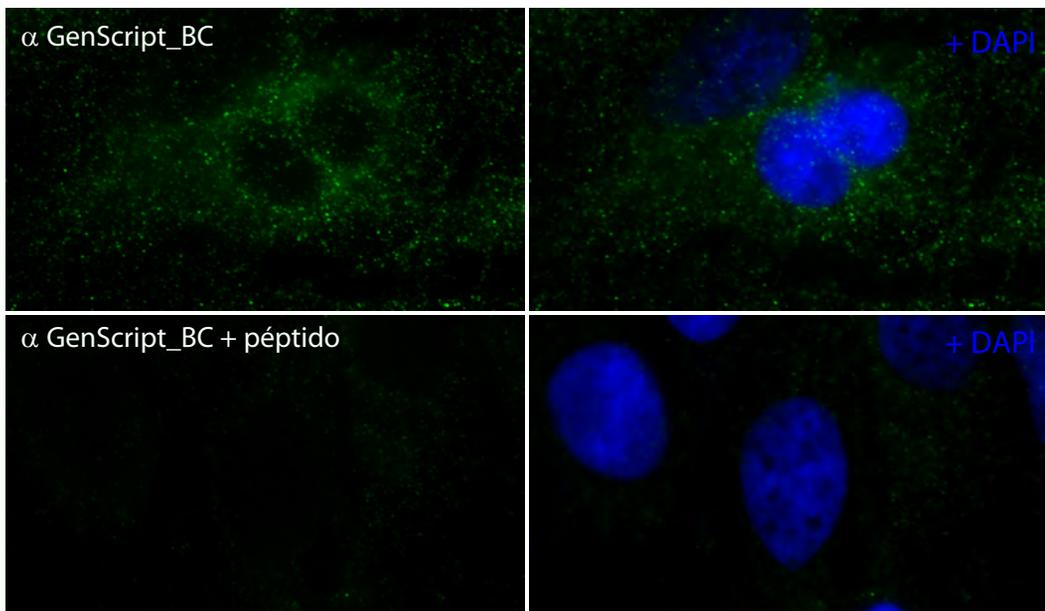
Figura 69_Determinación de la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos GenScript.

A) Inmunocitoquímica en células HeLa utilizando el anticuerpo GenScript_Gral (panel superior) o GenScript_Gral pre- incubado con el péptido (panel inferior). B-C) Mismos experimentos pero utilizando el anticuerpo GenScript_BC (B) o GenScript_NM (C). La incubación con cada uno de los péptidos determinó la desaparición de la señal observada.

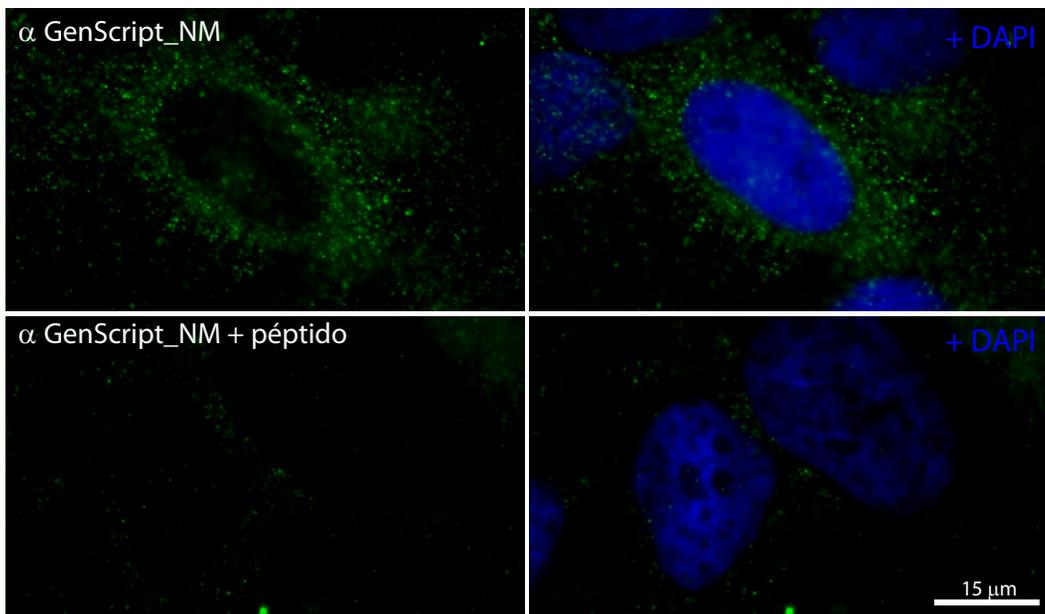
A



B



C

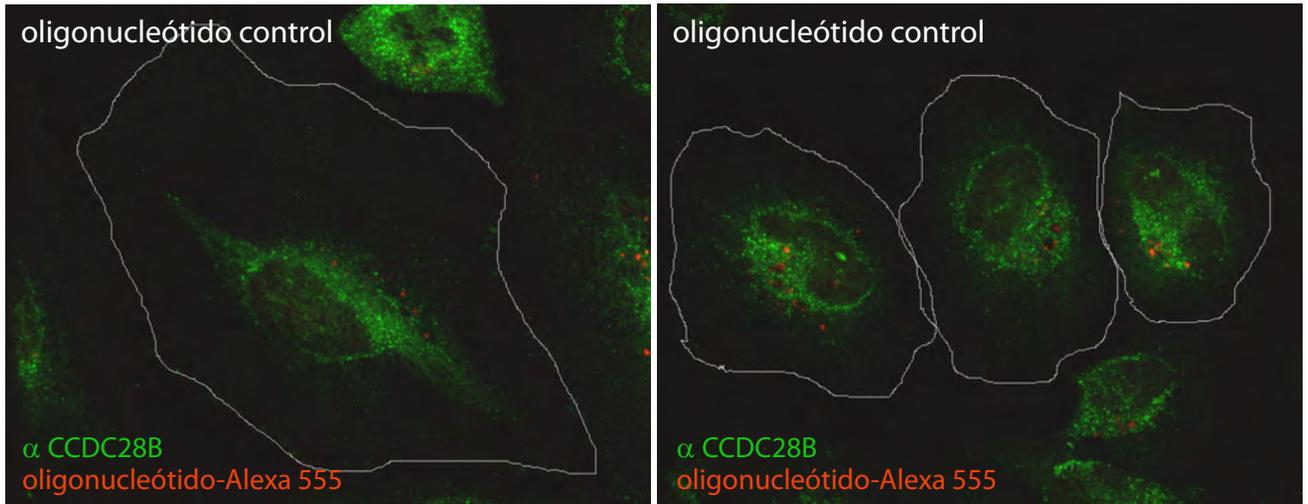


El segundo experimento que nos planteamos para seguir abordando el tema de la especificidad fue el de reducir la expresión de CCDC28B con el oligonucleótido de ARN y determinar qué señal desaparece o reduce su intensidad en la IC. Para hacer ese experimento decidimos trabajar únicamente con el anticuerpo GenScript_Gral, ya que de los anticuerpos purificados éste es el único con el que se observa un único tipo de patrón de señal. Para esto, se transfectaron células HeLa con el oligonucleótido control o el oligonucleótido CCDC28B y en ambos casos se transfectaron esos oligonucleótidos junto con un oligonucleótido control de la transfección, el cual no hibrida con ninguna secuencia conocida y está conjugado a un fluoróforo (Alexa 555). Se seleccionaron campos al azar y se registraron imágenes con los mismos parámetros de captura. Luego, utilizando el programa ImageJ (NIH), se delimitó en cada imagen el área de aquellas células transfectadas (Alexa 555 positivas) que entraban completamente dentro de la imagen y se midió la densidad óptica integrada (DOI) de esas áreas definidas, para luego calcular el promedio de las DOI obtenidas. Cuando analizamos las imágenes (**Figura 70**) observamos una leve reducción de la señal concentrada alrededor de los núcleos y un menor número de “puntos” intensos, pero el análisis estadístico de esas cuantificaciones no mostró que esa aparente diferencia fuese significativa ($P > 0,01$). A pesar de que estos resultados son aún preliminares y debemos ajustar algunas condiciones y repetir este tipo de experimento, el resultado que obtuvimos no nos permite al momento determinar si la señal que observamos con el anticuerpo GenScript_Gral corresponde únicamente a la localización de CCDC28B. A futuro sería importante caracterizar los otros anticuerpos y en particular el anticuerpo GenScript_NM para el cual pudimos observar una reducción de señal por medio de *Western blot*.

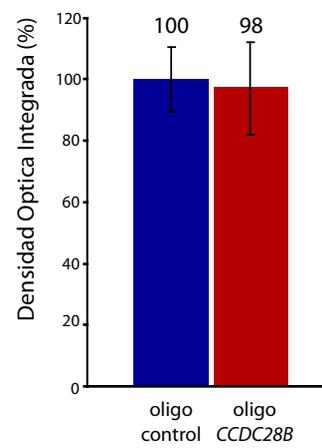
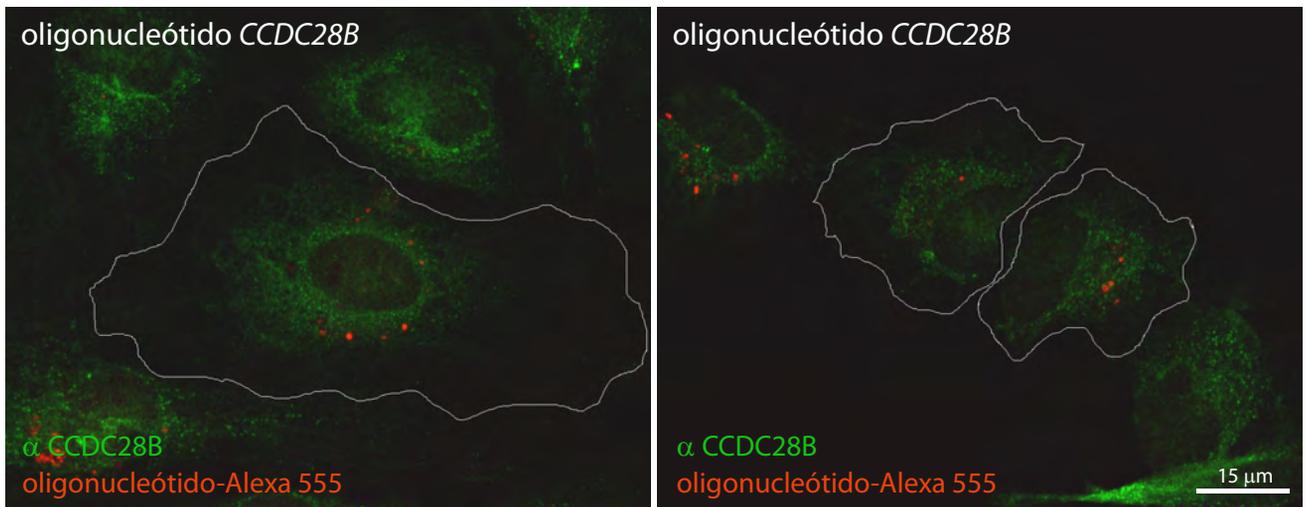
Figura 70_ Caracterización del patrón de señal del anticuerpo GenScript_Gral por medio de la inhibición de la expresión de CCDC28B.

Células HeLa fueron transfectadas con el oligonucleótido control (A) o con el oligonucleótido de CCDC28B (B) y en ambos casos junto a un oligonucleótido que permitió identificar a las células transfectadas (puntos rojos). Se realizó una inmunocitoquímica con el anticuerpo GenScript_Gral y se capturaron imágenes con iguales parámetros. Por medio del programa ImageJ se delimitaron las células y se determinó la densidad óptica integrada. En la parte inferior se presentan los valores graficados. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones ($P > 0.01$).

A



B



Una dificultad que encontramos en estos estudios fue la alta variabilidad en el patrón de localización de CCDC28B no solo al usar distintos anticuerpos sino también dentro de un mismo cultivo. Por este motivo intentamos caracterizar en mayor detalle la variación que observamos en el patrón de señal del anticuerpo GenScript_NM (ver **Figura 68**). A pesar de que esa variación también la observamos con el anticuerpo GenScript_BC, decidimos enfocarnos únicamente en la variante NM, porque por los resultados de los *Western blot* no podemos afirmar que la variante BC se expresa a nivel de proteína. Otro aspecto por el cual elegimos centrarnos en el anticuerpo GenScript_NM, es el hecho de que este fue el anticuerpo que en *Western blot* reconoce un menor número de bandas (ver **Figura 63**).

Para tratar de entender en mayor detalle esa variación observada, decidimos sincronizar un cultivo celular y analizar el patrón de la señal a distintos tiempos post-sembrado. Durante 24hs se mantuvo un cultivo celular sin suero y luego se levantaron y se sembraron distintos grupos de células, los cuales fueron fijados a las 6, 8, 12 o 24hs post-sembrado. Luego realizamos la IC en las mismas condiciones antes mencionadas y registramos por microscopía confocal campos al azar de cada condición (**Figura 71**). En la IC se utilizó también un anticuerpo anti α -Tubulina para observar los límites celulares, así como un marcador nuclear. A partir de una primera observación, decidimos definir tres categorías para la posterior cuantificación, las cuales fueron la presencia de señal dentro del núcleo, la ausencia de señal dentro del núcleo y una señal tipo “punto” que observamos muy concentrada dentro del núcleo. Se realizó un conteo en cada imagen obtenida de cuántas células había en cada una de estas categorías y se analizaron los resultados (**Figura 72**). A partir de este análisis pudimos observar que se redujo la variación intra-cultivo que observábamos en los cultivos no sincronizados y que el patrón de señal predominante varió a lo largo del tiempo post-sembrado. A las 6 hs post-sembrado el 100% de las células presentaron señal principalmente a nivel nuclear, con una señal a nivel citoplasmático muy débil, y un 41% de las células presentó la señal tipo “punto” de fuerte intensidad dentro del núcleo. A las 8 hs post-sembrado también el 100% de las células presentó señal a nivel nuclear pero se redujo a un 20% el número de células que presentaron la señal puntual. A pesar de que no lo cuantificamos, nos pareció que la señal a nivel del núcleo fue un poco más intensa, así como nos pareció que

la señal a nivel citoplasmático fue mayor. A las 12 hs post-sembrado observamos el mismo porcentaje de células con la señal puntual pero detectamos un 4% de células que no presentaron señal a nivel del núcleo. La señal tanto a nivel nuclear como citoplasmático nos pareció que fue de intensidad mayor. A las 24 hs post-sembrado fue cuando detectamos la principal variación en el patrón de la señal, ya que un 74% de las células pasó a no tener señal a nivel nuclear y solo se detectó un 1% de células con la señal tipo “punto”. En este caso, la señal fue principalmente citoplasmática con un aspecto puntuado (**Figura 71**).

A pesar de que es necesario repetir este tipo de experimentos y definir la especificidad de la señal de este anticuerpo, creemos que estos resultados nos podrían estar indicando que la localización de CCDC28B podría ser muy dinámica y estar relacionada con la etapa del ciclo en que se encuentre la célula. Esto es un aspecto que será necesario profundizar en futuros experimentos ya que también nos aportará mucha información sobre los procesos celulares en los cuales participa CCDC28B, en particular en lo que respecta al vínculo entre CCDC28B, SIN1 y ciliogénesis, punto que ampliaremos en la discusión.

En suma, si bien durante el desarrollo de esta tesis no pudimos terminar de caracterizar la localización de CCDC28B, creemos que el conjunto de datos preliminares que aquí presentamos, nos permitirán en un futuro orientar nuestros experimentos para poder definir finalmente cual es la localización celular de CCDC28B, parámetro que consideramos sumamente importante para entender su función.

Figura 71_Análisis de la relación entre el patrón de señal del anticuerpo GenScript_NM con el tiempo de sembrado.

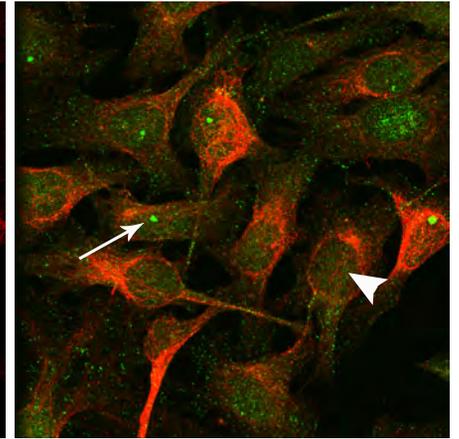
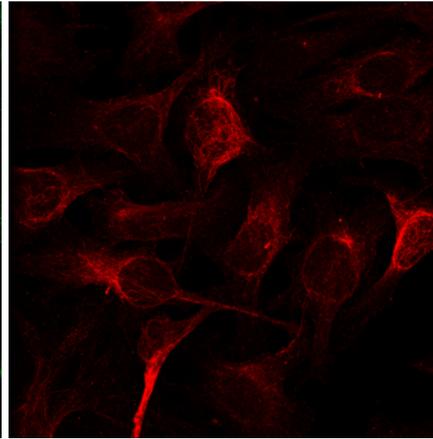
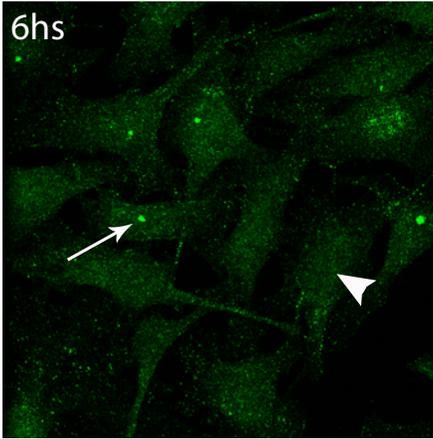
Células HeLa fueron sembradas para realizar una inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo GenScript_NM a distintos tiempos post-sembrado. Se analizaron los tiempos de 6, 8, 12 y 24 hs. Se utilizó un anticuerpo anti α -Tubulina para poder visualizar los contornos de las células y un marcador nuclear (no mostrado). Se registró por microscopía confocal y se cuantificó el porcentaje de células en cada condición que presentaban señal en las tres categorías definidas (ver Figura 72). Las flechas delgadas indican células con la señal tipo “punto” dentro del núcleo, las flechas anchas indican células sin señal dentro del núcleo y las cabezas de flechas indican células con señal dentro del núcleo.

α CCDC28B
GenScript_NM

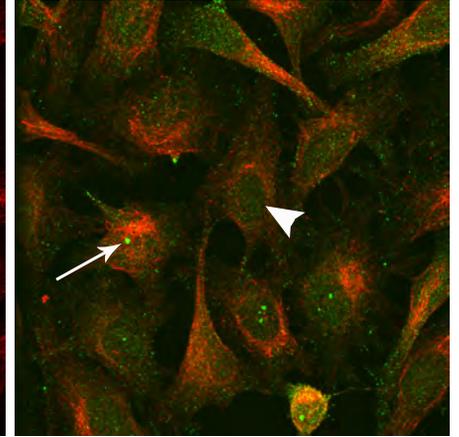
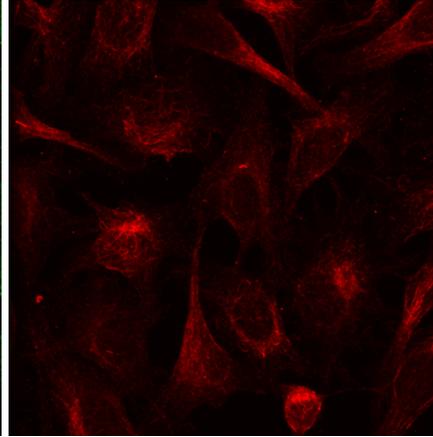
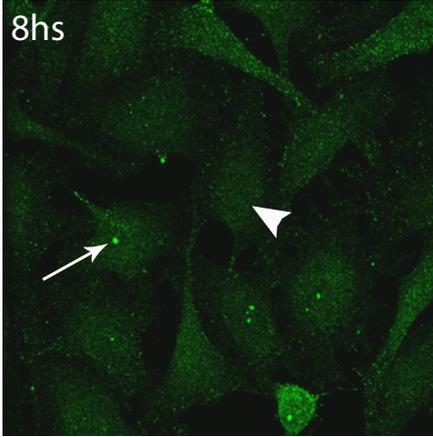
α Tubulina

superposición

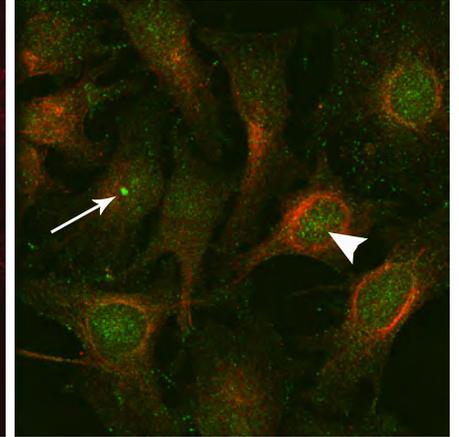
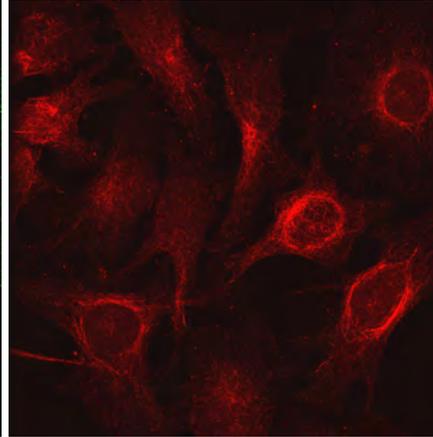
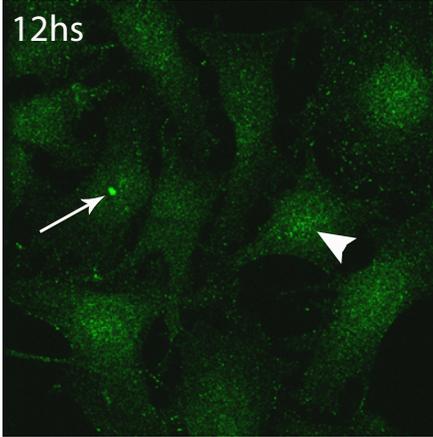
6hs



8hs



12hs



24hs

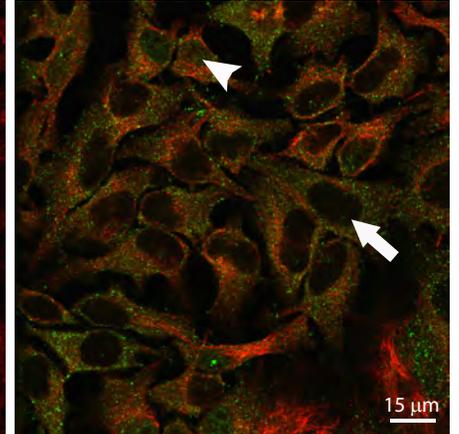
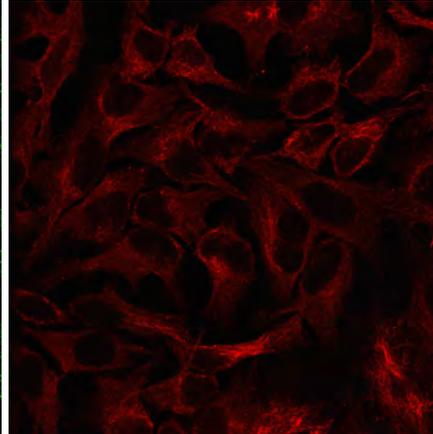
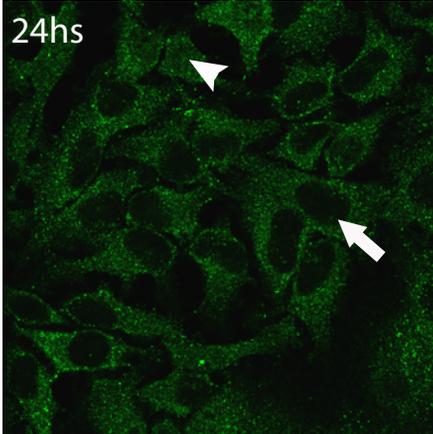
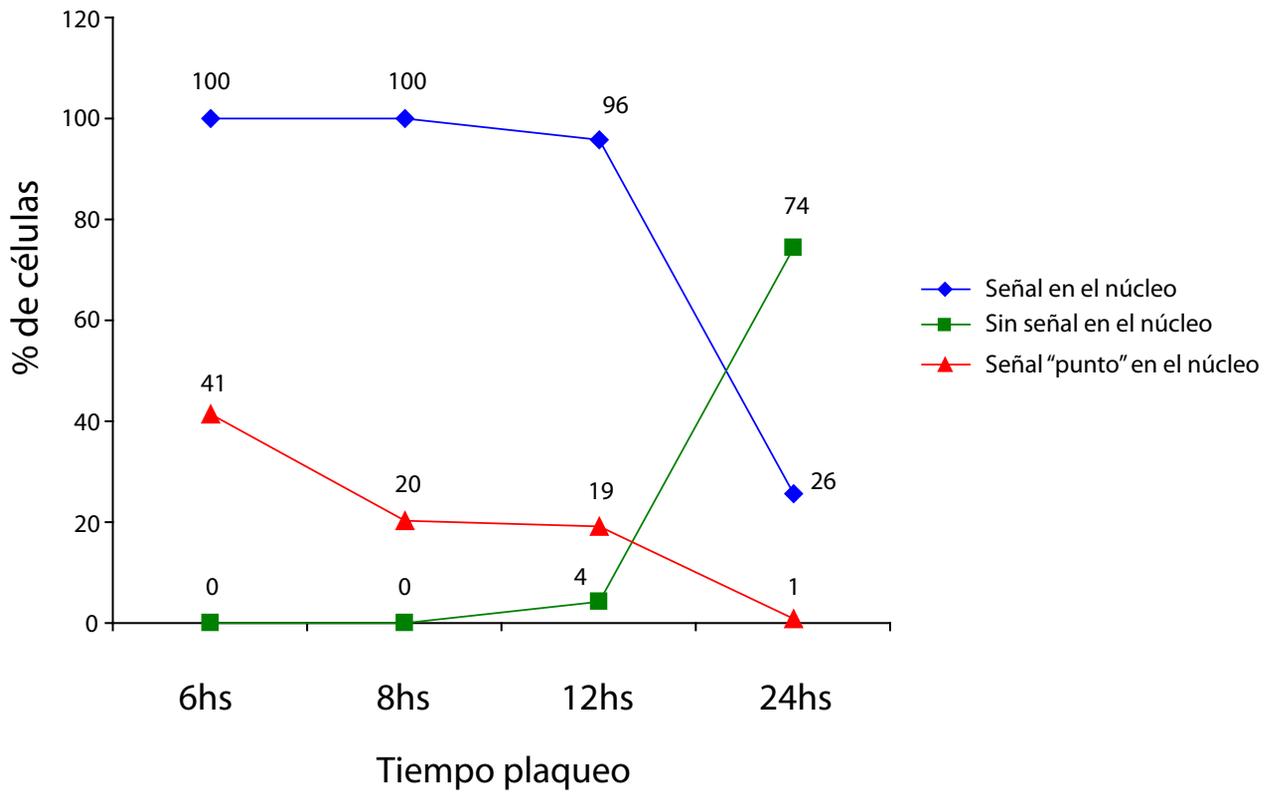


Figura 72_Cuantificación de la relación entre el patrón de señal del anticuerpo GenScript_NM con el tiempo de sembrado.

Para la determinación de los cambios en el patrón de señal, se definieron tres categorías: presencia de señal a nivel de núcleo, ausencia de señal a nivel nuclear y presencia de una señal fuerte y tipo “punto” dentro del núcleo.



Parte F_Generación de una línea de ratón Knock-out para *Ccdc28b*.

Como parte de la tesis de doctorado planteamos el desarrollo de un modelo animal para poder obtener información sobre la función *in vivo* de CCDC28B. La propuesta original consistió en desarrollar una línea transgénica en ratón, en la cual el gen de *Ccdc28b* haya sido eliminado (ratón *Knock-out*, KO). Este modelo no solo tendría el potencial de permitir evaluar y validar los resultados que se obtuvieron *in vitro*, sino que también la posibilidad de evaluar el efecto modificador que se ha reportado de CCDC28B sobre otros genes BBS.

Esta parte del proyecto fue abordada desde el inicio de la tesis, pero por dificultades técnicas aún al día de hoy no se ha completado. Debido a que fueron muchos los experimentos y el esfuerzo que realizamos para lograr avanzar, quisimos de igual modo presentar los resultados que obtuvimos y las dificultades que enfrentamos. Es importante mencionar que esta parte del trabajo fue realizado en colaboración con la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo, quienes colaboraron con nosotros para obtener los resultados que aquí se presentan.

Vector

Para modificar el locus de *Ccdc28b* en ratón, trabajamos con un vector generado por el proyecto “Knock Out Mouse Project” (KOMP) del National Institute of Health (NIH). Este proyecto tiene como objetivo generar una fuente pública y exhaustiva de células madre embrionarias (células ES, del inglés *embryonic stem cells*) de ratón que contienen una mutación nula en cada gen del genoma del ratón. Dependiendo de la etapa de avance del proyecto con respecto a cada gen, KOMP puede comercializar los vectores, las células madre con el locus ya modificado o la línea transgénica ya realizada. Al momento de comenzar con la tesis, KOMP únicamente ofrecía el vector para modificar el locus de *Ccdc28b*. Fue así como adquirimos este vector y comenzamos el proceso para generar nosotros la línea transgénica KO.

El vector que utilizamos consiste del plásmido R3R4_pBR_DTA+_Bsd_amp, al cual se le ha incorporado el gen completo (exones e intrones) de *Ccdc28b* (indicados como bloques amarillos E1-E6 en la **Figura 73A**). Este vector contiene dos tipos de módulos de selección. Por un lado contiene tres casetes para seleccionar positivamente aquellas células que incorporaron el vector. Los casetes indicados como AmpR y BsdR confieren resistencia a la Ampicilina o a la Blastidina en células procariontas o eucariotas respectivamente, y se utilizan únicamente cuando se busca aumentar el número de copias del vector (amplificar). Si el vector se incorpora al genoma por recombinación homóloga, estos casetes se pierden, ya que están ubicados por fuera de los brazos de homología. El vector contiene un tercer casete de selección positiva el cual, a diferencia de los anteriores, es retenido luego de la incorporación al genoma por recombinación homóloga. Este casete consiste de un gen que le confiere a las células resistencia a la Neomicina y Geneticina, bajo la regulación del promotor de la β -actina humana.

Por otro lado, el vector contiene un casete de selección negativa, el cual consiste del gen de la toxina diftérica A (DTA), regulado por el promotor constitutivo de la quinasa fosfoglicerato 1 (PGK1). Este casete permite eliminar aquellas células madre que integran el vector en un sitio distinto al locus de interés (inserción al azar), debido a que al no ocurrir la recombinación en las secuencias de homología, se retiene y expresa el gen de la DTA lo cual es letal para la célula.

El vector también contiene un casete que permite identificar aquellas células que expresan el alelo de *Ccdc28b* modificado a partir del promotor endógeno de *Ccdc28b*. Este casete contiene 4 módulos en el mismo marco de lectura: en el extremo 5' contiene la secuencia aceptora de *splice* del exón2 del gen del factor de transcripción *engrailed 2* (En2), luego contiene una secuencia de entrada de ribosomas (IRES) seguida del gen de la β -galactosidasa (LacZ) y en el extremo 3' una secuencia poliA. Luego del procesamiento del ARNm (*splice*), la secuencia En2 determinará que el ARNm que se transcriba a partir del alelo modificado contenga todo este casete entre el exón 1 y los exones 2-6. De este modo, en presencia de X-gal, se podrá identificar aquellas células en donde se expresa el promotor de *Ccdc28b*, ya que a partir de la secuencia IRES se podrá traducir la β -galactosidasa.

Este casete tiene la importancia de que es el que determina que la línea de ratón transgénico que se produzca sea un *Knock-out*. Esto se debe a que la presencia de este casete entre los exones 1 y 2 en el ARNm, determinará con alta probabilidad que no se sintetice la proteína correcta. De este modo, cuando la modificación del alelo sea en homocigosis, la línea transgénica será un ratón *Knock-out* de *Ccdc28b*. Sin embargo, y para poder sobrepasar posibles problemas en el desarrollo embrionario que comprometan la viabilidad de la línea transgénica, el vector permite la posibilidad de realizar posteriormente una línea transgénica KO condicional. Esto es posible por la presencia de secuencias de reconocimiento por recombinasas sitio-específicas (sitios LoxP y FRT), flanqueando a este casete, las cuales permitirán posteriormente escindirlo. En el caso particular de *Ccdc28b*, no es posible determinar con antelación si la presencia de este casete en el ARNm modificado determinará una alteración de la proteína sintetizada, ya que el exón 1 no es un exón codificante. En el caso que se elija generar una línea KO condicional (eliminando los casetes LacZ y Neo), es importante conservar los sitios LoxP que flanquean al grupo de exones 2-6. El uso posterior de estos sitios LoxP es lo que determinará la escisión de los exones y la generación de la línea KO de *Ccdc28b*.

Una vez que recibimos los clones de bacterias *E. coli* DH10B conteniendo al vector, lo primero que realizamos fue la verificación de que el vector fuese el correcto. Para esto, luego de purificar el vector a partir de tres colonias bacterianas, realizamos dos PCR diferentes por medio de los cuales finalmente confirmamos la identidad del vector adquirido (**Figura 73B**). Los dos juegos de *primers* utilizados hibridan específicamente con secuencias que están presentes en el vector (LoxP y FRT). La identidad del vector también fue confirmada por medio de la secuenciación de segmentos particulares del vector.

Figura 73_Características del vector para la generación de una línea de ratón *Knock-out* para *Ccdc28b*.

A) Vector elaborado por el consorcio KOMP para poder anular la expresión de *Ccdc28b*. El vector contiene los exones e intrones de *Ccdc28b*, así como presenta casetes para la selección positiva y negativa. B) Confirmación por medio de PCR de la identidad del vector. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5.

Generación y selección de clones de células ES modificadas

El primer paso en la generación de la línea transgénica, consistió en electroporar células madre embrionarias de ratón con el vector linealizado. La linealización se realizó por medio de la digestión con la enzima de restricción AsiSI, la cual contiene un único sitio de corte en todo el vector (**Figura 73A**). Trabajamos con dos líneas de células madre, la línea CK35 (Kress, 1998) y la línea Bruce4 (Kontgen, 1993). La línea CK35 procede de la cepa murina 129/Sv (pelaje agutí) y tiene la ventaja que son células madre que colonizan con alta eficiencia la cresta germinal del embrión. Esto permite que la modificación genética que se realice sea transmitida posteriormente a la descendencia (transmisión a la línea germinal, TLG). Sin embargo esta línea tiene la desventaja de que provienen de embriones de la cepa 129/Sv, la cual no es la cepa murina que ha sido secuenciada (cepa C57BL/6) y a partir de la cual ha sido construido el vector. Esto tiene el potencial problema de que no suceda una completa alineación entre los brazos de homología del vector y de las células madre y determine ya sea un descenso en la eficiencia o directamente una incorrecta recombinación homóloga. Fue por esa posible desventaja que decidimos también utilizar la línea de células madre Bruce4, las cuales provienen de embriones C57BL/6 (color de pelaje negro) pero tienen la potencial desventaja que son menos eficientes en colonizar la cresta germinal.

Luego de la electroporación las células madre fueron seleccionadas por medio de la incubación con Geneticina y posteriormente se aislaron 44 clones sobrevivientes de las células CK35 y 43 clones de las células Bruce4. Se amplificó cada uno de estos clones en dos pocillos de dos placas diferentes. Una de las placas fue congelada, la cual se utilizó posteriormente para recuperar aquellos clones que presentaron la modificación en el locus de interés, y a partir de la otra placa se realizó la extracción del ADN genómico y verificación de la presencia del alelo modificado en el locus de *Ccdc28b*. En el proceso de verificación de la modificación genética, lo primero que realizamos fue un PCR para determinar qué clones tenían incorporado en su genoma al alelo modificado, independientemente de la ubicación. Para esto, se utilizó un juego de *primers* que puede hibridar tanto con el gen de *Ccdc28b* endógeno como con el modificado. Debido a la presencia de un sitio LoxP, los productos de PCR obtenidos serán de diferente tamaño dependiendo de si la amplificación ocurrió desde el alelo “wild type” (wt) o desde el alelo

modificado (ver **Figura 74A**). De este modo, los clones que fueron seleccionados fueron aquellos que en el PCR presentaron dos bandas, la de 185pb a partir del alelo wt y la de 250pb a partir del alelo modificado. En el caso de las células CK35, determinamos que 13 clones contenían el alelo modificado (30%), 15 clones solo contenían el alelo wt (34%) y en 16 clones (36%) no fue posible amplificar ninguno de los dos alelos por partir de poca cantidad de células y poco ADN (**Figura 74**). En las células Bruce4, 16 clones amplificaron las dos bandas (37%), 6 clones resultaron ser negativos (14%) y no fue posible amplificar ninguna banda en 21 de los clones aislados (49%; **Figura 74C**).

Figura 74_PCR para identificar los clones de células ES que incorporaron el vector a su genoma.

A) Descripción y ubicación de los *primers* utilizados, los cuales permiten amplificar a partir del alelo *wt* o específicamente desde el alelo modificado. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. B-C) Ejemplo de un PCR a partir de los clones de las células ES CK35 (B) o Bruce4 (C) donde se pueden visualizar los clones considerados positivos (doble asterisco).

La siguiente etapa consistió en determinar cuáles clones contenían la modificación en el locus de *Ccdc28b*. Para esto, la técnica que se utiliza más comúnmente es la de *southern blot*, utilizando una sonda marcada radiactivamente con CTP- α - 32 P. Fue en esta etapa donde nos enfrentamos a las principales dificultades y fue el paso limitante para poder desarrollar con éxito la línea transgénica.

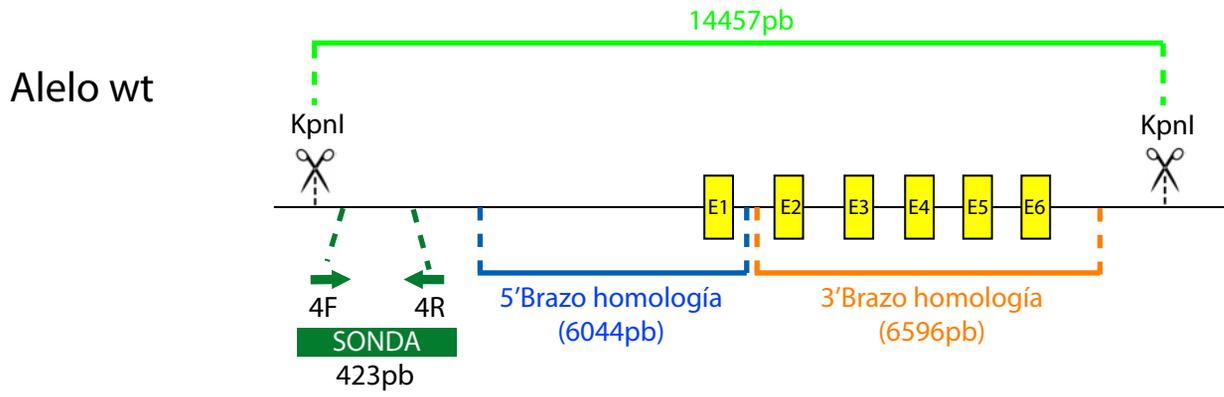
Para realizar el *southern blot*, trabajamos con el ADN del total de los clones aislados, independientemente del resultado del PCR anterior, ya que quisimos evitar descartar posibles falsos negativos que hayamos tenido en el PCR. La estrategia del *Southern blot* que realizamos está esquematizada en la **Figura 75A** y básicamente consistió en digerir el ADN de los clones con la enzima de restricción KpnI, para la cual el alelo modificado tiene un sitio de corte que no se encuentra en el alelo *wt*. Diseñamos y trabajamos con una sonda que es complementaria a una secuencia que se encuentra por fuera del brazo de homología 5'. La digestión con KpnI y la hibridación con la sonda marcada determinan que la banda *wt* que se detecta en el *Southern blot* es de 14457 pb. En el caso en que uno de los alelos de *Ccdc28b* haya sido modificado, en el *southern blot* se detecta una segunda banda de 7973 pb, la cual surge por la presencia del nuevo sitio de corte para KpnI. En la **Figura 75B** se muestra la amplificación a partir de ADN de ratones 129/Sv y C57BL/6 de las sondas que luego fueron purificadas y “marcadas” con CTP- α - 32 P y se utilizaron para realizar el *Southern blot*. En la **Figura 75C** se muestra un gel representativo donde se sometió a una electroforesis el ADN digerido de los clones de células ES para luego ser transferidos a una membrana de nylon y a la hibridación con la sonda.

A pesar de que realizamos varios intentos y cambiamos varias veces las condiciones del *Southern blot*, no pudimos ponerlo a punto y detectar al menos en alguno de los clones la banda correspondiente al alelo *wt* (14 Kb). El no poder superar esa dificultad técnica, nos llevó a plantearnos la posibilidad de cambiar la estrategia y verificar el sitio de inserción del alelo modificado por la técnica de PCR de largo alcance. Esta estrategia tenía la dificultad de que no contábamos con un control positivo, que nos permitiera determinar en los casos en que no detectábamos amplificación, que no se debía al no funcionamiento del PCR.

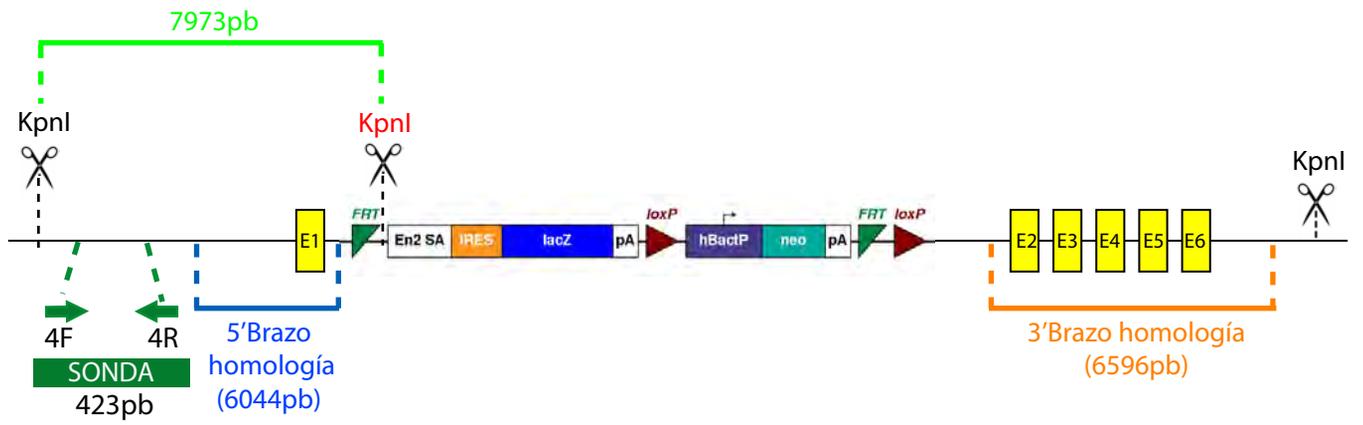
Figura 75_ Pasos preparativos para la realización de un *Southern blot* confirmatorio del sitio de inserción del alelo de *Ccdc28b* modificado.

A) Descripción de la estrategia para el *Southern blot*, donde se indica la ubicación de la sonda y los tamaños de los fragmentos esperados. B) Amplificación por PCR del molde para la posterior síntesis de la sonda marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5. C) Ejemplo de uno de los geles de agarosa previo a ser transferido, donde se corrieron las muestras de los clones de células ES digeridas con la enzima *KpnI*.

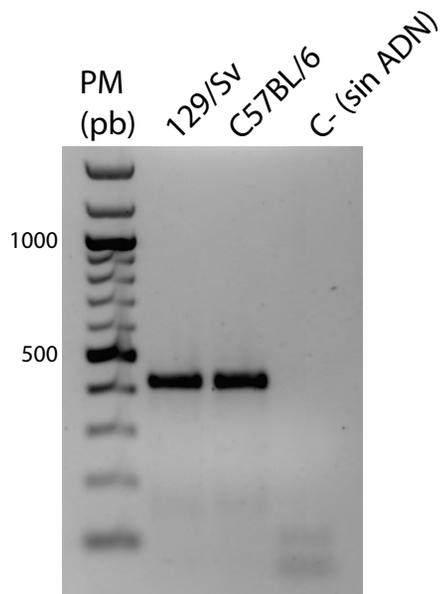
A



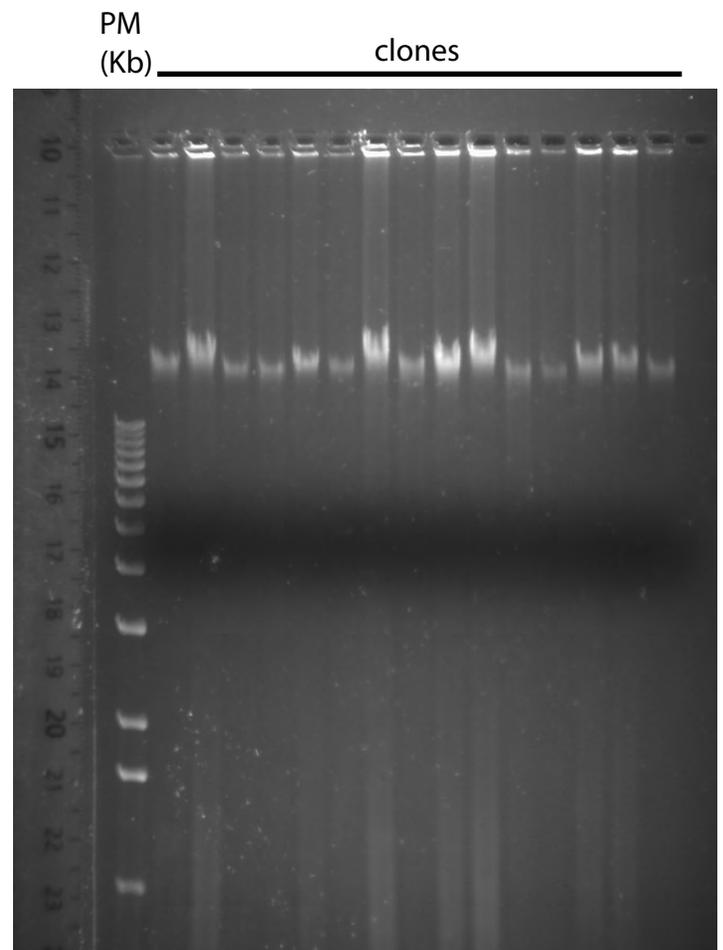
Alelo modificado



B



C



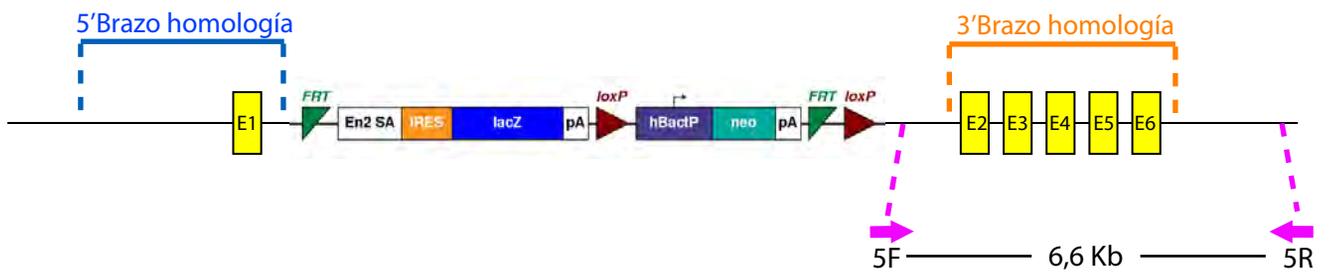
Para verificar el sitio de inserción 3', trabajamos con un juego de *primers*, cuyo *primer forward* únicamente hibrida con una secuencia que proviene del vector y el *primer reverso* hibrida con una secuencia que se encuentra por fuera del brazo de homología 3' (**Figura 76A**). Utilizando esos *primers* se amplifica una banda de 6,6Kb si el alelo modificado se recombinó en el locus de *Ccdc28b*. Pudimos determinar que 5 clones de las células Bruce4 dieron positivo para este PCR (**Figura 76B**), así como dos clones de las células CK35.

Para verificar el sitio de inserción del extremo 5', trabajamos con un juego de *primers* cuyo *primer reverso* hibrida con una secuencia que proviene del vector y el *primer forward* hibrida con una secuencia que se encuentra por fuera del brazo de homología 5' (**Figura 76C**). No pudimos determinar en ninguno de los clones de las células CK35 y Bruce4 si el sitio de inserción 5' era el correcto. Se realizaron varios intentos y se trabajó con más de un juego de *primers* pero no fue posible amplificar una banda del tamaño esperado a partir de este extremo del locus. Es importante mencionar que la cantidad de ADN con la que se dispone de cada clon es la limitante principal para poder realizar más pruebas y repetir los ensayos.

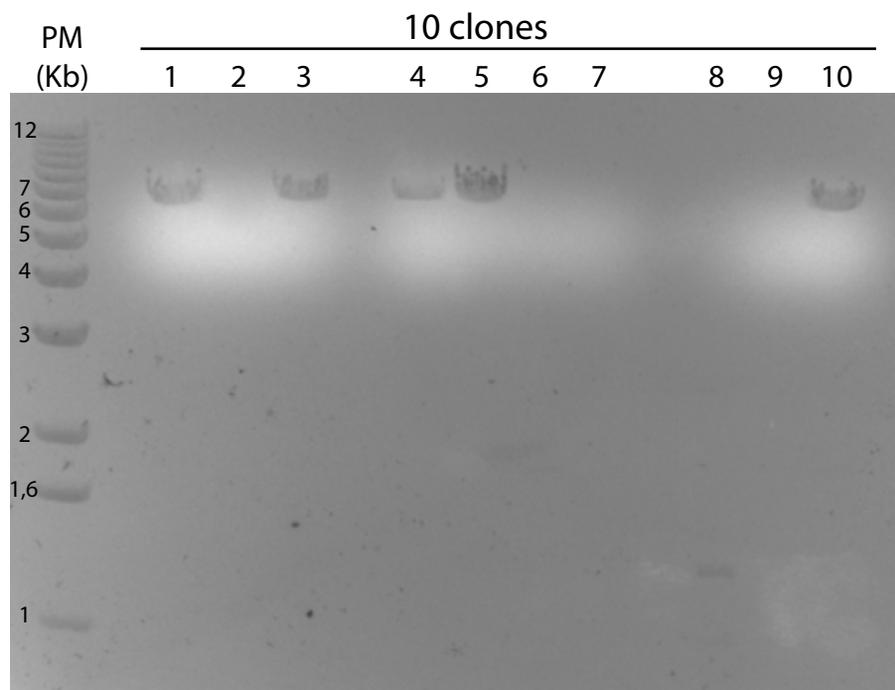
Figura 76_PCR de largo alcance para la confirmación del sitio de inserción del alelo de *Ccdc28b* modificado.

A) Descripción de los *primers* utilizados en el PCR para el brazo de homología 3' y el tamaño del producto de amplificación esperado. B) PCR para el brazo de homología 3' a partir de ADN de células Bruce4. Se detectaron 5 clones positivos. C) Descripción de los *primers* utilizados en el PCR para el brazo de homología 5' y el tamaño del producto de amplificación esperado. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5.

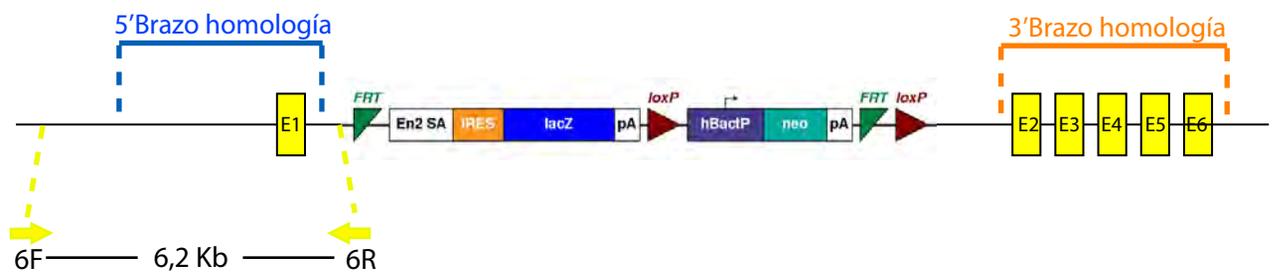
A



B



C



Microinyección de células ES en blastocistos murinos. Generación de la Fo.

A pesar de que no pudimos confirmar que la modificación del alelo de *Ccdc28b* hubiese ocurrido en el locus correcto, decidimos junto con la UATE seguir con las siguientes etapas del proyecto. Esta decisión se basó principalmente en dos motivos. El primer motivo fue que le permitiría a la UATE ganar experiencia en la técnica de microinyección de células ES en blastocistos de ratón, ya que este proyecto de generar una línea de ratón KO fue el primero que realizaron. El segundo motivo fue la posibilidad de tener ratones derivados de esos clones y por ende disponer de una mayor cantidad de ADN, lo que nos permitiría realizar un mayor número de pruebas para verificar el sitio de inserción.

Se inyectaron células ES provenientes de un clon de células CK35 y Bruce4 que resultaron positivos en el PCR para el extremo 3'. Las células CK35 fueron microinyectadas en blastocistos de la cepa C57BL/6 y las células Bruce4 fueron inyectadas en blastocistos de la cepa Balb/c. La elección de esas cepas de blastocistos se debieron a que en la siguiente etapa permitirán determinar simplemente por el color del pelaje, cuáles de los ratones quiméricos Fo pueden transmitir la modificación a la descendencia (ver más adelante). Como se muestra en la **Figura 77A**, se obtuvieron con éxito tres quimeras con las células CK35 (3♂) y dos quimeras con las células Bruce4 (1♀ y 1♂).

A partir del ADN de las colas de estas quimeras se verificó por PCR cuáles tenían el locus modificado, sin considerar su ubicación. Se utilizó el juego de *primers* que solo amplifican a partir del alelo modificado. Determinamos que dos de las quimeras CK35 y las dos quimeras de Bruce 4 contenían el alelo modificado (**Figura 77B**).

Debido a que ahora disponíamos de una mayor cantidad de ADN decidimos retomar la determinación del sitio de inserción del alelo modificado. Por medio de un PCR de largo alcance pudimos determinar en una de las quimeras CK35 (Q2), que el locus modificado estaba inserto en el extremo 3' correcto (**Figura 77C**). La diferencia en el resultado entre estas dos quimeras puede deberse al grado de quimerismo que presenten y es importante recordar que el ADN que se utilizó proviene de la cola del animal, la cual

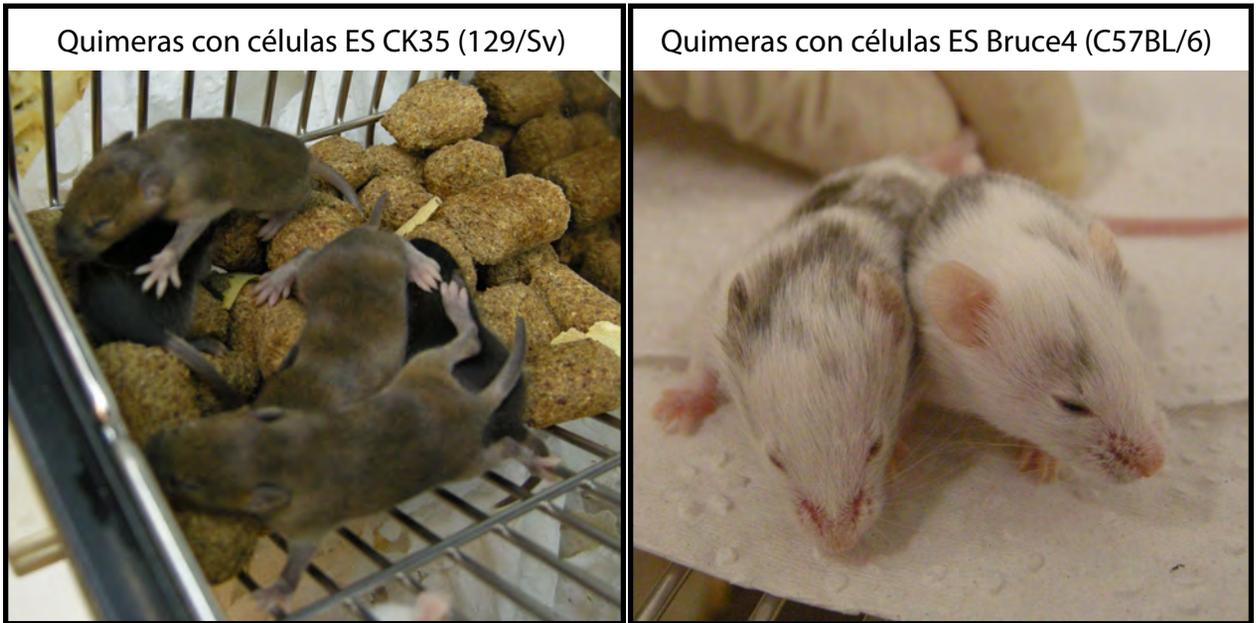
podría no haberse formado a partir de las células ES CK35. También realizamos ese mismo PCR con el ADN de dos clones de células ES CK35, los cuales ya habían sido positivos para este PCR. El clon 2 fue el que se utilizó para obtener las quimeras y volvimos a verificar que el extremo 3' de estos clones está en el lugar correcto (**Figura 77C**). Realizamos varios intentos para verificar la ubicación del extremos 5', pero nuevamente no fue posible determinarlo.

Posteriormente decidimos cruzar las quimeras y analizar si eran capaces de transmitir a la descendencia la modificación del locus de *Ccdc28b*. La decisión de proseguir y obtener la generación F1 de las quimeras se basó en que nos iba a permitir obtener una buena cantidad de ADN para analizar el sitio de inserción de la modificación y en obtener un ADN en el cual no influyera el porcentaje de quimerismo.

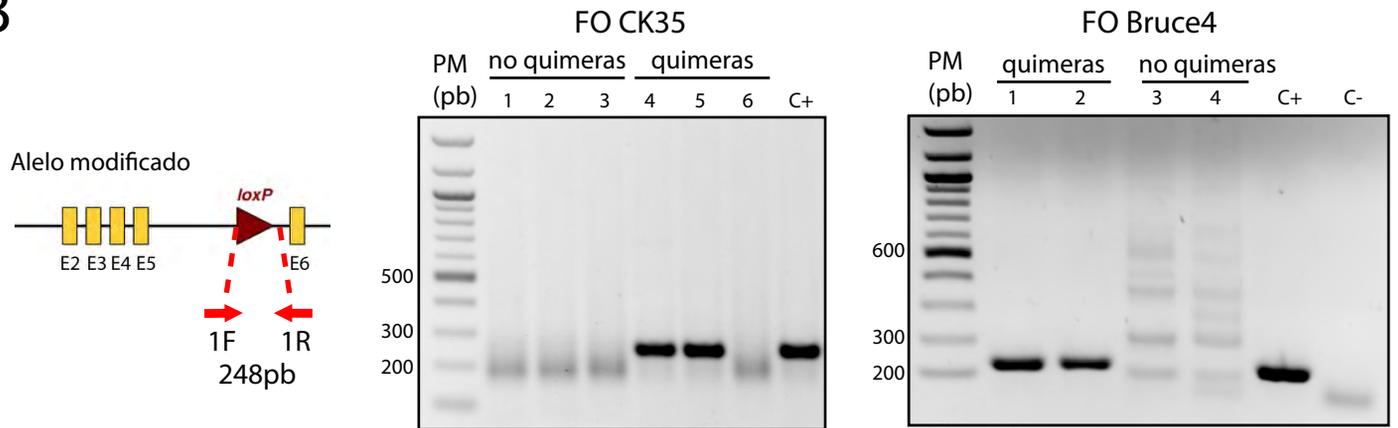
Figura 77_Ratones quiméricos de la línea KO *Ccdc28b*.

A) Foto de los ratones quiméricos nacidos a partir de los clones de células ES CK35 (izquierda) y Bruce4 (derecha). B) Confirmación por medio de PCR de la presencia del alelo modificado en el genoma de los ratones quiméricos. C) PCR de largo alcance para el brazo de homología 3' a partir de ADN de los ratones quiméricos CK35. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5.

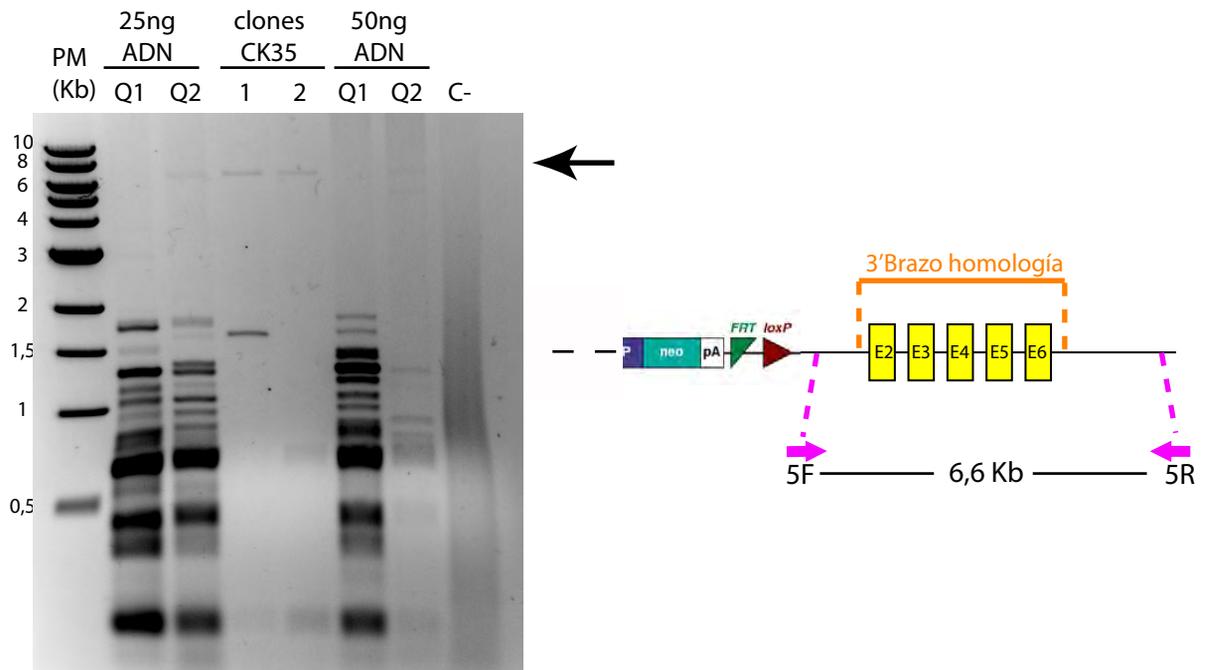
A



B



C



Análisis de la transmisión de la modificación genética a la descendencia. Generación de la F1.

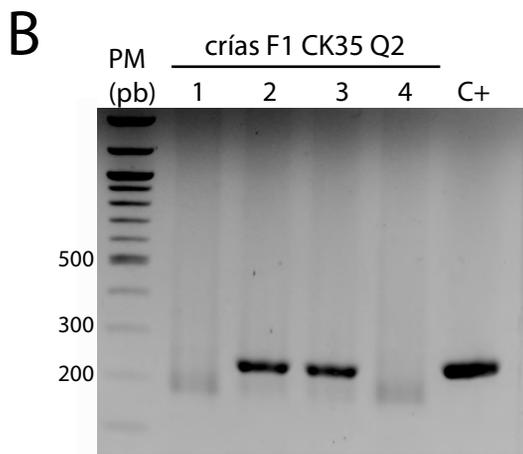
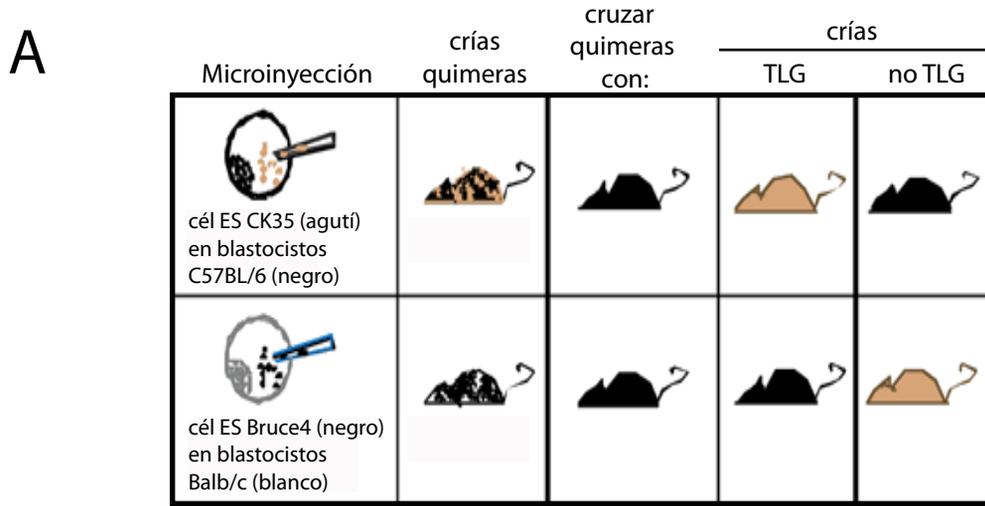
Para determinar si las quimeras son capaces de transmitir la modificación genética realizada a la descendencia, se utiliza un patrón de cruzamientos que permite determinarlo simplemente por el color de pelaje de las crías F1 (ver esquema en **Figura 78A**). En este sentido, cruzamos las dos quimeras CK35 con hembras C57BL/6 y analizamos si se obtenían crías F1 con pelaje agutí. Afortunadamente, todas las crías obtenidas de cinco camadas diferentes de ambas quimeras presentaron un pelaje agutí. Esto indicó que las células ES CK35 colonizaron la cresta germinal de las quimeras y es posible que transmitan la modificación genética a su descendencia. En el caso de las dos quimeras Bruce4, éstas fueron cruzadas con hembras o machos C57BL/6 y se analizó la presencia de crías F1 de color negro (ver esquema **Figura 78A**). Se analizaron once camadas de la quimera macho y seis camadas de la quimera hembra y en todas se obtuvieron únicamente crías con pelaje agutí. Debido a esto, estas quimeras fueron descartadas ya que las células ES Bruce4 no fueron capaces de colonizar la cresta germinal y esas quimeras no son capaces de transmitir la modificación genética a la descendencia.

Debido a que el fenómeno de recombinación homóloga en las células ES ocurre con baja frecuencia, es altamente probable que la modificación ocurra solo en un locus del gen de *Ccdc28b*. Es por esto que se espera que solo el 50% de las crías F1 contengan la modificación genética, la cual estará únicamente en uno de los dos locus (tg/+). A partir de cada camada obtenida, se realizó la extracción de ADN a partir de un segmento de la cola y se realizó un genotipado por PCR para detectar la presencia del locus modificado. Utilizamos el juego de *primers* que solo hibridan con una secuencia proveniente del vector, por lo que el PCR solo amplifica si el alelo modificado está presente (**Figura 78B**).

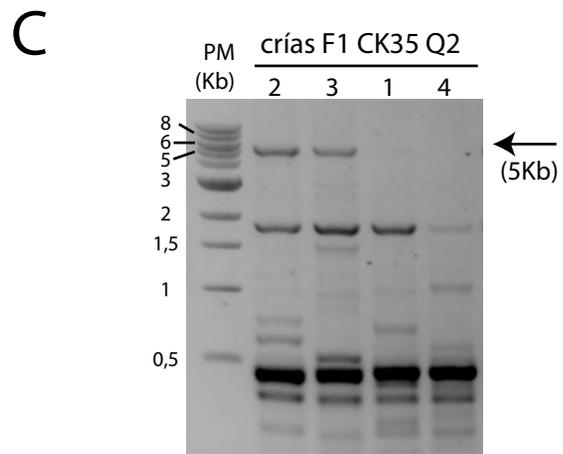
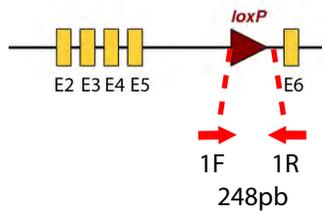
A partir del ADN de las crías F1 se realizaron varios intentos para determinar el sitio de inserción en el extremo 5'. A pesar de que logramos obtener una banda de alto peso molecular (5 kb), en ningún caso pudimos obtener la banda del tamaño esperado (6,2 kb; **Figura 78C**).

Figura 78_Análisis de la F1 de la línea KO *Ccdc28b*.

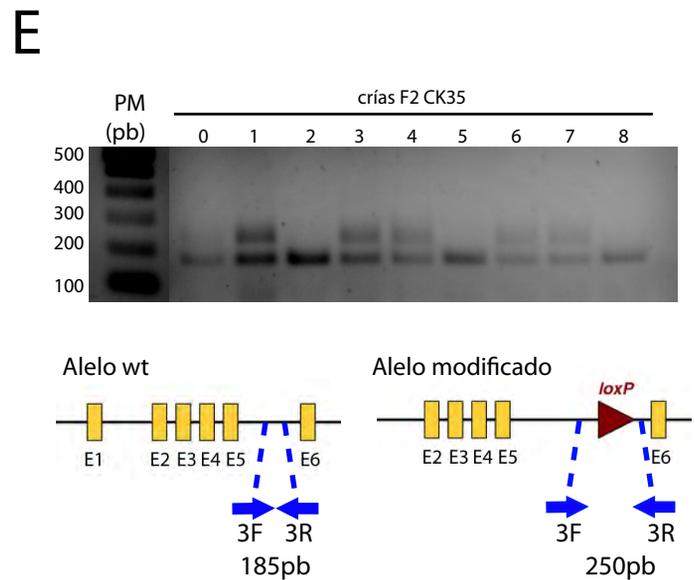
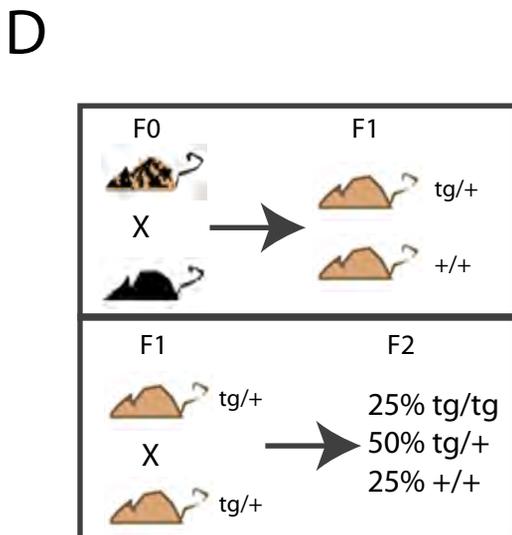
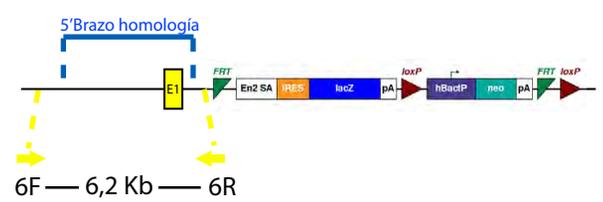
A) Esquema del patrón de cruzamientos que permite determinar por el color de pelaje la transmisión de la modificación genética a la descendencia. B) PCR para confirmar la presencia del alelo de *Ccdc28b* modificado en el genoma de las crías F1 CK35. C) PCR de largo alcance para el brazo de homología 5' a partir de ADN genómico de las crías F1 CK35. Los *primers* utilizados están detallados en la Tabla 5.



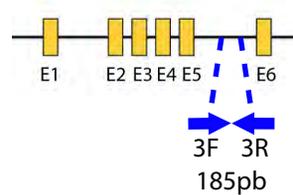
Alelo modificado



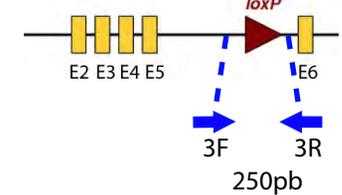
Alelo modificado



Alelo wt



Alelo modificado



Generación de la F2.

El último intento que realizamos para determinar si la modificación genética estaba realmente ubicada en uno de los locus de *Ccdc28b*, fue el de generar la F2 y analizar en ella el porcentaje de crías homocigotas y heterocigotas que se obtenía. Pensamos que si la modificación genética estaba presente en el locus de *Ccdc28b* se esperaba que a partir del cruzamiento de un macho F1 positivo (tg/+) con una hembra F1 positiva (tg/+) se obtenga por camada un 25% de animales homocigotas para la modificación (tg/tg; **Figura 78D**). Se analizaron hasta tres camadas por medio de un PCR utilizando el juego de *primers* que permite amplificar tanto desde el alelo wt como desde el alelo modificado. En ninguna de las camadas analizadas se detectaron animales que fueran homocigotas para la modificación, o sea que en el PCR presentaran únicamente la banda de 250pb (**Figura 78E**).

Este resultado nos indicaba que a pesar de que el alelo modificado estaba integrado al genoma del clon de células ES utilizado (y en los animales derivados de éste), es muy probable que no estuviese inserto en el locus de *Ccdc28b*.

Fue justo en ese momento que KOMP comienza a comercializar las células ES con la modificación ya realizada en el locus de *Ccdc28b*. Esto nos llevó a evaluar que en términos de costos/beneficios nos era más conveniente adquirir esos clones y realizar nosotros las siguientes etapas, partiendo desde la microinyección de esas células ES en blastocistos. Fue así que recientemente adquirimos dos clones de la línea de células ES JM8A3.N1 (cepa murina C57BL/6N, clones DEPD00562_1_A_06 y F06) con la modificación en el locus de *Ccdc28b*. La modificación que poseen es exactamente la misma que nosotros buscamos realizar, ya que se utilizó el mismo vector que nosotros adquirimos previamente. El sitio de inserción de la modificación en estos clones fue analizado por medio de PCR de largo alcance en el extremo 3' y el 5' y resultó ser el correcto (locus de *Ccdc28b*). En esos clones también se determinó que únicamente se insertó en el genoma una copia del alelo modificado, que más del 50% de las células ES de estos clones son euploides y que ambos clones conservan el cromosoma Y. Actualmente nos encontramos en la etapa de microinyectar esas células ES y obtener las quimeras correspondientes.

Discusión

En esta sección buscamos analizar en una manera integrada los resultados como forma de evidenciar las posibles conexiones entre ellos. Debido a esto es que no seguimos la misma organización con la que fueron presentados.

Vinculando a CCDC28B con la biología de las ciliadas: CCDC28B es una proteína conservada en los metazoos ciliados.

En la primera parte de la tesis analizamos por medio de herramientas bioinformáticas, la secuencia génica y proteica de CCDC28B y elaboramos un árbol filogenético con todas las especies en las cuales encontramos su secuencia. CCDC28B es una proteína que fue originariamente relacionada con las ciliadas a través de la identificación de mutaciones en su gen que modulan el fenotipo de pacientes con la ciliopatía BBS (Badano, 2006). A pesar de que la metodología que utilizamos tiene características predictivas, consideramos que los resultados que obtuvimos no solo son consistentes con un posible rol de esta proteína en la biología de las ciliadas sino que apoyan los resultados experimentales que obtuvimos posteriormente. En primer lugar, nuestro análisis reveló que todas las secuencias homólogas que encontramos de CCDC28B pertenecen a organismos ciliados. A su vez, no detectamos secuencias homologas claras en los procariotas, hongos o plantas. Si bien nuestro análisis fue exhaustivo, hay que considerar que la ausencia de detección no es una prueba de la inexistencia de CCDC28B en estos grandes grupos taxonómicos. Dicho esto, sin embargo nuestros resultados sí nos permiten especular sobre los posibles orígenes evolutivos de CCDC28B. Es interesante notar que CCDC28B parece limitarse a los metazoos multicelulares ciliados pero no estaría presente en todos los organismos ciliados. Por lo tanto, es tentador especular que CCDC28B podría representar una proteína que, aunque no siendo estrictamente necesaria para formar las ciliadas o flagelos, podría desempeñar una función ciliar importante en el contexto de los organismos multicelulares. Curiosamente, encontramos homólogos muy remotos (y por ello no incluidos en el árbol filogenético presentado) que pertenecen a eucariotas antiguos que precedieron a los metazoos multicelulares. Tales taxones, como son *Dictyostelium sp.* y *Capsaspora owczarzaki*, presentan complejidades

celulares/moleculares que se cree que pueden haber sentado las bases para la complejidad evolutiva alcanzada posteriormente.

Nuestro análisis filogenético también mostró que CCDC28 sufrió un evento de duplicación en los vertebrados dando lugar a CCDC28A y CCDC28B. Dado el grado de conservación entre estas dos proteínas, es posible que compartan por lo menos algunas funciones. Sin embargo, nuestros resultados indicarían que estas dos proteínas no son funcionalmente redundantes en el contexto de la ciliogénesis, ya que la reducción de los niveles de CCDC28B, tanto en las células como en el pez cebra, determinó la aparición de claros fenotipos ciliares. Sin embargo, creemos que sería extremadamente interesante estudiar particularmente si CCDC28A cumple un rol a nivel de las ciliias y poder profundizar en la diversificación funcional de estos genes parálogos. Curiosamente, el evento de duplicación que originó a CCDC28A y CCDC28B coincide con el momento propuesto de un aumento marcado en la complejidad funcional asociada con las ciliias en los vertebrados (Davis, 2006). Por lo tanto, y de manera similar a lo que se ha propuesto para BBS6, BBS10 y BBS12 (Stoetzel, 2007), las cuales son chaperoninas únicamente presentes en los vertebrados, podría ser posible que proteínas tales como CCDC28B pueden haber evolucionado para desempeñar un rol que facilite la adquisición de nuevas funciones por las ciliias. Para determinar estos aspectos, será necesario realizar análisis más a fondo que permitan desentrañar las complejidades de la historia evolutiva de estos genes y proteínas.

Nuestro análisis *in silico* también nos permitió delinear posibles motivos proteicos en la secuencia de CCDC28B que podrían ser relevantes para entender su función en relación a las ciliias, y que nos permitirían explicar algunos de los resultados que obtuvimos. La relevancia biológica de estos dominios en la función de CCDC28B no fue estudiada experimentalmente durante esta tesis e implica parte de los experimentos que pensamos abordar en un futuro próximo. El motivo más sobresaliente que presenta CCDC28B es un dominio *coiled coil*, los cuales han sido implicados en interacciones proteína-proteína (Burkhard, 2001) y más recientemente se ha determinado que los centrosomas y las ciliias están altamente enriquecidas en proteínas con dominios *coiled coil* (Nido, 2012). También identificamos que CCDC28B posee un motivo IQ de unión a calmodulina y un motivo de unión a quinasas MAP (MAPKs). La calmodulina media la

señalización por Ca^{2+} y regula diversos procesos celulares, tales como la reorganización del citoesqueleto (Bähler & Rhoads, 2002), proceso que resulta fundamental para la formación y reabsorción de las cilias durante las etapas del ciclo celular (Irigoin & Badano, 2011). Además, los motivos IQ son blanco de la actividad de proteínas quinasas tales como PKA, PKB/Akt y PKC, las cuales cumplen un rol en la migración celular a través de la reorganización del citoesqueleto de actina (Bähler & Rhoads, 2002; Lee, 2010). En este sentido, a partir de un análisis predictivo de sitios de fosforilación (NetPhosK, CBS) en la secuencia de CCDC28B, detectamos cinco posibles sitios en los residuos Serina 9, 32 y 46, Treonina 23 y Tirosina 89. Ese mismo análisis también indicó que las quinasas PKA, PKC y PKG son las que presentan un mayor score predictivo de ser las responsables de esas posibles fosforilaciones. Interesantemente, se ha demostrado que PKA y PKC también participan en el proceso de ciliogénesis a través de la cascada de MAPK, donde un aumento de la actividad MAPK se correlaciona con un aumento en el largo de las cilias de las células endoteliales (Abdul-Majeed, 2012).

Otros de los motivos que encontramos en CCDC28B son los motivos de localización y exportación nuclear (NLS y NES). Consideramos que la presencia de estos dominios sugieren que CCDC28B podría tener también roles extraciliares, o bien que su relación con las cilias podría ser a través de mediar por ejemplo el transporte hacia dentro y fuera del núcleo de proteínas que participan directamente en la formación o mantenimiento de la estructura ciliar. En este sentido, creemos que los resultados que obtuvimos sobre el cambio en la localización de SIN1 entre el núcleo y el citoplasma al reducir los niveles de CCDC28B podrían estar apoyando esta idea. Dada su importancia, esos resultados serán discutidos más adelante en mayor detalle.

A pesar de que aún no contamos con evidencias experimentales, consideramos que los dominios proteicos que encontramos en CCDC28B podrían jugar un rol muy importante en su relación con las cilias. La información que obtuvimos en esa parte del trabajo es extremadamente importante para poder realizar estudios más específicos para validar y analizar la importancia de esos dominios proteicos en la función biológica de CCDC28B.

CCDC28B es una nueva proteína asociada a la regulación de la ciliogénesis.

Como fue mencionado antes, CCDC28B fue originariamente caracterizada como un modificador secundario de la ciliopatía BBS. Por lo tanto, nos propusimos determinar si existía una relación entre la función de CCDC28B y las cilias primarias. Utilizando tanto un modelo de células en cultivo como un modelo animal, pudimos demostrar que CCDC28B es una proteína que está relacionada con la biología de las cilias. Demostramos que la reducción de los niveles de CCDC28B determina un acortamiento de las cilias así como una reducción del número de células que presentan cilias. Un aspecto muy importante es que pudimos desarrollar un modelo animal que nos permitió estudiar el rol de esta proteína en el contexto global de un organismo. Determinamos que la reducción de los niveles de *Ccdc28b* en el pez cebra recapituló un conjunto de fenotipos que también se observan en diversos morfantes ciliares y mutantes BBS (Badano, 2006; Gerdes, 2007; Ross, 2005; Tobin & Beales, 2008; Walczak-Sztulpa, 2010; Yen, 2006). Uno de los fenotipos más característicos que surge en los embriones del pez cebra cuando se reduce la expresión de proteínas ciliares, es el aumento en la curvatura y el acortamiento del largo del cuerpo del embrión (Gerdes, 2007; Leitch, 2008, Ross, 2005, Stoetzel, 2006; Stoetzel, 2007, Zaghoul, 2010). Se ha demostrado que la aparición de este fenotipo es consecuencia de defectos en los movimientos de convergencia y extensión de la gastrulación mediados por la vía PCP, la cual como ha sido mencionado en la Introducción, es una de las vías de señalización que está relacionada con la función de las cilias primarias (Ross, 2005; Wallingford, 2006; McNeill & Woodgett, 2010).

Otro de los fenotipos que se observa en los morfantes de diversas proteínas BBS y que observamos en los morfantes de *ccdc28b*, es una alteración del patrón de la pigmentación. Se ha demostrado que este fenotipo es consecuencia de un defecto en el transporte retrógrado de los melanosomas mediado por las proteínas BBS, entre otras (Yen, 2006). Del mismo modo, los defectos óseos que caracterizamos en los morfantes de *ccdc28b* son similares a las malformaciones craneofaciales que se observan en los modelos animales de BBS e incluso en pacientes con BBS. Este fenotipo lo caracterizamos de una manera global y sería interesante en un futuro poder profundizar en su etiología. Por ejemplo, sería interesante analizar si en nuestros morfantes se observan defectos en la migración de las células de la cresta neural, células progenitoras

de los cartílagos y huesos, como ha sido descrito para algunos morfantes BBS (Tobin, 2008). Otro de los fenotipos que observamos en los morfantes *ccdc28b* que también ha sido asociado con la función de las cilias es la hidrocefalia. Esta condición es causada típicamente por un defecto en la motilidad de las cilias móviles del epitelio que recubre los ventrículos cerebrales (Ibanez-Tallon, 2004) y más recientemente se demostró que también podría ser causada por defectos en la proliferación de las células progenitoras neuronales, como consecuencia de un defecto en el procesamiento de vías de señalización que median las cilias primarias (Carter, 2012).

Un aspecto importante, es que consideramos que el modelo de pez cebra que desarrollamos es totalmente adecuado para recapitular el tipo de mutación de *CCDC28B* que se caracterizó en los pacientes BBS (mutación hipomórfica), ya que el uso de un morfolino u oligonucleótidos de ARN reducen pero no eliminan completamente la disponibilidad de la proteína blanco. Creemos que este modelo nos permitió evaluar y validar los resultados que obtuvimos *in vitro*, y que también tiene el potencial para poder en un futuro testear el efecto modificador de *CCDC28B* que ha sido reportado sobre otros genes BBS (Badano, 2006).

La caracterización de los fenotipos de los morfantes de *Ccdc28b* fueron claros indicios de que esta proteína podía estar implicada en la organización/formación de las cilias. Sin embargo, el resultado más importante es que demostramos directamente que la reducción de los niveles de *CCDC28B* afecta la formación de las cilias tanto en células en cultivo como *in vivo*, y que esa alteración ciliar tiene importantes consecuencias en la función de los órganos que analizamos.

Profundizando en el mecanismo por el cual CCDC28B regula el proceso de ciliogénesis.

La regulación de la longitud de las cilias es crítica para su función y un número de proteínas y cascadas de señalización han sido implicados en este proceso (Avasthi & Marshall, 2012). Para poder determinar el mecanismo por el cual *CCDC28B* cumple una función en la cilias lo primero que realizamos fue un ensayo de doble híbrido en levadura. El objetivo de ese ensayo fue empezar a conocer la función de *CCDC28B* a través de

identificar proteínas que interactúen con ella y de las cuales se conociera su función. De ese ensayo surgieron cuatro proteínas pero durante esta tesis nos centramos únicamente en SIN1. Demostramos que CCDC28B interactúa con SIN1 en células de mamífero y actúa como un regulador positivo de la actividad de mTORC2. En este sentido, consideramos que los resultados que obtuvimos de cambios en las interacciones entre SIN1/Rictor y SIN1/mTOR al inhibir la expresión de CCDC28B apoyan la idea de que CCDC28B ejerce esa regulación al afectar el ensamblaje o la estabilidad de este complejo. Pudimos demostrar que esa regulación tiene consecuencias sobre procesos celulares en los cuales participa mTORC2, y más precisamente la quinasa Akt, como es la progresión y regulación del ciclo celular.

Durante esta tesis, también demostramos que CCDC28B regula la longitud de las cilias y que ese proceso podría ser en parte a través de su interacción con SIN1. Los resultados donde determinamos que los morfantes de *sin1* presentan cilias más cortas, que *ccdc28b* y *sin1* interactúan genéticamente y que la sobre-expresión de *sin1* puede rescatar parcialmente el fenotipo de las cilias más cortas en los morfantes de *ccdc28b*, apoyan esta idea. Es importante destacar que, al inhibir a mTORC1 y mTORC2 de manera independiente, pudimos determinar que mientras *raptor/mTORC1* participan en la regulación de la longitud de las cilias, el papel de Sin1 en las cilias parece ser independiente de mTORC2. Utilizando tanto un morfolino que afecta el *splice* del ARNm como un morfolino que afecta la traducción, no observamos defectos en las cilias en los morfantes de *rictor*, aunque demostramos que la actividad de mTORC2 estaba significativamente comprometida en esos embriones. Además, la inhibición de SIN1 y Raptor, pero no de Rictor, afectó el largo de las cilias en una línea humana de células ciliadas. Nuestros resultados refuerzan aún más los trabajos previos que vinculan a mTORC1 con el proceso de ciliogénesis (DiBella, 2009; Yuan, 2012) y son consistentes con un trabajo reciente que muestra que las cilias de los túbulos renales distales no están afectadas en un ratón knockout condicional de Rictor (Armour, 2012). Por lo tanto, nosotros mostramos por primera vez que SIN1 está implicada en la regulación de la longitud de las cilias y que esa función es independiente de su rol en el contexto de mTORC2. En nuestro conocimiento, solo existe un reporte previo donde se inhibe específicamente componentes individuales de mTORC1 y mTORC2 en el pez cebra. En ese

trabajo, mostraron que la inhibición de *raptor* determinó un retraso del desarrollo del intestino y defectos en la diferenciación del epitelio intestinal, mientras que la inhibición de *ricor* no influyó en esos procesos y no reportaron que presenten ningún otro tipo de fenotipo (Makky, 2007). Debido a que en ese trabajo no se analizaron las cilias de los embriones morfantes, consideramos que este es el primer reporte donde se caracteriza el efecto de inhibir de manera independiente la actividad de los complejos mTORC1 y mTORC2 sobre el proceso de ciliogénesis en el pez cebra.

En suma, hasta el momento todos los trabajos que han reportado una relación de la vía de mTOR con las cilias se han basado en la actividad del complejo mTOR1. No existen reportes que vinculen una posible participación del complejo mTOR2 con la función de las cilias primarias y nuestros resultados van en esa misma dirección. Sin embargo consideramos que esta posibilidad no debería aún ser descartada por varios motivos. Por un lado, porque existe una fuerte regulación entre las actividades de mTORC1 y mTORC2 mediada principalmente por el complejo TSC1-TSC2. En este sentido, ha sido demostrado que Akt fosforila e inhibe a TSC2, lo que determina una activación de mTORC1. Esto significa que a través de Akt y TSC2, mTORC2 regularía positivamente a mTORC1 (Huang & Manning, 2009). Interesantemente, Huang y colaboradores demostraron que miembros del complejo mTOR2 interactúan directamente con TSC1 y TSC2 y que la reducción de los niveles de TSC1-TSC2 determina un descenso de la actividad de mTORC2 (Huang & Manning, 2008). A pesar de la enorme cantidad de trabajos enfocados en esta temática, creemos que es importante interpretar con cuidado los resultados ya que existen muchos datos contradictorios y aún se conoce poco sobre los factores que activan a mTORC2. De todos modos, sería importante evaluar la posible relación de la interacción TSC1-TSC2/mTORC2 en el contexto de la cilia primaria, teniendo en cuenta los trabajos donde demuestran la participación de TSC1/TSC2 en ciliogénesis (Hartman, 2009; DiBella, 2009; Bonnet, 2009). Un aspecto a evaluar es el rol de mTORC2 en la remodelación del citoesqueleto de actina en la base de las cilias. Se ha demostrado que existe en la base de las cilias una red formada principalmente por filamentos de actina que cumple un rol estructural mediando el anclaje de la cilia a la membrana plasmática (Molla-Herman, 2010; Ghossoub, 2011). En este sentido, ha sido demostrado que la proteína de unión a actina Nesprin-2 interactúa con proteínas del centrosoma/cuerpo

basal y participa en el proceso de ciliogénesis por medio de remodelar el citoesqueleto de actina (Dawe, 2009). También ha sido demostrado que la inhibición de la polimerización del citoesqueleto de actina, por medio de la droga citocalasina D, induce una mayor ciliogénesis e incluso la formación de cilias más largas (Kim, 2010; Hernandez-Hernandez, 2013). Es por esto que consideramos que aún no debería descartarse completamente la participación del complejo mTOR2 en la biología de las cilias.

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 (Wilkinson, 1999). 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 (Schroder, 2004; Schroder, 2005; Cheng, 2005; Kesavan, 2004). Por otra parte, también se ha demostrado que SIN1 inhibe la activación de las rutas ERK y JNK a través de la GTPasa Ras (Schroder, 2007). Fue posteriormente que se determinó que también forma parte del complejo mTOR2 de mamíferos (Frias, 2006; Jacinto, 2006; Yang, 2006) y dada la importancia que adquirió la vía mTOR, el análisis de la función de SIN1 por fuera de este complejo quedó un poco más relegada. A nivel estructural se determinó que SIN1 de *H. sapiens* presenta un dominio *coiled coil* en el extremo amino terminal, un dominio denominado CRIM (del inglés *conserved region in the middle*) que media interacciones entre proteínas, un dominio de unión a Ras (RBD), tres señales de localización nuclear (NLS), un dominio de exportación nuclear (NES) y un dominio PH (del inglés *pleckstrin homology*) el cual media la interacción con lípidos y con otras proteínas (Schroder, 2004; Schroder, 2007; Cloonan, 2006). Consideramos que la información sobre estos dominios estructurales en SIN1 puede ser importante para analizar y entender los resultados que obtuvimos. Por ejemplo, la presencia de un dominio de unión a MAPK en CCDC28B y el hecho de que SIN1 es una proteína que se asocia a MAPK, nos podría estar aportando información sobre el mecanismo de su interacción, así como sobre la posibilidad de que CCDC28B participe acercando o mediando en la interacción de SIN1 con las quinasas MAP. En este sentido, es importante destacar que recientemente las MAPKs han sido implicadas en la regulación del transporte intraflagelar y en el proceso de ciliogénesis, donde una alteración en la señalización por MAPKs se ha asociado con un aumento de la longitud de las cilias

(Avasthi & Marshall, 2012). 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 cilias más largas (Burghoorn, 2007). Sin embargo, en el trabajo de Abdul-Majeed y colaboradores, demostraron que la inhibición de MEK1 determina la formación de cilias más cortas, lo que sugiere que estas quinasa podrían actuar para aumentar o disminuir la longitud de las cilias dependiendo del contexto celular, de la MAPK involucrada y quizás del organismo considerado (Abdul-Majeed, 2012). Por lo tanto, pensamos que CCDC28B podría estar regulando la longitud de las cilias a través de su interacción con SIN1 y la consecuente regulación de la señalización por la vía de las MAPK.

Con respecto al mecanismo por el cual la interacción entre CCDC28B y SIN1 podría regular el proceso de ciliogénesis y la actividad de mTORC2, creemos que nuestros resultados sobre los cambios en la localización de SIN1 también podrían ser relevantes. Nuestros resultados indican que CCDC28B participaría en el mecanismo de translocación de SIN1 entre el compartimento nuclear y el citoplasma, ya que la ausencia de CCDC28B determinó una mayor retención de SIN1 dentro del núcleo. Esto a su vez podría explicar la disminución de complejo mTOR2 ensamblado y la consecuente disminución de la actividad de este complejo que observamos. En este sentido, la presencia de secuencias de localización y exportación nuclear tanto en CCDC28B como en SIN1, indican que su localización podría ser dinámica y alternar entre esos dos compartimentos celulares. En apoyo a estos resultados, existen reportes de la presencia de SIN1 dentro del compartimento nuclear, tanto por técnicas de fraccionamiento subcelular y análisis por Western blot, así como por medio de inmunocitoquímica en células humanas (Rosner & Hengstschläger, 2008; Schroder, 2005; Saci, 2011). Se ha propuesto que mTORC2 fosforila y activa a Akt principalmente a nivel de la membrana plasmática, pero más recientemente se reportó que el retículo endoplásmico podría ser el sitio principal de actividad de mTORC2 (Huang & Manning, 2009; Boulbes, 2011). A pesar de que no pudimos caracterizar la localización de CCDC28B con las herramientas que desarrollamos, es interesante mencionar que con todos los anticuerpos que utilizamos observamos un patrón dinámico de localización tanto en el núcleo como en la región perinuclear y membrana, lo que estaría en completa concordancia con las especulaciones antes mencionadas. Debido a esto es que consideramos que la caracterización de la

localización subcelular de CCDC28B será extremadamente relevante para poder analizar y comprender con total certeza su función a nivel celular.

Nuestros datos apoyan la posibilidad de que CCDC28B juegue un papel facilitando la actividad de SIN1 tanto en el contexto de mTORC2 (al interactuar con SIN1 y Rictor), así como por fuera regulando la longitud de las cilias. Nuestros experimentos de rescate apoyan esta idea ya que observamos un rescate de la longitud de las cilias solo cuando sobre-expresamos a *sin1* en los morfantes *ccdc28b*, y no al revés, lo que indica que Sin1 probablemente actúe *downstream* de *Ccdc28b*. Sin embargo, el rescate de la longitud de las cilias fue parcial, lo que sugiere que Sin1 por sí sola no sería suficiente para restaurar completamente el largo de las cilias. Una posibilidad es que Sin1 dependa de la presencia de *Ccdc28b*, factor limitante en el experimento, para llevar a cabo su función. Además, este resultado también podría indicar que *Ccdc28b* regula la longitud de las cilias al menos en parte independientemente de Sin1. Cabe destacar en este sentido que CCDC28B fue originariamente identificada como una proteína que interactúa con diversas proteínas BBS, algunas de las cuales forman parte del BBSoma, el cual ha sido demostrado que participa en el proceso de ciliogénesis (Badano, 2006; Nachury, 2007; Loktev, 2008; Jin, 2010; Veleri, 2012). Si bien la relación CCDC28B-BBSoma no fue estudiada en esta tesis (muchos de los experimentos aquí presentados fueron realizados antes de que se conociera la relación funcional del BBSoma con las cilias), es importante resaltar algunos puntos. Aunque el BBSoma participa activamente en el procesos de ciliogénesis, la eliminación parcial o total de proteínas BBS individuales no necesariamente resulta en defectos estructurales a nivel de las cilias (Fath, 2005; Mykytyn, 2004; Nishimura, 2004). Se ha planteado que esto podría deberse a una redundancia parcial en la función de los genes BBS en el contexto del BBSoma. Por lo tanto en este punto CCDC28B se comporta de forma diferente a las proteínas BBS conocidas ya que nosotros demostramos por medio de dos aproximaciones experimentales diferentes, que la reducción de CCDC28B afecta la formación de las cilias. Dado que CCDC28B interactúa físicamente con distintos miembros del BBSoma, esto podría indicar que la función de CCDC28B fuera la de facilitar o mediar en la función del BBSoma en el contexto de las cilias o fuera de ellas. Por ejemplo, recientemente demostramos que algunas proteínas BBS cumplen un rol a nivel nuclear, afectando la

transcripción de un grupo de genes a través de su interacción con RNF2, una proteína de remodelación de la cromatina (Gascue, 2012). Resultados preliminares indican que CCDC28B también es capaz de interactuar con RNF2 en células de mamíferos (Gascue, no publicado), lo cual apoyaría la idea de que el rol a nivel celular de CCDC28B, quizás en el contexto del BBSoma, podría ser la de facilitar la entrada o salida de proteínas desde el compartimento nuclear, lo que estaría en concordancia con nuestras observaciones sobre la localización de SIN1. A nivel de las cilias, si efectivamente CCDC28B actúa facilitando la función del BBSoma como complejo, y considerando la posibilidad de que exista una redundancia funcional entre la proteína BBS, sería de esperar que la reducción de CCDC28B tenga un impacto más profundo en la ciliogénesis que la eliminación de proteínas BBS individuales. Una aparente contradicción en esta hipótesis es el hecho de que CCDC28B fue caracterizado previamente como un modificador secundario en algunas familias BBS (Badano, 2006) no existiendo reportes de mutaciones en este gen que sean causales de BBS. Esto podría sugerir que mutaciones que determinen la pérdida total de la función de CCDC28B estén asociadas con ciliopatías más graves o sean incompatibles con el desarrollo embrionario. En apoyo a esta posibilidad, es importante resaltar que nosotros determinamos que la inyección de dosis de morfolino mayores a 3ng provoca la detención del desarrollo y la muerte embrionaria, con una penetrancia cercana al 100%. A su vez, la mutación encontrada en pacientes BBS resulta en una disminución en los niveles de CCDC28B pero no en su eliminación. En definitiva, una posibilidad interesante a futuro sería evaluar la posibilidad de que CCDC28B contribuya con alelos causales a otras ciliopatías más severas, tales como el síndrome de Meckel-Gruber (MKS), o esté asociado con abortos espontáneos recurrentes. Será necesario más trabajo para poder determinar si la actividad del BBSoma se ve afectada en ausencia de CCDC28B, así como es interesante estudiar en un futuro si el BBSoma también tiene una relación funcional con SIN1 y con la actividad de mTORC2.

Por último, nuestros datos sugieren que si bien parte de los fenotipos que caracterizan a los morfantes de *ccdc28b* probablemente se deban a defectos en las cilias, creemos que otros podrían ser causados por un defecto en la señalización mediada por mTORC2, lo cual probablemente también sea relevante para comprender el efecto modificador que CCDC28B tiene sobre los genes BBS. La señalización mediada por mTORC2 ha sido

implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina, afectando la morfología y la polarización celular (Oh & Jacinto, 2011; Sarbassov, 2004; Jacinto, 2004; Liu, 2010), mientras que se ha demostrado que las proteínas BBS participan en la vía no canónica de Wnt (PCP), la cual es necesaria para la polarización celular y para la orientación de las células en los tejidos (Gerdes, 2007; Kim, 2010; Ross, 2005; May-Simera HL, 2010). Por lo tanto, es posible que la alteración en la señalización mediada por mTORC2 podría exacerbar un fenotipo PCP-dependiente. Hemos demostrado que los diferentes tejidos ciliados aparecen desorganizados en los morfantes de *ccdc28b* y también que los filamentos de actina de las fibras musculares se ven afectadas al inhibir la expresión de *Ccdc28b*. Estos fenotipos podrían deberse a defectos en la señalización por mTORC2. Los morfantes de *ccdc28b* también presentan hidrocefalia, una condición que puede ser causada por la alteración de la motilidad de las ciliadas (Ibanez-Tallon, 2004). Curiosamente, los morfantes de *ric1*, a pesar de que no presentan ciliadas más cortas en la KV, también presentan hidrocefalia. Por lo tanto, una posibilidad intrigante es que la alteración de mTORC2 podría causar defectos en la función ciliar y no así en la longitud de las ciliadas. Por ejemplo, podría afectar la orientación de las ciliadas, un parámetro importante para el movimiento coordinado cilia-dependiente de los fluidos en los ventrículos cerebrales (Mirzadeh, 2010). Se requiere una caracterización en mayor profundidad de los embriones morfantes que presentamos en este trabajo para testear esta posibilidad y evaluar otras consecuencias fenotípicas de la alteración de mTORC2.

En resumen, en este trabajo comenzamos con el estudio de una proteína de función desconocida, sabiendo únicamente de su vinculación con la patogénesis de la ciliopatía BBS. A través de una aproximación multidisciplinaria creemos que este trabajo ha logrado avanzar significativamente en nuestro entendimiento acerca de *CCDC28B*, la biología de las ciliadas, y la función de la vía mTOR en relación con el proceso de ciliogénesis. Globalmente nuestros resultados muestran que *CCDC28B* modularía la actividad de *SIN1* tanto en lo que respecta a ciliogénesis como en su rol relacionado a mTORC2. A su vez, abren la posibilidad de que existan mecanismos más complejos y por lo menos parcialmente redundantes en la regulación de las ciliadas, mecanismos que podrían involucrar al BBSoma, la vía de las MAPKs o inclusive la reorganización del citoesqueleto celular. Estudios futuros deberán apuntar a completar dicho esquema a

diferentes niveles de manera de poder entender los mecanismos moleculares a través de los cuales CCDC28B es capaz de desarrollar su función.

Conclusiones y perspectivas

A partir del conjunto de experimentos que realizamos pudimos caracterizar varios aspectos del rol biológico de CCDC28B. A continuación se presentan las conclusiones de este trabajo y se plantean algunas ideas o experimentos que pensamos sería importante abordar en un futuro próximo. En la **Figura 79** se presenta el modelo de las conclusiones alcanzadas.

Del conjunto de nuestros resultados pudimos determinar que:

- 1) CCDC28B es una proteína conservada en los metazoos multicelulares ciliados. En los vertebrados ocurrió un evento de duplicación que originó dos genes parálogos (CCDC28A y CCDC28B).

A pesar de que nuestros resultados indicarían que estas dos proteínas no son funcionalmente redundantes en el contexto de la ciliogénesis, pensamos que estudiar particularmente si CCDC28A también cumple un rol a nivel de las cilias brindaría información relevante para poder entender la diversificación funcional de estos genes.

- 2) CCDC28B presenta un dominio *coiled coil*, un motivo IQ de unión a calmodulina, un motivo de unión a quinasas MAP (MAPKs), un motivo de localización nuclear (NLS) y dos motivos de exportación nuclear (NES).

A futuro será fundamental analizar la relevancia biológica de estos dominios y más específicamente su importancia en el contexto de la ciliogénesis. Para esto, ya hemos comenzado a realizar una serie de construcciones donde se han eliminado o mutado algunos de estos dominios y analizaremos sus consecuencias sobre la función de CCDC28B.

- 3) CCDC28B es una proteína que participa en el proceso de ciliogénesis.

Consideramos que esta es una de las conclusiones más relevantes de este trabajo y pretendemos seguir estudiando el mecanismo por el cual cumple esta función. Pensamos abordar este punto no solo en el contexto de su relación con SIN1, sino que también en su relación con las proteínas BBS, enfocándonos específicamente en la posibilidad de que CCDC28B regule la actividad del BBSoma.

- 4) CCDC28B interactúa y modula la actividad del complejo mTOR2, actuando como un regulador positivo de este complejo.

Pudimos determinar que CCDC28B ejerce esa regulación al afectar el ensamblaje o la estabilidad de este complejo, lo cual tiene consecuencias sobre la progresión y regulación del ciclo celular. Como ya fue mencionado, el rol principal de mTORC2 está vinculado a la regulación del citoesqueleto por lo que será interesante ahondar sobre el mecanismo de esta regulación y sus consecuencias sobre la organización del citoesqueleto de actina, tanto en el contexto de las cilias como fuera de ellas.

- 5) SIN1 es una proteína que participa en el proceso de ciliogénesis independientemente de mTORC2.

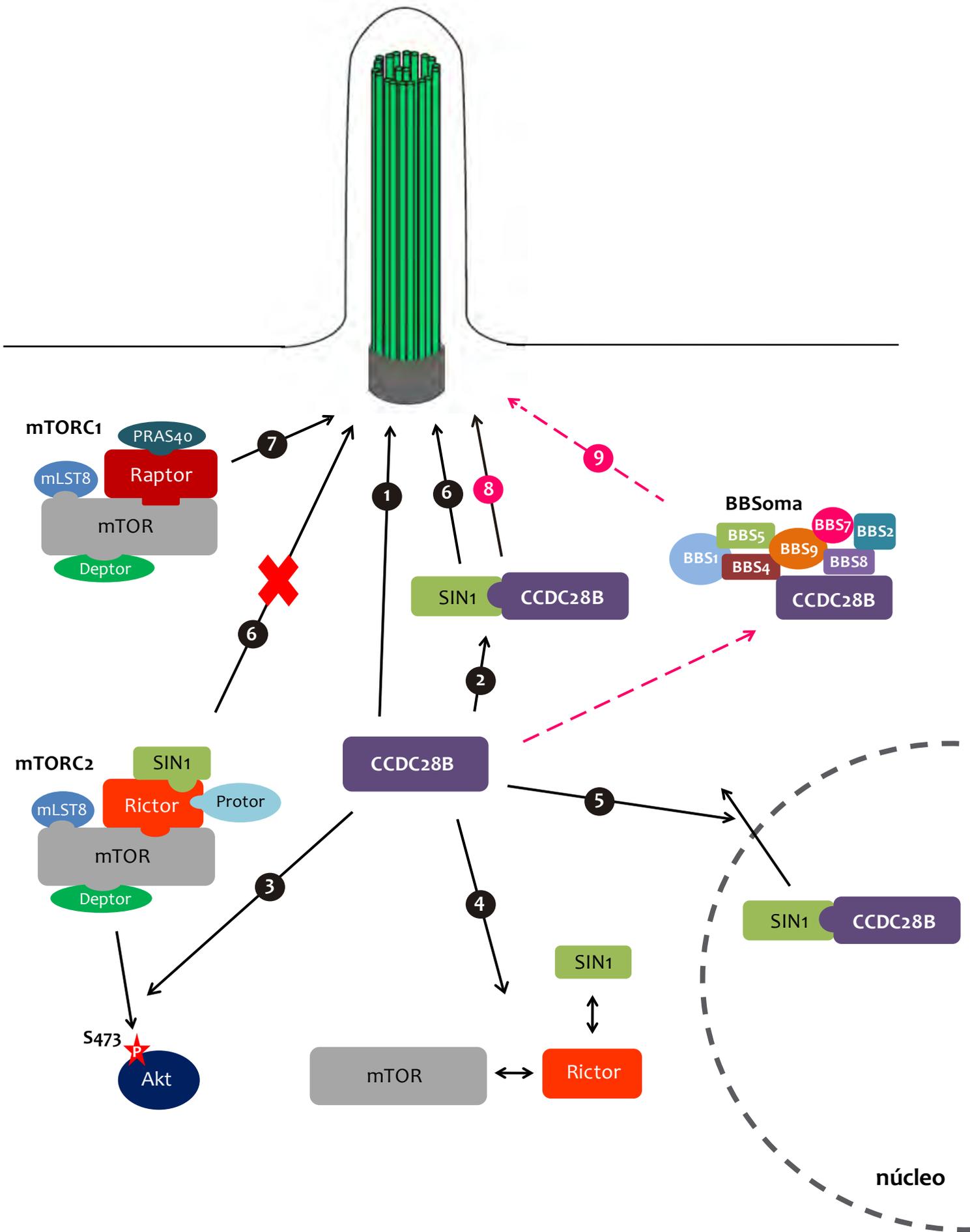
Este es uno de los aportes más novedoso de esta tesis ya que no existen reportes previos sobre la función de SIN1 en la biología de la cilias. Pensamos enfocar nuestro análisis en estudiar la participación de SIN1 sobre el proceso de ciliogénesis en el contexto de la señalización por vías MAPK.

- 6) CCDC28B modula ciliogénesis a través de su interacción con SIN1.

Este punto lo pensamos abordar junto con el punto anterior y pensamos enfocarnos principalmente en la relación de CCDC28B con las vías de MAPK en las cuales SIN1 podría estar involucrada.

Figura 79_ Modelo donde se integran los resultados obtenidos en las secciones B-D, y las perspectivas de este trabajo.

1) CCDC28B es una proteína que participa en la regulación del largo de las cilias. 2) CCDC28B interactúa con SIN1. 3) CCDC28B interactúa y modula la actividad del complejo mTOR2, actuando como un regulador positivo de este complejo. 4) CCDC28B afecta el ensamblado o la estabilidad de mTORC2. 5) CCDC28B podría mediar la translocación de SIN1 entre el núcleo y el citoplasma. 6) SIN1 es una proteína que participa en el proceso de ciliogénesis independientemente de mTORC2. 7) Confirmamos la participación de mTORC1 en el proceso de ciliogénesis. 8) CCDC28B modula ciliogénesis a través de su interacción con SIN1. Como perspectivas (8 y 9) nos proponemos determinar el mecanismo por el cual CCDC28B-SIN1 afectan el largo de las cilias, así como la posibilidad de que CCDC28B afecte el largo de las cilias a través de su interacción con el BBSoma.



Materiales y Métodos

Búsqueda de secuencias y análisis filogenéticos

La búsqueda de secuencias homólogas de CCDC28B con estructura tridimensional conocida fue realizada por medio del programa HHpred (Söding, 2005). Luego las bases de datos de secuencias no redundantes (NR) del NCBI fueron analizadas por medio de un conjunto de métodos de búsqueda, tales como CS-Blast (Biegert & Söding, 2009), HHblits (Remmert, 2011) y HHSenser (Söding, 2005). Todos esos métodos fueron utilizados individualmente así como de manera combinada, donde los resultados significativos obtenidos por un método fueron utilizados como “input” para los otros métodos. Se buscó la secuencia de la proteína CCDC28B humana por medio de Blastp (Altschul, 1990) en la base de datos UniProt, la cual contiene al proteoma completo y curado de los metazoos (The Uniprot Consortium 2012). El proteoma de *Petromyzon marinus* (lamprea) y las estructuras exón-intrón fueron obtenidos a partir de Ensembl (Flicek, 2011). Los resultados positivos fueron luego alineados por medio de T-Coffee (Notredame, 2000), Prank (Loytynoja & Goldman, 2005) y Mafft (Katoh, 2002). Los árboles filogenéticos de máxima similitud (“*maximum-likelihood phylogenetic trees*”) fueron obtenidos por medio de PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) con los parámetros estándar.

Cultivos celulares

Medios y condiciones de crecimiento

Líneas HEK293 (ATCC # CRL-1573), HELA (ATCC # CCL-2 y NIH3T3 (ATCC # CRL-1658): Medio *Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)* con alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) y 1% penicilina/streptomina (50 µg/ml; Invitrogen).

Línea hTERT-RPE (ATCC # CRL-4000): Medio mezcla 1:1 de DMEM alta glucosa y F12 (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y 0,01 mg/ml de Higromicina B (Invitrogen).

Todas las células fueron crecidas a 37 °C y 5% CO₂. Para amplificar los cultivos celulares, las células son lavadas con PBS (sin magnesio y calcio) y se incuban con tripsina (Invitrogen)

durante 5 min a 37 °C (1 ml de tripsina/placa de 100 mm). La tripsina es inhibida por medio de agregar medio con suero y luego se separan las células disgregadas en las distintas diluciones según la densidad buscada.

Para congelar las células, se realiza primero un lavado con PBS, luego son tripsinizadas y resuspendidas en 10 ml de medio completo y transferidas a un tubo de 15ml. Se centrifugan durante 5 min a 1200 rpm y luego se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio de congelación (70% DMEM, 20% SFB, 10% DMSO). Se transfieren a criotubos y se conservan en nitrógeno líquido.

Preparación a gran escala de plásmidos

Transformación de bacterias E. coli

Bacterias competentes *E. coli DH5α* (Invitrogen), fueron transformadas con el vector de interés por la técnica de *shock* térmico según lo establecido en (Sambrook, 2001).

Brevemente, se agregó la cantidad apropiada de ADN, se incubó durante 30 min en hielo, se realizó el *shock* térmico a 42 °C durante 45 segundos, se enfriaron en hielo 2 min, se agregó medio SOC y se incubaron a 37 °C durante 1 hora con agitación. Luego se sembraron en placas con medio Luria Bertani (LB)/Agar y el antibiótico apropiado (Kanamicina o Ampicilina, Cf = 30 µg/ml). Posteriormente, colonias únicas fueron crecidas en medio LB con el antibiótico apropiado en un cultivo de 100 ml, a partir del cual posteriormente se purificaron los plásmidos.

Purificación de los plásmidos

Para la purificación de los plásmidos se utilizó el Kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter Mini o Maxiprep* (Invitrogen), siguiendo el protocolo aportado por el fabricante. Este método permite la purificación de ADN plasmídico de manera ultrapura y libre de endotoxinas. El estado de purificación del plásmido fue determinada por medidas espectrofotométricas a 260/280 nm y se analizó la muestra en gel de agarosa.

Geles de Agarosa

Para la preparación de los geles se disolvió la cantidad de agarosa necesaria (0,8-1%, Invitrogen) en buffer 1X TBE y se le agregó bromuro de etidio (0,5 µg/ml, Invitrogen). A las muestras se les agregó buffer de carga y se sembraron junto con un marcador de peso molecular apropiado (100bp NEB #N3231S, Invitrogen #15628-019; 1Kb NEB #N3232S, Invitrogen #15615016). Se corrieron los geles en 1X TBE a 100V hasta alcanzar la separación deseada.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Todas las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µl, con reactivos de Invitrogen y un termociclador MultiGenell Labnet. Se utilizó el *buffer* provisto por el fabricante (Tris-HCl pH 8,7, KCl, (NH₄)₂SO₄, y MgCl₂) a una concentración final de 1,5 mM, y se utilizó una mezcla de dNTPs a una concentración final de 0,2 mM y 0,25 U de Taq polimerasa por tubo de reacción. Se utilizaron los *primers* a una concentración final de 1 µM. Se utilizó una temperatura de hibridación en el rango 54-56 °C y todos los pasos de la reacción (desnaturalización, hibridación y extensión) fueron realizados de 30 seg-1 min de duración. Se realizaron 35-40 ciclos de amplificación.

Cuando se realizó una retrotranscripción y un posterior PCR con ciclos limitados (rt-PCR), se realizaron 18-22 ciclos de amplificación.

Los PCR de largo alcance se realizaron utilizando el sistema *LongAmp Taq PCR kit* (NEB #E5200S) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los *primers* utilizados se detallan en la **Tabla 5**.

Nombre	Secuencia	Uso	Figura
hsIFT88-RTPCRFwd	GAATGGCTAATGCAGGTGGT	RT-PCR	22
hsIFT88-RTPCRRev	TACCATCAGCTGCCATTTCA	RT-PCR	22
MGChuRTPCR-F	GGCCCTAGGACTTCTCATC	RT-PCR y rt-PCR	22, 31
MGChuRTPCR-R	CCAGGTGCAGCTTCTGGATA	RT-PCR y rt-PCR	22, 31
zfMgc-BamHI-fwd	ACGTGGATCCATGGAGGACAAGAGGAAGAAAA	clonado	23
zfMgc-XhoI-rev	ACGTCTCGAGTCAGGTGTTGGAGGTCTTGG	clonado	23
zfMGC-MOFwd	CCAGGGGCAAATACAAGAGA	funcionalidad MO	24
zfMGC-MORev	GTCATTGAGCAGGTTGAGCA	funcionalidad MO	24
zGAPDHFwd	TTAAGGCAGAAGGCGGCAAA	funcionalidad MO	24
zGAPDHRev	AAGGAGCCAGGCAGTTGGTG	funcionalidad MO	24
hsSIN1SalIFwd	ACGTGTGCGACGGCCTTCTTGGACAATCCAAT	clonado	30
hsSIN1NotIRev	ACGTGCGGCGCTCACTGCTGCCCGGATTT	clonado	30
h GAPDH int F	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	rt-PCR	31, 34
h GAPDH int R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	rt-PCR	31, 34
FasLhsFwd	TGGGGATGTTTCAGCTCTTC	rt-PCR	34
FasLhsRev	CAAGATTGACCCCGGAAGTA	rt-PCR	34
p27KIP1hsFwd	CAGGAGAGCCAGGATGTCAG	rt-PCR	34
p27KIP1hsRev	ACGTTTGACGTCTTCTGAGG	rt-PCR	34
hsmTOR-RTPCRFwd	AGTGGACCAGTGGAAACAGG	RT-PCR	38
hsmTOR-RTPCRRev	TTCAGCGATGTCTTGTGAGG	RT-PCR	38
zfmTOREx3Fwd	CCAAGATGAAGCCACCACTT	funcionalidad MO	39
zfmTORInt3Rev	GAAACGCCACTGCTGATATG	funcionalidad MO	39
zfmTOREx4Rev	GCCTTCATTCCTGTCTGCTC	funcionalidad MO	39
zfRaptorMOSpl1Fwd	GTGAAGACCTCACCTGTGC	funcionalidad MO	48
zfRaptorMOSpl1Rev	ATGAGGAGCAAGCTCATTGG	funcionalidad MO	48
zfRaptorMOSpl3Rev	GGGCTGCCAGTTCTCATACT	funcionalidad MO	48
zfSIN1MOSpl1Fwd	GACACCGGGATGTGTGAGAT	funcionalidad MO	48
zfSIN1MOSpl1Rev	AGAAGGTTTTGGGTGATTCG	funcionalidad MO	48
zfSIN1MOSpl3Rev	TTCCTCAGTCGCTCCAGTCT	funcionalidad MO	48
zfRictorMOSpl2Fwd	CAGAATGTGGCCAAACAACA	funcionalidad MO	48
zfRictorMOSpl2Rev	GAAATTGACGCTTGACGTTCC	funcionalidad MO	48
zfRictorMOSpl3Rev	CCTGATGAGGTAGCGGAGAG	funcionalidad MO	48
Common-LoxPFwd	GAGATGGCGCAACGCAATTAAT	ratón KO	73, 77, 78
KOMPccdc28bGenR	GCCCTGCTCTGTTTGT	ratón KO	73, 77, 78
KompCcdc28bGenF	AGTGAAGAGAGGCCAGTGA	ratón KO	73
Common-en2-R	CCAAGTACCTTGGGCAAGAACAT	ratón KO	73
Ccdc28b Gen Fwd	CGCTAGGGTGAGGGAGAAA	ratón KO	74
Ccdc28b Gen Rev	TCACCACACCTGATGCATTT	ratón KO	74
Mgc5'SouthProbeF	GGATAAAGGCACCCAGCATA	ratón KO	75
Mgc5'SouthProbeR	GAGTGACAGCAGGGGAAAAG	ratón KO	75
3' Universal (R2R)	TCTATAGTCGCAGTAGGCGG	ratón KO	76, 77
Mgc3'armOUT.Rev	GTTGGCTCTGGGTGGTTTA	ratón KO	76, 77
5'outarm2Fwd	GTTTAAGCTGCCAGACTTGAG	ratón KO	76, 78
5' Universal (LAR3)	CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC	ratón KO	76, 78

Clonado en vectores de expresión

El clonado en los vectores de expresión se realizó por medio de amplificar los marcos abiertos de lectura (ORF) de los distintos genes a partir de ADN copia y por medio de un PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pfu, Stratagene) y *primers* con la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa y purificados por medio del *kit PureLink Quick gel extraction* (Invitrogen #K210012). Los vectores de destino y los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción apropiadas y luego purificados por medio del *kit PureLink PCR Purification* (Invitrogen #K3100-01). Se realizó la ligación por medio de incubar vector e inserto (relación 1:2) con la enzima T4 ligasa (Promega), ON a 4 °C. Las ligaciones fueron transformadas en bacterias *E. coli* competentes y se aislaron y analizaron clones positivos por secuenciación.

Transfección transitoria con ADN plasmídico.

Los plásmidos de ADN fueron introducidos en las células de mamíferos por medio de Lipofectamine 2000 (Invitrogen # 11668-027) o Fosfato de Calcio.

La Lipofectamina es un lípido catiónico que en agua forma liposomas, los cuales se asocian electrostáticamente a las cargas negativas del ADN. Esos liposomas se fusionan a la membrana plasmática de las células, introduciendo el ADN al espacio intracelular. Para la transfección se utilizó el protocolo y las proporciones aportadas por el fabricante.

El método de transfección por fosfato de calcio se basa en la formación de precipitados de fosfato de calcio y ADN, los cuales son internalizados en las células por endocitosis. Se utilizó el protocolo de *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1994) o el *kit* comercial de Invitrogen (#K2780-01) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Inhibición de la expresión de genes en células de mamíferos

Para inhibir la expresión de genes se utilizó el sistema pSUPER (OligoEngine) o el sistema de oligonucleótidos de ARN de Invitrogen (Stealth RNAi™ siRNAs).

Sistema pSUPER (OligoEngine)

Este sistema consiste de transfectar las células con un plásmido de expresión en células de mamíferos, en el cual se ha clonado la secuencia que codifica para un pequeño ARN de interferencia (en inglés *shRNA*) de 21-22 nucleótidos. Dentro de las células estos pequeños ARN son sintetizados y luego procesados a pequeños ARN de interferencia (en inglés *siRNA*) por la enzima DICER. Estos *siRNA* son incorporados al complejo de silenciamiento inducido por *siRNA* (RISC) de la célula y actúan inhibiendo la expresión de su ARNm blanco (Lambeth & Smith, 2013). Para el diseño de los *shRNA* se utilizó el servicio en línea OligoEngine 2.0 y para el clonado se siguieron las instrucciones aportadas por el fabricante (www.oligoengine.com). Para transfectar las células se utilizó el método con Lipofectamina2000. Las secuencias de los *shRNA* clonados en el vector pSUPERCCDC28B son las siguientes:

Para líneas celulares humanas:

Fwd: GATCCCCAGACAATGGCTGACCGTAATTCAAGAGATTACGGTCAGCCATTGTCTTTTTTA

Rev: AGCTTAAAAAAGACAATGGCTGACCGTAATCTCTTGAATTACGGTCAGCCATTGTCTGGG

Para líneas celulares murinas:

Fwd: GATCCCCAGGAGAAGTTGGCCAGACTTTCAAGAGAAGTCTGGCCAACTTCTCCTTTTTTA

Rev: AGCTTAAAAAAGGAGAAGTTGGCCAGACTTCTCTTGAAGTCTGGCCAACTTCTCCTGGG

Sistema Stealth RNAi™ siRNAs de Invitrogen

Este sistema se basa en transfectar células con pequeños ARN de interferencia (en inglés *short interfering RNA*, *siRNA*) sintéticos de 25 nucleótidos, los cuales han sido

desarrollados para presentar una mayor especificidad y estabilidad en las condiciones de cultivo celular. Los oligonucleótidos de ARN que se utilizaron fueron sintetizados y adquiridos en Invitrogen y están especialmente diseñados para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm del gen de interés. Estos oligonucleótidos de ARN fueron introducidos a las células por medio del uso de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen #13778-075), la cual está especialmente diseñada para la transfección de *siRNA*. El protocolo y las proporciones utilizadas fueron las aportadas por el fabricante.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos de ARN (para líneas celulares humanas):

CCDC28B: UCAGUAAUUCUAUCCAGAAGCUGCA

IFT88: GGCUGGUCAGUAUUCAGAUGCUAUU

SIN1: GCCCAUUCAUAAGUUUGGCUUCAGU

Rictor: CCUAAUGAAUAUGGCUGCAUCCUUU

Raptor: GGACUUGCUGGUGGCUAGUCUGUUU

Como oligonucleótido de ARN control se utilizó un *siRNA* con bajo contenido GC, el cual no hibrida con ningún ARNm conocido (Invitrogen # 12935-200).

Sobre-expresión de genes en células de mamíferos

Se utilizó el vector pMyc o pHA (Clontech) con el ORF de *CCDC28B* clonado y se incorporaron en las células por medio de la técnica de fosfato de calcio o Lipofectamina2000 descritas previamente. Los *primers* utilizados para el clonado en estos vectores están detallados en la **Tabla 5**.

Extracción de ARN y síntesis de ADN copia (ADNc)

Extracción de ARN de células en cultivo (placa 35 mm)

Las células son tripsinizadas y se centrifugan durante 5 min a 1300 rpm, luego se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 1 ml de Trizol (Invitrogen # 15596-026) durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agrega 200 µl de cloroformo y se agita durante 15 seg y luego se incuba durante 3 min a TA. Se centrifuga durante 15 min a 12000 g a 4 °C y luego el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se agrega 500 µl de isopropanol. Se incuba por 10 min a TA y luego se centrifuga 10 min a 12000 g y 4 °C. El sobrenadante es descartado y se agrega 1 ml de etanol 75% y se resuspende con vórtex. Se centrifuga 5 min a 7500 g y 4 °C y se descarta el sobrenadante. Se deja secar el *pellet* por 10 min y se disuelve en 30 µl de H₂O. Se incuba 10 min a 56 °C. Se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm y se guarda a -80 °C.

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La síntesis del ADN copia se realizó por medio del kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 µg de ARN previamente tratado con DNAsas y para la síntesis del ADN copia se utilizaron como *primers* oligonucleótidos dT.

Real-Time PCR (RT-PCR)

Se midió la incorporación de *SYBR green* utilizando el *Quantimix Easy SYG KIT* (BioTools) en un *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research). Todas las reacciones fueron realizadas en duplicados biológicos y técnicos. Se normalizó el valor de ciclo umbral (*threshold cycle value*, CT) de cada gen con respecto a *GAPDH* y se calculó el *DCt* para todas las replicas de cada gen. Se utilizó el método de CT comparativo (*DDCt method*) para determinar la cantidad relativa de cada gen y se calculó la tasa de cambio de la expresión como 2^{-DDCt} .

Los *primers* utilizados se detallan en la **Tabla 5**.

Inmunocitoquímica (IC)

Las inmunocitoquímicas fueron realizadas sobre células previamente sembradas en cubreobjetos estériles. El protocolo que se utilizó fue el siguiente: Se retira el medio de cultivo y las células son lavadas con PBS precalentado a 37 °C. Luego se fijan las células con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS de 1 min cada uno y luego se permeabilizaron las células con TritónX100 al 0,1% en PBS durante 10 min. Se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno y se bloqueó con 5% de suero fetal bovino (SFB) en PBS durante una hora. Se lavaron las células con PBS y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo primario diluido en PBS. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS de 10 min cada uno y se incubaron, protegidas de la luz, con el anticuerpo secundario y el marcador nuclear durante una hora. Para finalizar se realizaron tres lavados con PBS de 5-10 min cada uno y los preparados fueron montados con el medio de montaje ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen # P36930) y sellados con esmalte de uñas.

En los casos indicados se realizaron algunas variantes de este protocolo, las cuales fueron únicamente en la etapa de fijación y permeabilización: fijación con metanol a -20 °C durante 10 minutos y luego permeabilización con TritónX100 al 0,1% en PBS durante 10 min; fijación con PFA al 4% en PBS durante 10 minutos y luego fijación con metanol a -20 °C durante 10 minutos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

Monoclonal Anti- γ -Tubulina (Sigma-Aldrich # T6557) 1:500

Monoclonal Anti- α -Tubulina acetilada (Sigma-Aldrich #T7451) 1:500

Monoclonal Anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439) 1:1000

Monoclonal Anti-SIN1 (Millipore #05-1044) 1:200

Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen #A21206) 1:1000

Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen #A21202) 1:1000

Tetramethylrhodamine Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen #T2769) 1:1000

Tetramethylrhodamine Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen #T2762) 1:1000

Para visualizar los núcleos se utilizaron las moléculas intercalantes en el ADN:

DAPI (Invitrogen #D1306) 1:5000

TOPRO-3 (Invitrogen #T3605) 1:1000

Microscopía

Para la captura y registro de las imágenes se utilizó el microscopio invertido Olympus IX81, acoplado a una cámara Hamamatsu Orca ER y el software Image Pro v6, así como el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 montado sobre un microscopio invertido Leica DM6000 y el software LASAF v2.6.0.

Procesamiento de imágenes

Se utilizaron los programas MacBiophotonic ImageJ (versión 1.47b, NIH) y Adobe Photoshop CS5. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Excell.

Cuantificación del largo de las cilias

Se utilizó el programa MacBiophotonic ImageJ (versión 1.47b, NIH) y las imágenes obtenidas por microscopia confocal. El procesamiento por medio de este programa permite mantener los parámetros de captura de cada imagen, de modo que cada imagen está calibrada y la magnificación de las imágenes con la herramienta “zoom” no altera las medidas. Se realizó la proyección en Z de todos los planos focales de cada imagen y se utilizó la herramienta del programa “free hand lines” para “dibujar” el largo de cada una de las cilias observadas. Luego utilizando la herramienta del programa “Measure” se determinó el largo (en μm) de cada una de las cilias “dibujadas”. Los datos fueron analizados por medio del programa Excell y se determinó el número de cilias, el largo promedio de las cilias y los desvíos y errores estándar.

Extracción de proteínas de cultivos celulares

Para la extracción de proteínas a partir de las placas de cultivo celular, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS precalentado a 37 °C. Luego se agregó buffer de lisis en un volumen de 1 ml por placa de 100 mm y 200 µl por placa de 35 mm. Se incubaron las placas sobre hielo durante 15 minutos y luego se rastrillaron para desprender las células utilizando un rastrillo de células (“*cell scraper*”, VWR). Se resuspendieron las células con pipeta y se transfirieron a un tubo *ependorf*. Se incubaron en hielo durante 15 min con vórtex cada 2 min. Se centrifugaron 15 min a 20000 g y 4 °C. Se extrajo 50 µl para dosificar proteínas y el resto del sobrenadante se conservó a -20 °C.

Se utilizaron dos tipos de buffer de lisis, para determinar la actividad de mTORC un *buffer* conteniendo (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40, 50 mM NAF, 1 mM Na₃VO₄, 0,5% Deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF, inhibidores de proteasas), y para las inmunoprecipitaciones uno conteniendo (120 mM NaCl, 40 mM Hepes, 1 mM EDTA, 50 mM NAF, 1 mM Na₃VO₄, 0,3% CHAPS, inhibidores de proteasas).

Dosificación de proteínas

Se dosificó la concentración de proteínas a partir de 10 µl de diluciones del lisado de células. Se utilizó el método de Ácido bicinonínico (BCA, QuantiPro BCA Assay Kit, Sigma-Aldrich #BCA1) según el protocolo aportado por el fabricante para placa de 96 pocillos. Se realizaron las medidas por triplicado para cada muestra. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de Sero-Albúmina Bovina (BSA). Las muestras fueron medidas por espectrofotometría a 562 nm en un lector de placas de ELISA y se analizaron los datos por medio del programa Excell.

Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia

Las proteínas fueron separadas según su peso molecular por una electroforesis SDS-PAGE en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Las muestras disueltas en Laemmli buffer conteniendo β -mercaptoetanol fueron hervidas durante 5 min, enfriadas en hielo y luego se sembró la cantidad deseada. Se utilizó como buffer de corrida TGS (24 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 3,5 mM SDS, pH 8,3-8,6) y las muestras fueron corridas en geles de diferentes porcentajes (10 a 15%). La electroforesis se realizó a 30 mA por gel hasta alcanzar la separación deseada. Por gel se sembró un marcador de peso molecular apropiado (NEB #P7711S y 7708S, Fermentas #SM1811). Posteriormente se realizó una electrotransferencia de las proteínas corridas en el gel a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, Amersham-GE Healthcare) durante 75 min a 400 mA.

Western Blot

Luego de la electrotransferencia, las membranas de PVDF fueron incubadas con leche al 5% en PBS-Tween20 0,05%, durante 30 minutos en agitación. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo apropiado en PBS-T, durante 1-4 h o toda la noche a 4 °C con agitación. Posteriormente fueron lavadas con sucesivos cambios de PBS-T e incubadas durante una hora con el anticuerpo secundario apropiado conjugado a HRP (*Horse Radish Peroxidase*, Sigma-Aldrich). Para la reacción y revelado se usó el sistema de quimioluminiscencia (ECL plus, de Amersham-GE Healthcare) y placas de rayos X, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En Western blot se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

Monoclonal Anti-GAPDH (Sigma-Aldrich #G8795) 1:1000

Monoclonal Anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439) 1:5000

Monoclonal Anti- α -Tubulina (Sigma-Aldrich #6074) 1:2000

Policlonal Anti-Rictor (Bethyl Labs #A300-459A) 1:5000

Policlonal Anti-Raptor (Bethyl Labs #A300-506A) 1:5000

Policlonal Anti-SIN1 (Bethyl Labs #A300-910A) 1:5000

Monoclonal Anti-FosfoAkt(S473) (Cell Signaling #4060) 1:1000

Monoclonal Anti-Akt (Cell Signaling #4685) 1:2000

Policlonal Anti-mTOR (Cell Signaling #2972) 1:1000

Policlonal Anti-FosfoS6(S235/236) (Cell Signaling #2211) 1:1000

Monoclonal Anti-Fosfo4EBP1(T37/46) (Cell Signaling #2855) 1:1000

Policlonal Anti-4EBP1 (Cell Signaling #9452) 1:1000

Anti-Mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich #A9044) 1:16000

Anti-Rabbit IgG HRP (Sigma-Aldrich #A0545) 1:20000

Identificación de proteínas por medio de MALDI-TOF-TOF

Las muestras a ser sometidas a una electroforesis bidimensional fueron preparadas por medio de precipitar 50 µg de proteína total de cada muestra con el kit *2D CleanUp* (GE Healthcare) y resuspendidas en 125 µl de buffer de rehidratación (7 M urea, 2 M urea, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer 3-10, 17 mM DTT, 0,002% azul de bromofenol). Los geles de cada muestra se realizaron por duplicado para tinción con azul de Coomassie y para transferencia a membrana y posterior *Western blot*.

Para la primera dimensión (IEF) se cargaron las muestras en tiras IPG de 7 cm y rango de pH 3-10 (GE Healthcare) por rehidratación pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente. Se realizó el siguiente programa: 1) 300 V, 30 min, constante, 2) 1000 V, 30 min, en gradiente, 3) 5000 V, 80 min, en gradiente, 4) 5000 V, hasta 2000 Vh, constante, y se alcanzaron los siguientes parámetros: 3664 V, 49 µA, 2 h 599 min, 6476 Vh. Luego las "tiras" fueron equilibradas por incubación 15 min a TA con agitación en un buffer conteniendo: 6 M urea, 75 mM Tris pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol y 10 mg/ml DTT. Luego fueron transferidas a un buffer conteniendo: 6 M urea, 75 mM Tris pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol y 25 mg/ml IAA e incubadas durante 15 min a TA con agitación. Luego se realizó la segunda dimensión (SDS-PAGE) en geles al 12,5% de dimensiones 10 x 10 x 0,1 cm. Las muestras

fueron corridas durante 15 min a 10 mA/gel y luego a 20 mA/gel hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel.

Para teñir los geles con azul de Coomassie, se siguió el siguiente protocolo: los geles fueron fijados por incubación en TCA 20% durante 30 min, luego transferidos a una solución de desteñido (40% EtOH, 7% ácido acético) durante 5 min y luego incubados con una solución de azul de Coomassie (0,2% en solución de 10% ácido acético, 50% metanol, 40% H₂O) ON. Los geles fueron desteñidos con una solución conteniendo 40% EtOH y 7% ácido acético durante 30 min y luego por una solución conteniendo 5% EtOH y 7% ácido acético. Los geles fueron escaneados y analizados por medio del programa Melanie 6.0 (Genebio, Swiss Institute of Bioinformatics).

Los geles para *Western blot*, fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa a 250 mA durante 2 h a 10 °C. La transferencia de las proteínas a la membrana se chequeó por tinción con Rojo Ponceau S. La membrana fue bloqueada con BSA 5%, en PBS-Tween20 0,1%, durante toda la noche a 4 °C y luego se realizó el *Western blot*.

Los “spots” seleccionados se purificaron a partir de los geles teñidos con azul de Coomassie y analizados en un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF/TOF de Ab Sciex.

Ensayo de doble híbrido en levaduras

Se utilizó el sistema citoplasmático CytoTrap de Stratagene con la cepa de levaduras *cdc25H*: Mat *ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺*. En esta tesis se realizó únicamente la confirmación de los interactores determinados previamente. Se trabajó con clones de levaduras *cdc25H* conteniendo a los vectores pSOS, pSOS-CCDC28B, pMyr, pMyr-CINP, pMyr-NCKAP5, pMyr-PTPRA o pMyr-SIN1. Como controles positivos del ensayo se utilizaron clones conteniendo la combinación de vectores pSOS-MAFB/pMyr-MAFB y como controles negativos a clones conteniendo la combinación de vectores pSOS-MAFB/pMyr-LamC o pSOS-Coll/pMyr-MAFB o pSOS/pMyr. Todos fueron crecidos a 25 y 37 °C en placas conteniendo glucosa o galactosa y en ausencia de Leucina y Uracilo (sin Leucina para selección del vector pSOS y sin Uracilo para el vector pMyr).

Inmunoprecipitaciones

Para las inmunoprecipitaciones (IPs) se utilizaron lisados de células HEK293 previamente transfectadas o sin transfectar. Se cuantificó la concentración de proteína de cada lisado y se incubaron 500 µg de proteína con 1,5 µg del anticuerpo utilizado durante 2 h con rotación y a 4 °C. Luego se agregó una mezcla de 30 µl de esferas de sefarosa conjugadas con proteína A y proteína G (EZview Red Protein, Sigma-Aldrich #EP6486 y #E3403) y se incubaron durante 90 min con rotación y a 4 °C. Las esferas fueron posteriormente lavadas tres veces y resuspendidas en Laemmli *buffer* y analizadas por *Western blot*.

En las IPs se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

Monoclonal Anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439) 1:1000

Policlonal Anti-Rictor (Bethyl Labs #A300-459A) 3 µg/ 1 mg de lisado

Policlonal Anti-Raptor (Bethyl Labs #A300-553A) 3 µg/ 1 mg de lisado

Policlonal Anti-SIN1 (Bethyl Labs #A300-910A) 3 µg/ 1 mg de lisado

Policlonal Anti-mTOR (Cell Signaling #2972) 1:100

Como control se utilizaron IgG purificadas de conejo (Sigma-Aldrich #I8140) 3 µg/ 1 mg de lisado

Anti-Mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich #A9044) 1:16000

kit ReliaBlot rabbit (Bethyl #WB120) 1:8000

Ensayo de ciclo celular

Células HeLa fueron transfectadas por la técnica de fosfato de calcio con el vector pSUPERCCDC28B o el vector pSUPER vacío (ev). 72 h post-transfección las células fueron “levantadas” de la placa de cultivo por tripsinización y concentradas por centrifugación. El pellet de células (1×10^6 células) fue fijado por incubación por goteo con 1 ml de EtOH 70% frío durante 30 min a 4 °C. Luego fueron lavadas dos veces con PBS 1X e incubadas con ARNasa (50 µg/ml, Invitrogen) durante 15 min a TA. Luego se agregó Ioduro de

Propidio (50 µg/ml, Invitrogen) y se incubó 1 h a TA. Luego las muestras fueron analizadas en un citómetro CyAn Flow de Beckman Coulter con los filtros apropiados.

Ensayo de proliferación celular

Células HeLa fueron transfectadas con los oligonucleótidos CCDC28B y control y se analizó la tasa de proliferación celular por medio del *kit Click-It* (Invitrogen). Brevemente a las 48 h post-transfección las células fueron incubadas con 10 µM del nucleósido EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) durante 2 h a 37 °C. Luego se recogió el sobrenadante y las células fueron lavadas con PBS, conservándose el sobrenadante. Las placas de células fueron tripsinizadas y las células y los sobrenadantes fueron recolectados por centrifugación. Se lavó el pellet en PBS+BSA 1%, se centrifugó y se fijaron las células con 200 µl de PFA 4% durante 15 min. Se lavaron con PBS+BSA 1% y se guardaron a 4 °C o se contaron las células y se prosiguió trabajando con $0,5 \times 10^6$ células. Las células se permeabilizaron con 50 µl de TritónX100 durante 30 min, se lavaron con 1,5 ml de PBS+BSA 1%, se centrifugaron y se resuspendieron en 250 µl de un *cocktail* conteniendo: 1x Reactivo Buffer, 2 mM CuSO₄, 1,25 µl Alexa fluor 488 azida, 1x Buffer aditivo, H₂O csp 250 µl. Se incubaron las células durante 30 min en oscuridad y luego se lavaron con PBS+BSA 1%. Se centrifugaron y se resuspendieron en 600 µl de PBS+BSA 1%. Se agregó Ribonucleasa A (200 µg/ml) e IP (10 µg/ml). Se incubó 30 min-1 h a TA y en oscuridad y se analizaron las muestras en un citómetro CyAn Flow de Beckman Coulter con los filtros apropiados.

Ensayo de inhibición del proteasoma

Se trabajó con células HeLa, las cuales fueron transfectadas con los vectores pSUPERCCDC28B o pSUPER vacío (ev) y 72 hs post-transfección fueron incubadas durante 6 h con 50 µM del inhibidor del proteasoma MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma-Aldrich #C2211). Luego las células fueron procesadas para *Western blot* para determinar los niveles de mTOR en las diferentes condiciones (pSUPER ev con y sin MG132 y pSUPERCCDC28B con y sin MG132).

Cultivo, electroporación y selección de clones de células madre embrionarias de ratón

Las células ES fueron crecidas a 37 °C y 5% CO₂ en un medio conteniendo DMEM (alta glucosa, GlutaMax), 15% suero fetal bovino (Invitrogen), 2 mM l-glutamina (GIBCO), 50 µg/ml Penicilina/Streptomina, 0,1 mM MEM amino ácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, 0,1 mM β-ME, 1000 U/ml LIF (Chemicon #ESG1107). Para evitar su diferenciación fueron sembradas sobre una capa de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) previamente tratados con Mitomicina C (10 µg/ml, Sigma #M0503) para evitar que proliferen. Se realizaron cambios diarios del medio y se mantuvieron en cultivos no confluentes. Se electroporaron 8 millones de células con 25 µg del plásmido linealizado y se sembraron en placas con MEFs. La selección de los clones se realizó por la presencia de Geneticina (200 µg/ml, Sigma-Aldrich #G9516) en el medio de cultivo durante 5-8 días. Se levantaron aquellas colonias que sobrevivieron por aspiración con pipeta automática, bajo microscopio y en condiciones de esterilidad. Cada clon aislado fue tripsinizado y dividido en dos pocillos de dos placas diferentes de 96 pocillos, una para congelar y la otra para realizar la extracción de ADN.

Extracción de ADN de clones de células madre embrionarias de ratón

Se utilizó un protocolo adaptado a partir de (Ramirez-Solis, 1992). Se extrajo el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos y luego las células fueron lavadas con PBS y se invirtió la placa sobre papel absorbente para extraer todo el líquido. Se agregaron 50µl de *buffer* de lisis por pocillo (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,50% SDS, 0,1 mg/ml Proteinasa K) y se incubó en cámara húmeda a 56 °C ON. Se agregó en cada pocillo 100 µl de la solución de precipitación (75 mM NaCl en 100% EtOH frío) y se incubó 15-30 min a TA sin movimientos. Se agregó 200 µl de EtOH 70% por pocillo y se incubó durante 15 min. En este punto, el ADN precipita y queda levemente adherido al fondo de cada pocillo. Para extraer el líquido se rotó la placa hasta una posición vertical y luego se realizaron dos nuevos lavados con EtOH 70%, rotando en más grados la placa en cada lavado. Se realizó un lavado final donde la extracción del líquido se logró por inversión completa de la placa sobre papel absorbente. Se dejó secar el ADN 15-20 min y se resuspendió el ADN

de cada pocillo en 30 μ l de H₂O ultrapura y se conservó en tubos *ependorf* separados, a 4 °C.

Southern Blot

El ADN de los clones de células ES (25 μ l) fue digerido ON a 37 °C con la enzima KpnI (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa (0,8%) y transferidas a una membrana de nylon cargada positivamente (GE Healthcare). La transferencia se realizó por pasaje por capilaridad de 0,4 N NaOH a través del gel y hacia la membrana. Luego el ADN fue adherido (“crosslinking”) a la membrana por exposición a UV.

Preparación de la sonda radioactiva

La sonda fue marcada radiactivamente por medio del *kit Random Primers DNA Labeling System* de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hirvieron durante 5 min 60 ng del molde de ADN (Volumen final 20 μ l) y se enfrió en hielo. Se agregó dATP, dGTP y dTTP (2 μ l de soluciones 0.5 mM), 15 μ l de *buffer random primer*, 5 μ l de [α -³²P]dCTP (ARC Inc), 1.5 μ l del fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* (3 U/ μ l) y H₂O ultrapura hasta volumen final de 50 μ l. Se incubó a 25°C durante 2 horas. Luego los nucleótidos no incorporados fueron removidos por medio de una columna sephadex G-50 (MicroSpin™ G-50, Amersham Pharmacia).

Hibridación y autorradiografía

Previo a la hibridación, las membranas fueron incubadas con el buffer de pre-hibridación (1% de leche descremada, 2% SDS, 3X SSPE, 0,25 mg/ml de ADN de esperma de salmón previamente hervido, H₂O ultrapura hasta volumen final de 20 μ l) durante 3 h a 60 °C. Luego se hirvió 5 min la sonda marcada radiactivamente, se enfrió en hielo y se agregó en 20 ml del buffer de hibridación conteniendo: 10% de sulfato de dextrano, 1,5X SSPE, 1% SDS y 0,5% de leche descremada. Se agregó sobre la membrana y se incubó a 65 °C ON. Las membranas fueron lavadas con 2X SSC/0,1% SDS durante 30 min a 65 °C, luego con

dos lavados de 15 min con 0,1X SSC/0,1% SDS a 65 °C. Las membranas fueron luego expuestas a placa de rayos X (GE Healthcare) y se expusieron durante 1-7 días.

Extracción de ADN genómico a partir de segmento de cola de ratón

Se utilizó 0,5 cm de cola de ratones de ~21 días. Cada muestra fue incubada con 750 µl de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% SDS, 1 mM CaCl₂ y 500 µg/ml de Proteinasa K) ON a 55 °C. Luego se agregó a cada muestra 100 ng/µl de ARNasa y se incubó 30 min a TA. Se agregó 250 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 5 min. Se centrifugó a 14000 rpm a TA durante 5 min y se transfirió la fase superior a un tubo limpio. Se agregaron 500 µl de cloroformo y se agitó durante 5 min. Se centrifugó a 14000 rpm a TA durante 5 min y se transfirió la fase superior a un tubo limpio. Se agregaron 500 µl de isopropanol y se agitó vigorosamente. Se incubó 10 min a TA. Luego se centrifugó a 10000 rpm a TA y se extrajo todo el sobrenadante conservando ~50 µl de líquido. El pellet fue lavado dos veces con 1 ml de EtOH 70% y centrifugación a 14000 rpm durante 3 min. Se extrajo el sobrenadante y se dejó secar el pellet 1 h a TA. Se resuspendió cada muestra en 100 µl de H₂O ultrapura y se conservaron a 4 °C.

Composición y preparación de soluciones utilizadas:

10X Tris-borate (TBE)	108 g tris base, 55 g ácido bórico, 9,3 g EDTA, H ₂ O ultrapura csp 1 litro.
PBS (1X)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HP ₄ y 0,24 g KH ₂ PO ₄ , H ₂ O ultrapura csp 1 litro. Ajustar el pH a 7,4 con HCl. Autoclavar.
20XSSC	175,3 g NaCl, 88,2 g citrato de sodio, H ₂ O ultrapura csp 1 litro. La solución 1X es 0,15 M NaCl y 0,015 M citrato de sodio.

20X SSPE	175,3 g NaCl, 27,6 g NaH ₂ PO ₄ , 9,4 g EDTA, pH 7,4 H ₂ O ultrapura csp 1 litro. La solución 1X es 150 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ y 1 mM EDTA.
10X TGS buffer	30,2 g Tris, 94 g Glicina, 5 g SDS, H ₂ O ultrapura csp 1 litro.
4X Laemmli buffer	3 g Tris-HCl (pH 6,8), 40 ml glicerol, 5 g SDS, 5 mg azul de bromofenol, H ₂ O ultrapura csp 100 ml. Agregar 10% β-mercaptoetanol antes de usar.
Buffer de transferencia	1X TGS, 20% metanol
ortovanadato de sodio	Preparar una solución de 100 mM en H ₂ O, ajustar el pH 10, hervir en microondas y conservar a TA.

Medios de cultivo para bacterias:

- Luria and Bertani broth	10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, H ₂ O ultrapura csp 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 MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glucosa.

Medios de cultivo para levaduras:

- 2X SC-4 (-Leu, -Trp, -His, -Ura)	3,9 g -4 amino acid dropout powder, 5,1 g bases nitrogenadas de levaduras sin amino ácidos, 15 g sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄ , H ₂ O ultrapura csp 1,5 litro. Se separan en 5 botellas con 300 ml cada una. Se autoclava. Se enfría a TA.
- 4% Agar	12 g en 300 ml de H ₂ O ultrapura.

El medio SC se prepara agregando 300 ml de H₂O ultrapura estéril (para medio líquido) o 300 ml de Agar 4% derretido (para preparar placas) a 300 ml de 2X SC-4. Luego se agregan 5 ml de cada uno de los aminoácidos necesarios. Dependiendo de la fuente de carbono, se agrega glucosa (2% final) o galactosa (2% final) y rafinosa (1% final).

El pez cebra: un modelo animal para el estudio de las ciliopatías

A continuación se presenta primero una breve introducción al modelo de pez cebra y luego se describen las técnicas y los protocolos específicos que se utilizaron.

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en uno de los principales modelos de experimentación animal. La visión pionera y los grandes aportes hechos por George Streisinger y otros científicos de la Universidad de Oregon, permitieron en menos de treinta años posicionarlo como modelo para el estudio de la biología de los vertebrados, particularmente para el estudio del desarrollo embrionario, para análisis genéticos y como modelo de enfermedades humanas (Grunwald & Eisen, 2002). *Danio rerio* es un pez teleósteo, de agua tropical, que pertenece al Orden de los Cipriniformes y es originario de los ríos de la India, Pakistán, Nepal y Bután en el sur de Asia. Su nombre común se debe a la presencia de bandas longitudinales de color azul que se extienden a todo el largo de su cuerpo y le dan un aspecto similar al de una cebra (**Figura 80**). En su estado adulto es un pez pequeño, que alcanza unos 4-5 cm de largo, de fácil mantenimiento en cautiverio y de comportamiento diurno y social.

Una de sus características más favorables como modelo animal es su modo de reproducción externa, lo cual confiere la ventaja de poder estudiar las primeras etapas del desarrollo embrionario así como estudiar y controlar los tiempos de la fecundación. Alcanzan su madurez sexual entre los 3-4 meses de edad y cada hembra desova alrededor de 200-300 huevos por puesta, los cuales en cautiverio son fáciles de recolectar. Una de las principales ventajas es que los huevos son transparentes y su desarrollo embrionario es muy rápido (**Figura 80**). Esto permite visualizar y registrar en tiempo real todo el desarrollo de los órganos, el cual transcurre en las primeras 24 horas post fertilización (hpf) (Kimmel, 1995).

En la **Figura 81** se muestran las distintas etapas del desarrollo del pez cebra hasta las 48 hpf (Kimmel, 1995).

Figura 8o_Pez cebra.

A) Foto de un pez cebra adulto. B) Foto de un embrión de pez cebra de 28-30 horas post-fertilización. Tomado de: página web de Zebrafishlab, Gamete Research Center.

A

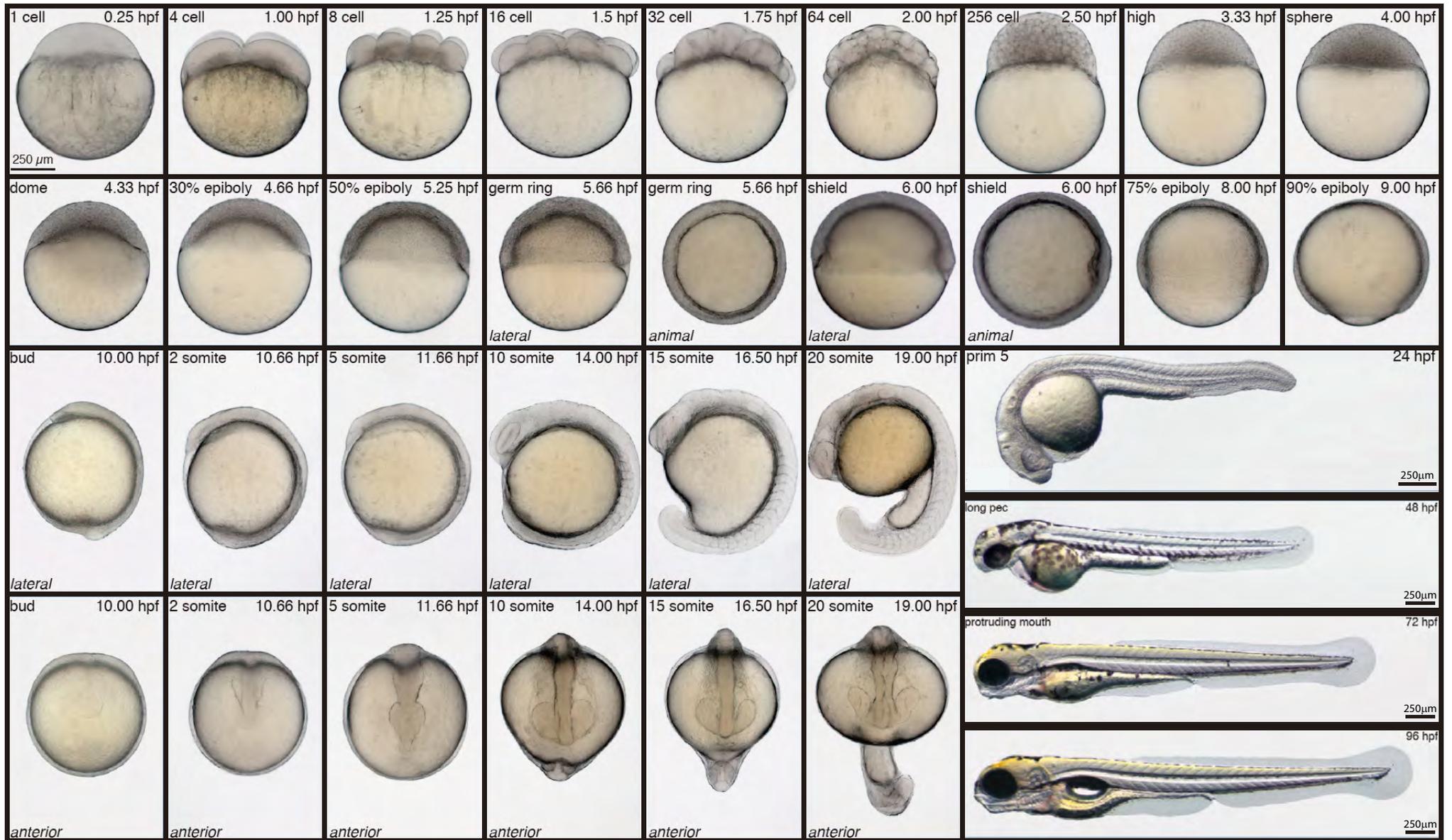


B



Figura 81_Etapas del desarrollo embrionario del pez cebra hasta las 96 horas post-fertilización.

Adaptado de: GoFish, Developmental Stages in Zebrafish. Genesis.



Una 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 fáciles para manipular la expresión génica. También se dispone de una gran biblioteca de mutantes, generada por medio de ensayos de mutagénesis y búsqueda de fenotipos, que es de libre acceso para toda la comunidad científica (<http://zfin.org>; http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/zmp).

Inhibición de la expresión de genes en embriones de pez cebra

El desarrollo de la técnica de microinyección en embriones tempranos de diversas moléculas tales como ADN, ARN y oligonucleótidos, fue quizás lo que impulsó el gran auge en el uso de este modelo animal. De particular importancia fue el desarrollo en el año 2001 de la técnica de microinyección de morfolidos, los cuales permiten de manera muy efectiva bloquear transitoriamente la expresión de cualquier gen de interés (Summerton, 1999; Draper, 2001). Los morfolidos (MO) son oligómeros, formados por bases modificadas químicamente que presentan un anillo de morfolido en lugar de la ribosa, y las bases están unidas entre sí por enlaces fosforodiamidato (**Figura 82**). Estas modificaciones determinan que no tengan carga eléctrica y que sean altamente solubles, lo que les permite no solo hibridarse con alta afinidad con secuencias complementarias de ácidos nucleicos de simple cadena, sino que además no generan toxicidad dentro de las células. Otra ventaja es que son extremadamente estables porque no son reconocidos por ninguna endonucleasa, lo que les permite en el caso del pez cebra, bloquear la expresión del gen hasta 5 días post fertilización (Egger & Larson, 2001; Bill, 2009).

Existen dos tipos de MOs que se diferencian en el modo de acción. Por un lado, los MO atg o bloqueadores de la traducción, los cuales se unen a secuencias complementarias dentro de la región 5' no traducible (5'UTR) y próxima al codón de inicio de la traducción del ARN mensajero (ARNm), bloqueando de este modo el sitio donde se ensamblan los ribosomas. Por otro lado, los MO *splice* están diseñados para unirse por complementariedad a las secuencias de unión entre exón-intrón, alterando de este modo el correcto procesamiento de los ARNm. Si el diseño es el correcto, la unión de un MO

splice puede provocar que se saltee un exón o bien que quede un intrón retenido, lo que conlleva en ambos casos a la producción de una proteína no funcional (**Figura 82**). Es de suma importancia la verificación del funcionamiento correcto del MO. En el caso de los MOatg se puede utilizar un anticuerpo contra la proteína blanco, y por medio de un Western blot o inmunodetección en el embrión entero, determinar la eficiencia de la reducción de la expresión. Si no se cuenta con un buen anticuerpo, una posible solución es coinyectar un ARN que contenga la región 5'UTR del gen de interés acoplado a la secuencia de una proteína reportera como ser GFP (del inglés *green fluorescent protein*) y evaluar la reducción de esta señal. La eficiencia de un MO*splice* puede ser determinada por medio de una reacción de retrotranscripción y posterior PCR (rt-PCR), determinando así la cantidad de ARNm incorrectamente procesado.

Los MO son inyectados en el vitelo de embriones de 1-8 células y son transportados hacia el polo animal del embrión por los haces de microtúbulos. El MO se distribuye entre todas las células del embrión, ya que en esos estadios las células están unidas por puentes citoplasmáticos, lo que permite alterar la expresión de un gen particular homogéneamente en todo el embrión. Es importante mencionar que debido al modo de acción diferente de los dos tipos de MOs, éstos alterarán la expresión de los genes blanco en distintas etapas del desarrollo. Los embriones de pez cebra, al igual que en otros vertebrados e invertebrados, poseen un conjunto de ARN mensajeros de origen materno que les permite conducir las primeras etapas del desarrollo hasta que comienza la expresión de los genes embrionarios. La etapa donde ocurre la degradación de los ARNm maternos y se activa el genoma embrionario, se conoce como “transición de la blástula media” (MBT, del inglés *mid-blastula transition*), y en el caso del pez cebra ocurre aproximadamente en el estadio de 512 células (Tadros & Lipshitz, 2009). Es por esto, que un MOatg puede bloquear la expresión del ARNm materno presente en el vitelo del embrión y posteriormente del ARNm codificado por el genoma del embrión. Esto determina que los MOatg actúan desde el inicio del desarrollo, lo que permite estudiar la contribución de determinados genes en esas primeras etapas. En cambio, por el modo de acción de los MO *splice*, estos alterarán únicamente la expresión de los genes embrionarios, ya que los ARNm maternos fueron sometidos a *splice* previamente.

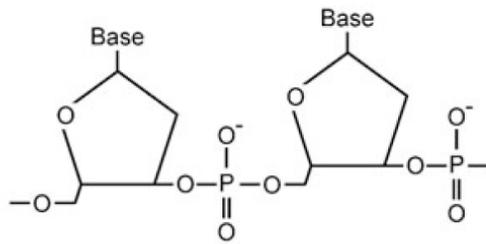
Otra ventaja del pez cebra es la posibilidad de inyectar fácilmente moléculas de ARN o ADN, lo que permite expresar genes exógenos y posteriormente evaluar el efecto de la sobre-expresión o bien para rescatar fenotipos causados por la acción de un MO y verificar así su especificidad.

Figura 82_Morfolinos.

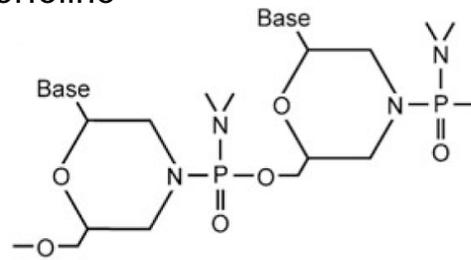
A) Comparación entre la estructura del ADN y un oligonucleótido morfolino. B) Funcionamiento de un MOatg. La unión del MO a la región 5'UTR impide que la maquinaria de síntesis proteica se una y traduzca la proteína. C) Funcionamiento de un MOsplice diseñado para un sitio donador de splice. La unión de este tipo de MO genera la retención del intrón. D) Funcionamiento de un MOsplice diseñado para un sitio aceptor de splice. La unión de este tipo de MO genera la eliminación de un exón.

A

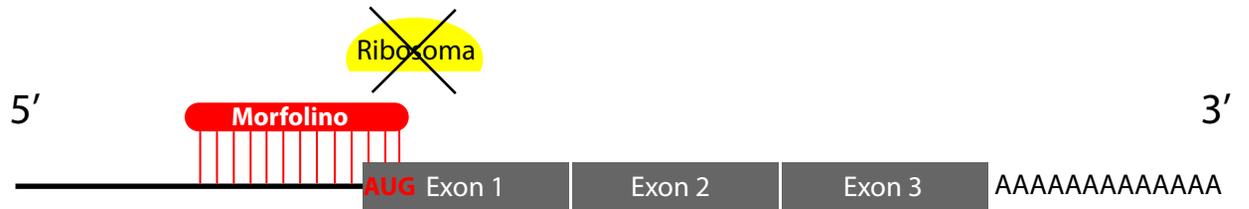
ADN



Morfolino

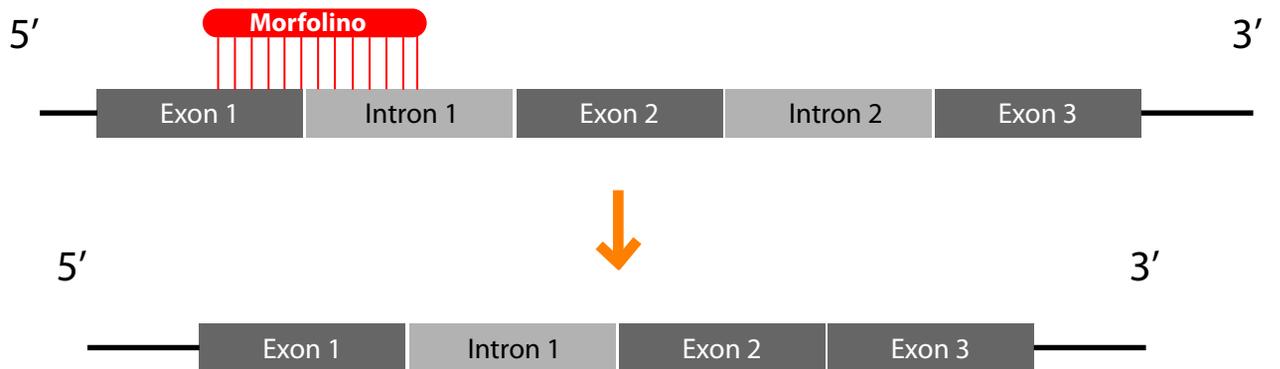
**B**

MOatg

**C**

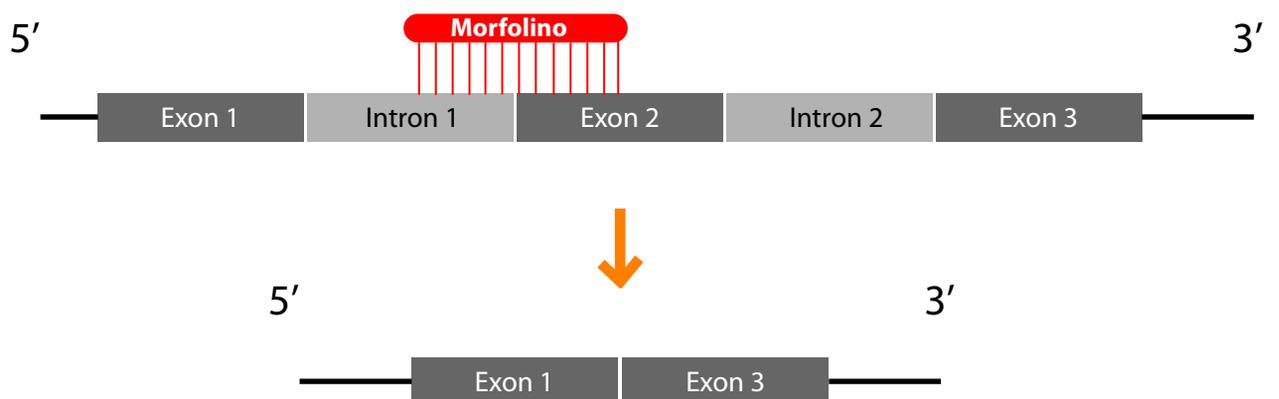
MOsplice

(bloqueo sitio donador splice)

**D**

MOsplice

(bloqueo sitio aceptor splice)



Análisis de las cilias en el pez cebra

Debido al alto grado de homología que se observa a nivel genómico entre el pez cebra y el hombre (70-80%, http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/), el pez cebra se convirtió rápidamente en un excelente modelo para el estudio de enfermedades humanas, incluidas las ciliopatías. Una gran ventaja que presenta es la facilidad con la que se puede modificar la expresión de genes y observar en poco tiempo las consecuencias que esto tiene sobre el desarrollo, y así poder inferir posibles funciones para proteínas desconocidas. En el caso del estudio de las ciliopatías, el pez cebra es ideal porque permite analizar genes requeridos para la ciliogénesis y para la función ciliar, por medio de combinar la manipulación genética con imagenología de alta calidad y resolución *in vivo* (Malicki, 2011; Zaghoul & Katsanis, 2011; Drummond, 2009).

El pez cebra presenta muchos órganos ciliados de fácil acceso, los cuales permiten estudiar tanto a las cilias móviles como a las cilias primarias. Algunas de las estructuras u órganos que se utilizan más comúnmente para el estudio de las cilias son: la vesícula de Kupffer (KV), los pronefros, el tubo neural y neuronas del sistema sensorial, tales como los fotorreceptores, las células ciliadas del oído interno, el epitelio olfatorio y las células de los neuromastos de la línea lateral. A continuación describimos brevemente la distribución de las cilias en la vesícula de Kupffer y en los pronefros porque fueron las cilias de esos órganos los estudiados principalmente en esta tesis.

Vesícula de Kupffer

La vesícula de Kupffer (KV) es quizás la estructura más utilizada para estudiar la función de las cilias en el pez cebra. Esta vesícula fue descrita por primera vez por Kupffer en 1868 y se determinó que está presente en todos los peces teleósteos (Kunz, 2004). Es una estructura esférica y cerrada, que se encuentra ventral a la notocorda en el primordio de la cola del embrión. Es una estructura transitoria, ya que se forma en el estadio de cuatro somites (11 horas post-fertilización; hpf) y desaparece luego del estadio Prim5 (24 hpf), aunque en el estadio de 8-12 somites es cuando se la visualiza mejor. Contiene un lumen lleno de líquido, tapizado por células epiteliales ciliadas, originadas a partir de un conjunto de células llamadas pioneras dorsales (“dorsal forerunner cells”; Cooper & D'Amico, 1996). La KV presenta cilias largas móviles, con una estructura 9+2, las

cuales son más abundantes en la porción dorsal anterior de la vesícula (Kreiling, 2007). A pesar de que tiene un origen diferente al nodo embrionario de los ratones, se ha demostrado que funciona como el centro generador de asimetría derecha-izquierda, donde el movimiento de sus cilias genera el movimiento de morfógenos y la consecuente expresión diferencial de genes a ambos lados del embrión (Essner, 2005).

Pronefros

En el curso de la evolución de los vertebrados han surgido tres tipos de riñones de complejidad creciente: los pronefros, mesonefros y metanefros. Los pronefros son el primer tipo de riñón en formarse durante la embriogénesis y en el caso del pez cebra, estos se originan a partir del estadio de 20 somites, siendo completamente funcionales a partir de las 36-48 hpf. A partir del estadio larval, los mesonefros se forman alrededor y a lo largo de los pronefros, constituyéndose en el riñón funcional de los peces adultos. Los pronefros en el pez cebra tienen dos poblaciones de células ciliadas, las células multiciliadas y las uniciliadas, que se ubican en diferentes regiones de los pronefros y surgen en distintas etapas del desarrollo (Drummond & Davidson, 2010; Malicki, 2011). Debido a que se ha demostrado que defectos en las cilias de los pronefros provocan la formación de quistes (Sun, 2004), estudiar el estado de estas cilias luego de modificar la expresión de un gen particular, ha aportado mucha información sobre la posible función ciliar de una proteína.

Cría, mantenimiento y obtención de embriones de pez cebra

Se trabajó con la línea salvaje Sanger AB Tübingen (SAT) obtenida del Zebrafish International Resource Center (ZIRC, Oregon, EEUU). La línea fue criada y mantenida en el laboratorio/bioterio de pez cebra del Instituto Pasteur de Montevideo bajo condiciones estándar (Brand, 1995). Los peces fueron mantenidos en tanques apropiados en un rack de Tecniplast (unidad *stand alone*) con control de la temperatura, pH y conductividad del agua. Para la obtención de embriones se realizaron los cruzamientos de machos y hembras en los tanques de cruzamientos y se recolectaron los embriones a la mañana siguiente. Los embriones fueron mantenidos en placas de Petri (100mm) con agua del rack y mantenidos a 28.5°C en una estufa.

Morfolinos utilizados

Todos los morfolinos utilizados fueron adquiridos en Gene Tools, LLC. Se prepararon soluciones stock a 20 ng/nl en agua estéril y se prepararon diluciones de trabajo que contenían en 0,5 o 1 nl la cantidad de morfolino (ng) que se quería inyectar. Los morfolinos y las diluciones fueron mantenidas a -20 °C e incubadas a 65 °C durante 10 min previamente a ser utilizadas.

MOstd: CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

MOspl Ccdc28b: TTTAGAAGACGCACACAAACCTTGT

MOspl mtor: AGTGATTTTCATGCTCACCTATGGC

MOspl sin1: GAGACTCAGACAGCTACTCGCCTGT

MOspl raptor: ATGGATGGATGGATGCTCACCTATC

MOspl rictor: ACCAACTTTTGAGTTAACAAACCTT

MOatg sin1: GTTGTCCAGGAAAGCCATTCTGAGC

MOatg rictor: CTCGGATGCTGACCGCCATCTTTAC

Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra

La sobre-expresión de Ccdc28b y sin1 en los embriones de pez cebra se realizó por medio de la inyección de los ARNm de cada uno de esos genes en el vitelo de los embriones. Primero se amplificaron y clonaron los ORF de Ccdc28b y sin1 del pez cebra en el vector pCS2+ (University of Michigan). Luego utilizando el sistema *mMESSAGE mMACHINE kit* (Applied Biosystems #AM1340) se sintetizó *in vitro* el ARN utilizando a la ARN polimerasa SP6 y siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante. El ARN fue conservado a -80 °C y se inyectó 100 pg de ARN por embrión. Los *primers* utilizados para el clonado de los genes están detallados en la **Tabla 5**.

Extracción de ARN de embriones de pez cebra

Se colocan 20-30 embriones de pez cebra de ≥ 24 hpf en un tubo eppendorf. Se extrae el agua y se congelan rápidamente en N₂ líquido y se conservan a -80 °C o se procesan como se detalla a continuación. Se colocan 50 μ l de Trizol sobre los embriones congelados y se homogeneizan usando micropestles (Eppendorf) y vortex. Se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Se colocan 10 μ l de cloroformo y se vortexea. Se incuba durante 5 min a TA. Se centrifuga durante 15 min a 4 °C ($\times 12000$ g). El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se agregan 25 μ l de isopropanol. Se mezcla y se incuba durante 10 min a TA. Luego se centrifuga durante 10 min a 4 °C ($\times 12000$ g). Se remueve y descarta el SN. Se lava el pellet con 50 μ l de EtOH 75°. Se vortexea y se centrifuga durante 5 min a 4 °C ($\times 7500$ g). Se deja secar el pellet durante 5 min. El pellet se disuelve en 10 μ l de H₂O libre de nucleasas. Se incuba durante 10 min a 55-60 °C. Se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm y se conserva a -80 °C.

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La síntesis del ADN copia se realizó por medio del *kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 μ g de ARN previamente tratado con DNAsas y para la síntesis del ADN copia se utilizaron hexámeros de *primers* al azar.

Hibridación *in situ* en embriones del pez cebra

Las sondas sentido y antisentido fueron marcadas con digoxigenina y sintetizadas por medio del *kit DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)* (Roche) a partir del vector pGEM (Promega) conteniendo el ORF de *cmlc2* (*cardiac myosin light chain 2*) o de *Ccdc28b* clonado. El vector pGEM *cmlc2* fue obtenido del laboratorio del Dr. P. Beales (Molecular Medicine Unit, Institute of Child Health, University College of London). Para generar la sonda antisentido el plásmido fue linealizado con la enzima BamHI y sintetizada con la ARN pol S6; para generar la sonda sentido el plásmido fue linealizado con XhoI y sintetizada con la

ARN pol T7. Se siguieron las instrucciones del fabricante y para remover el DIG-UTP no incorporado, las sondas fueron posteriormente purificadas por columnas G50 (GE) y luego conservadas a -80 °C.

Para realizar la hibridación *in situ* embriones de pez cebra de 24 o 48 hpf fueron removidos del corion y fijados con PFA 4% durante toda la noche a 4 °C. Luego fueron lavados con PBS-Tween20 (0,2%) y deshidratados por medio de una primera incubación de 5 min en 50% PBS-Tween20 (0,2%)/ 50% MeOH y luego una segunda incubación en 100% MeOH a -20 °C durante 2 h. Los embriones pueden ser conservados en metanol a -20 °C durante varios meses. Luego los embriones fueron re-hidratados por medio de incubarlos primero durante 10 min con 50% PBS-Tween20 (0,2%)/ 50% MeOH y luego con PBS-Tween20 (0,2%) durante 10 min. Luego los embriones fueron permeabilizados por medio de una incubación con Proteinasa K (10 µg/ml en PBS-Tween20 (0,2%); Sigma-Aldrich) durante 10 min (embriones 24 hpf) o 20 min (embriones 48 hpf) a temperatura ambiente. Posteriormente los embriones fueron re-fijados con PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron los embriones en PBS-Tween20 (0,2%) y luego con una solución de 50% PBS-Tween20 (0,2%)/ 50% Hybe durante 10 min. La solución de hibridación (Hybe) contiene: 50%Formamida, 5x SSC, 50 µg/ml Heparina, 500 µg/ml ARNt, 0,1% Tween20, 9,2 mM Ácido cítrico pH 6. Los embriones fueron pre-hibridados con la solución Hybe durante 1 h a 65 °C. Luego los embriones fueron incubados en la solución Hybe conteniendo una dilución 1:150 de la sonda e incubados a 65 °C ON. Al día siguiente se realizaron los siguientes lavados a 65 °C: 10min con solución Hybe (sin ARNt y heparina), 10 min 50% Hybe/ 50% 2xSSC, 10 min 2xSSC y 10 min 0.2xSSC. Luego se realizaron dos lavados a temperatura ambiente con 50% 0,2xSSC/ 50% MAB-Tween20 (0,1%) durante 10 min y luego con 100% MAB-Tween20 (0,1%) durante 10min. La solución MAB (Buffer Acido Maleico) contiene: 0,1 M Acido Maleico, 0.15M NaCl, pH 7,5. Luego los embriones fueron bloqueados con 2% *Boehringer Blocking Reagent* (Roche) en MAB, durante 1 h a TA y agitación y luego transferidos a una solución de 2% *Boehringer Blocking Reagent* en MAB conteniendo una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-DIG en la que se incubaron ON a 4 °C. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 10 min cada uno con MAB-Tween20 (0,1%). Los embriones fueron incubados en la solución BCL (100 mM Tris-HCl (pH9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, Tween20 (0,1%)) durante 10 min a TA (2 veces). Luego la solución

se reemplazo por solución BCL + NBT/BCIP (20 µl/ml de BCL) y se mantuvo protegido de la luz hasta el desarrollo de la marcación. La reacción se detiene por medio de tres lavados con PBS-Tween20 (0,2%) de 5 min cada uno o con 100% MeOH durante 10 min.

Ensayo de funcionalidad de pronefros: inyección de dextrano de rodamina

El protocolo utilizado fue tomado de (Tobin & Beales, 2008). Se inyectó 1 nl de un dextrano de rodamina de 10 kDa (Invitrogen) en el pericardio de embriones de 72 hpf. Los embriones fueron montados a las 3 y 24 h post inyección en 3% metilcelulosa y se adquirieron imágenes con idénticos parámetros de captura utilizando un estereomicroscopio (Lumar V12; Carl Zeiss, Inc.) equipado con una cámara (AxioCam HRC; Carl Zeiss, Inc.) y el programa AxioVision (version 4.6; Carl Zeiss, Inc.). La intensidad de la fluorescencia en el corazón fue medida definiendo una región de 100×100 *pixeles* con el programa MacBiophotonic ImageJ (versión 1.47b, NIH). Entre los tiempos del experimento los embriones fueron mantenidos en “agua de pez” a 28,5 °C.

Inmunofluorescencia en embriones (*in toto* o “*wholemout*”)

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% ON a 4 °C. Luego lavados con PBS-Triton (1%) durante 5 min. Luego fueron 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 nuevo metanol 100% y se los mantuvo a -20 °C ON o hasta su uso. Luego los embriones fueron re-hidratados con 50% Methanol / 50% PBS-Triton (1%) durante 5 min y luego dos lavados de 5 min con PBS-Triton (1%). En el caso de embriones ≥ 24 hpf fueron incubados con 10 µg/ml de Proteinasa K (Sigma-Aldrich) durante 20 min (embriones 24 hpf) o 30 min (embriones ≥ 48 hpf). Se detuvo la reacción por medio de fijarlos 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, diluidos 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 (75% Glicerol, 0,1 M Tris pH8) para su observación por microscopía confocal.

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

Monoclonal Anti- γ -Tubulina (Sigma-Aldrich # T6557) 1:500

Monoclonal Anti- α -Tubulina acetilada (Sigma-Aldrich #T7451) 1:500

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG1 (γ 1) (Invitrogen #A21121) 1:1000

Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse IgG2b (γ 2b) (Invitrogen #A21144) 1:1000

Marcador nuclear: DAPI (Invitrogen #D1306) 1:2500

Tinción de cartílagos con Azul Alcían (*Alcian Blue*)

El Azul Alcían es un colorante básico polivalente que tiñe los mucopolisacáridos de los cartílagos. El protocolo que se utilizó es una adaptación de (Neuhauss, 1996). Embriones de 96 hpf fueron fijados ON en PFA 4% y lavados varias veces en PBS-Tween20 0,1%. Luego fueron deshidratados por medio de dos lavados con 50% Metanol / 50% PBS-Tween20 0,1% durante 5 min y con 100% Metanol durante 5 min. Luego se agregó nuevo Metanol 100% y se los mantuvo 20 min a -20 °C o hasta su uso. Luego los embriones fueron re-hidratados con 50% Metanol / 50% PBS-Tween20 0,1% durante 5 min y luego dos lavados de 5 min con PBS-Tween20 0,1%. Los embriones fueron transferidos a una solución de Azul Alcían (1% HCl, 70% EtOH, 0,1% Azul Alcían) y teñidos ON. Luego se retiró el exceso de colorante por medio de un lavado breve con EtOH acidificado (5% HCl, 70% EtOH) y luego una incubación en esa solución durante 4 h. Luego se lavaron con EtOH 100% y se los conservó en glicerol a 4 °C hasta su observación. Fueron montados en glicerol y observados y registrados en un estereomicroscopio (Lumar V12; Carl Zeiss, Inc.)

equipado con una cámara (AxioCam HRC; Carl Zeiss, Inc.) y el programa AxioVision (version 4.6; Carl Zeiss, Inc.).

Tinción de los filamentos de actina de las fibras musculares

Los filamentos de actina de las fibras musculares fueron detectadas por la tinción *in toto* con faloidina-rodamina (Invitrogen # R415). Embriones de 48 hpf fueron fijados ON a 4 °C. Luego fueron lavados dos veces con PBS-Triton (1%) durante 5 min. Se los incubó en acetona fría (-20 °C) durante 3 min. Luego fueron lavados dos veces con PBS-Triton (1%) durante 5 min. Luego fueron incubados con la faloidina-rodamina durante 30 min (dilución 1:40) a TA. Luego fueron lavados tres veces con PBS-Triton (1%) durante 5 min y montados en glicerol (75% Glicerol, 0,1 M Tris pH8) para su observación por microscopía confocal.

Extracción de proteínas de embriones de pez cebra

Se extrae el corion de ~30 embriones de ≥ 24 hpf y se los coloca en un tubo *Eppendorf* con 500 μ l de agua. Se les extrae 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 realizan tres lavados con H₂O ultrapura y centrifugación. Se extrae toda el agua y los embriones se congelan en N₂ líquido durante 5 min y luego se conservan a -80 °C. Para la obtención del lisado y extracción de las proteínas se colocan 50 μ l de buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, inhibidores de proteasas) sobre el *pellet* de los embriones y se homogeneizan utilizando *micropestles* (Eppendorf). El lisado se centrifuga durante 30 min a 20000 g a 4°C. Se conserva el sobrenadante y posteriormente se determina la concentración de proteínas.

La cuantificación de proteínas y los *Western blots* fueron realizados como se detalló para las muestras de células de mamíferos.

Administración de rapamicina a los embriones de pez cebra

La rapamicina (Cell Signaling #9904) se administró, a la concentración final utilizada, en el agua de los peces desde las 24 hpf y durante 48-72 hs. Se realizaron reemplazos diarios de la solución.

Composición y preparación de soluciones utilizadas:

Metilcelulosa 3%

Para un volumen final de 300 ml se pesan 9 gr de metilcelulosa (Sigma-Aldrich #M-0387) y se disuelven en 100 ml de H₂O ultrapura precalentada a 80 °C. Se agrega lentamente 200 ml de H₂O ultrapura recientemente descongelada. Se agita hasta lograr la completa disolución y se mantiene a 4 °C ON. Luego se alicuota y se conserva a -20 °C.

PTU (1-phenyl 2-thiourea)

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 hpf, con reemplazo diario de la solución.

Referencias bibliográficas

- Aanstad, P., Santos, N., Corbit, K. C., Scherz, P. J., Trinh le, A., Salvenmoser, W., Huisken, J., Reiter, J. F. & Stainier, D. Y. (2009). The extracellular domain of Smoothed regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol* 19(12): 1034-1039.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Molecular Biology of the cell*. 5^{ta} edición, 2007. Editorial Garland.
- Abdul-Majeed, S., Moloney, B. C. & Nauli, S. M. (2012). Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 69: 165-173.
- Abu-Safieh, L., Al-Anazi, S., Al-Abdi, L., Hashem, M., Alkuraya, H., Alamr, M., Sirelkhatim, M. O., Al-Hassnan, Z., Alkuraya, B., Mohamed, J. Y., Al-Salem, A., Alrashed, M., Faqeih, E., Softah, A., Al-Hashem, A., Wali, S., Rahbeeni, Z., Alsayed, M., Khan, A. O., Al-Gazali, L., Taschner, P. E., Al-Hazzaa, S. & Alkuraya, F. S. (2012). In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 20: 420-427.
- Afzelius, B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193(4250): 317-319.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anderson, R. G. (1972). The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* 54(2): 246-265.
- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22(10): 1276-1312.
- Ansley, S. J., Badano, J. L., Blacque, O. E., Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., Kim, J. C., Ross, A. J., Eichers, E. R., Teslovich, T. M., Mah, A. K., Johnsen, R. C., Cavender, J. C., Lewis, R. A., Leroux, M. R., Beales, P. L. & Katsanis, N. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425: 628-633.
- Antic, D., Stubbs, J. L., Suyama, K., Kintner, C., Scott, M. P. & Axelrod, J. D. (2010). Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One* 5(2): e8999.
- Arden, K. C. (2004). FoxO: linking new signaling pathways. *Mol Cell* 14(4): 416-418.
- Armour, E. A., Carson, R. P. & Ess, K. C. (2012). Cystogenesis and elongated primary cilia in *Tsc1*-deficient distal convoluted tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F584-592.
- Ausubel (1994). *Currents Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Avasthi, P. & Marshall, W. F. (2012). Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation* 83: S30-42.
- Awan, A., Oliveri, R. S., Jensen, P. L., Christensen, S. T. and Andersen, C. Y. (2008). Characterization of Human Embryonic Stem Cells (hESCs) grown under feeder-free conditions. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press.

- Azari, A. A., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Schwartz, S. B., Windsor, E. A., Sumaroka, A., Cheung, A. Y., Steinberg, J. D., Roman, A. J., Stone, E. M., Sheffield, V. C. & Jacobson, S. G. (2006). Retinal disease expression in Bardet-Biedl syndrome-1 (BBS1) is a spectrum from maculopathy to retina-wide degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(11): 5004-5010.
- Badano, J. L., Kim, J. C., Hoskins, B. E., Lewis, R. A., Ansley, S. J., Cutler, D. J., Castellan, C., Beales, P. L., Leroux, M. R. & Katsanis, N. (2003). Heterozygous mutations in *BBS1*, *BBS2* and *BBS6* have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12: 1651-1659.
- Badano, J. L., Leitch, C. C., Ansley, S. J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R. A., Beales, P. L., Dietz, H. C., Fisher, S. & Katsanis, N. (2006). Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439: 326-330.
- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. & Katsanis, N. (2006). The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 22: 125-148.
- Bähler, M. & Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett* 513: 107-113.
- Baker, K. & Beales, P. L. (2009). Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C(4): 281-295.
- Baldari, C. T. & Rosenbaum, J. (2010). Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore. *Curr Opin Cell Biol* 22(1): 75-80.
- Banizs, B., Komlosi, P., Bevenssee, M. O., Schwiebert, E. M., Bell, P. D. & Yoder, B. K. (2007). Altered pH(i) regulation and Na(+)/HCO₃(-) transporter activity in choroid plexus of cilia-defective Tg737(orpk) mutant mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(4): C1409-1416.
- Banizs, B., Pike, M. M., Millican, C. L., Ferguson, W. B., Komlosi, P., Sheetz, J., Bell, P. D., Schwiebert, E. M. & Yoder, B. K. (2005). Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132(23): 5329-5339.
- Bardet, G. (1920). Doctoral thesis: Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes cliniques de l'obesite hypophysaire). Sorbonne University of Paris, Paris.
- Basu, B. & Brueckner, M. (2008). Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Top Dev Biol* 85: 151-174.
- Beales, P. L., Badano, J. L., Ross, A. J., Ansley, S. J., Hoskins, B. E., Kirsten, B., Mein, C. A., Froguel, P., Scambler, P. J., Lewis, R. A., Lupski, J. R. & Katsanis, N. (2003). Genetic interaction of *BBS1* mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72: 1187-1199.

- Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. & Flinter, F. A. (1999). New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36: 437-446.
- Bentzinger, C. F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J. B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C. F., Brink, M., Zorzato, F., Hall, M. N. & Ruegg, M. A. (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* 8(5): 411-424.
- Berbari, N. F., Johnson, A. D., Lewis, J. S., Askwith, C. C. & Mykityn, K. (2008). Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* 19(4): 1540-1547.
- Berchtold, D. & Walther, T. C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell* 20(5): 1565-1575.
- Bergman, K., Goodenough, U. W., Goodenough, D. A., Jawitz, J. & Martin, H. (1975). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Flagellar membranes and the agglutination reaction. *J Cell Biol* 67(3): 606-622.
- Biedl, A. (1922). Ein geschwisterpaar mit adiposo-genitaler dystrophie. *Deutsch Med Wochenschr* 48: 1630.
- Biegert, A. & Söding, J. (2009). Sequence context-specific profiles for homology searching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3880-3775.
- Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A. & Ekker, S. C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6(1): 69-77.
- Bin, J., Madhavan, J., Ferrini, W., Mok, C. A., Billingsley, G. & Héon, E. (2009). BBS7 and TTC8 (BBS8) mutations play a minor role in the mutational load of Bardet-Biedl syndrome in a multiethnic population. *Hum Mutat* 30: E737-746.
- Blacque, O. E., Reardon, M. J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M. R., Ansley, S. J., Badano, J. L., Mah, A. K., Beales, P. L., Davidson, W. S., Johnsen, R. C., Audeh, M., Plasterk, R. H. A., Baillie, D. L., Katsanis, N., Quarmany, L. M., Wicks, S. R. & Leroux, M. R. (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18: 1630-1642.
- Bloodgood, R. A. (2010). Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J Cell Sci* 123(Pt 4): 505-509.
- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H. W. & Viebahn, C. (2007). Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* 75(2): 133-146.
- Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Brecht, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M., Müller, K., Herbst, M., Hornung, M., Doerken, M., Köttgen, M.,

Nitschke, R., Igarashi, P., Walz, G. & Kuehn, E. W. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol* 12: 1115-1122.

- Bonnet, C. S., Aldred, M., von Ruhland, C., Harris, R., Sandford, R. & Cheadle, J. P. (2009). Defects in cell polarity underlie TSC and ADPKD-associated cystogenesis. *Hum Mol Genet* 18(12): 2166-2176.
- Boquist, L. (1970). Cilia and vesicular particles in the endocrine pancreas of the Mongolian gerbil. *J Cell Biol* 45(3): 532-541.
- Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. & Ciruna, B. (2010). Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nat Cell Biol* 12(4): 407-412.
- Boulbes, D. R., Shaiken, T. & Sarbassov dos, D. (2011). Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem Biophys Res Commun* 413(1): 46-52.
- Bracho-Valdes, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martinez, I., Robles-Molina, E., Chavez-Vargas, L. & Vazquez-Prado, J. (2011). mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* 63(10): 896-914.
- Brand, M., Beuchle, D., Endres, F., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Mullins, M., Schulte-Merker, S., Nüsslein-Volhard, C., Lück, R., Schwarz, K. J. and Schwarz, S. (1995). Keeping and raising zebrafish (*Danio rerio*) in Tübingen. *Zebrafish Science Monitor* 3, 2-7.
- Brazelton, W. J., Amundsen, C. D., Silflow, C. D. & Lefebvre, P. A. (2001). The *blt1* mutation identifies the *Chlamydomonas osm-6* homolog as a gene required for flagellar assembly. *Curr Biol* 11(20): 1591-1594.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369(6483): 756-758.
- Burghoorn, J., Dekkers, M. P., Rademakers, S., de Jong, T., Willemsen, R. & Jansen, G. (2007). 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7157-7162.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11: 82-88.
- Camner, P., Mossberg, B. & Afzelius, B. A. (1975). Evidence of congenitally nonfunctioning cilia in the tracheobronchial tract in two subjects. *Am Rev Respir Dis* 112(6): 807-809.
- Cardenas-Rodriguez, M. & Badano, J. L. (2009). Ciliary Biology: Understanding the Cellular and Genetic Basis of Human Ciliopathies. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C: 263-280.
- Carter, C. S., Vogel, T. W., Zhang, Q., Seo, S., Swiderski, R. E., Moninger, T. O., Cassell, M. D., Thedens, D. R., Keppler-Noreuil, K. M., Nopoulos, P., Nishimura, D. Y., Searby, C. C.,

Bugge, K. & Sheffield, V. C. (2012). Abnormal development of NG2+PDGFR-alpha+ neural progenitor cells leads to neonatal hydrocephalus in a ciliopathy mouse model. *Nat Med* 18(12): 1797-1804.

- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J. B. & Bettencourt-Dias, M. (2011). Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J Cell Biol* 194(2): 165-175.
- Cloonan, N. (2006). Sin1 and Sin1 isoforms: An investigation into the biological significance of a novel human protein family. PhD Thesis, Griffith University, Australia.
- Cooper, M. S. & D'Amico, L. A. (1996). A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev Biol* 180(1): 184-198.
- Coppieters, F., Lefever, S., Leroy, B. P. & De Baere, E. (2010). CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum Mutat* 31(10): 1097-1108.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. & Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437: 1018-1021.
- Corbit, K. C., Shyer, A. E., Dowdle, W. E., Gauden, J., Singla, V. & Reiter, J. F. (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* 10: 70-76.
- Craige, B., Tsao, C. C., Diener, D. R., Hou, Y., Lechtreck, K. F., Rosenbaum, J. L. & Witman, G. B. (2010). CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content. *J Cell Biol* 190(5): 927-940.
- Chailley, B. & Boisvieux-Ulrich, E. (1985). Detection of plasma membrane cholesterol by filipin during microvilligenesis and ciliogenesis in quail oviduct. *J Histochem Cytochem* 33(1): 1-10.
- Chen, J., Knowles, H. J., Hebert, J. L. & Hackett, B. P. (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* 102(6): 1077-1082.
- Cheng, J., Zhang, D., Kim, K., Zhao, Y., Zhao, Y. & Su, B. (2005). Mip1, an MEKK2-interacting protein, controls MEKK2 dimerization and activation. *Mol Cell Biol* 25: 5955-5964.
- Chiang, A. P., Beck, J. S., Yen, H. J., Tayeh, M. K., Scheetz, T. E., Swiderski, R. E., Nishimura, D. Y., Braun, T. A., Kim, K. Y., Huang, J., Elbedour, K., Carmi, R., Slusarski, D. C., Casavant, T. L., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2006). Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6287-6292.
- Chiang, A. P., Nishimura, D., Searby, C., Elbedour, K., Carmi, R., Ferguson, A. L., Secrist, J., Braun, T., Casavant, T., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2004). Comparative Genomic

Analysis Identifies an ADP-Ribosylation Factor-like Gene as the Cause of Bardet-Biedl Syndrome (BBS3). *Am J Hum Genet* 75: Epub.

- Chiu, M. I., Katz, H. & Berlin, V. (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12574-12578.
- Chizhikov, V. V., Davenport, J., Zhang, Q., Shih, E. K., Cabello, O. A., Fuchs, J. L., Yoder, B. K. & Millen, K. J. (2007). Cilia proteins control cerebellar morphogenesis by promoting expansion of the granule progenitor pool. *J Neurosci* 27(36): 9780-9789.
- Christensen, S. T., Pedersen, S. F., Satir, P., Veland, I. R. & Schneider, L. (2008). The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol* 85: 261-301.
- Dalen, H., Schlapfer, W. T. & Mamoon, A. (1971). Cilia on cultured ependymal cells examined by scanning electron microscopy. *Exp Cell Res* 67(2): 375-379.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- Danilov, A. I., Gomes-Leal, W., Ahlenius, H., Kokaia, Z., Carlemalm, E. & Lindvall, O. (2009). Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. *Glia* 57(2): 136-152.
- Davis, E. E., Brueckner, M. & Katsanis, N. (2006). The emerging complexity of the vertebrate cilium: new functional roles for an ancient organelle. *Dev Cell* 11: 9-19.
- Davis, E. E. & Katsanis, N. (2012). The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Curr Opin Genet Dev* 22(3): 290-303.
- Davy, B. E. & Robinson, M. L. (2003). Congenital hydrocephalus in *hy3* mice is caused by a frameshift mutation in *Hydin*, a large novel gene. *Hum Mol Genet* 12(10): 1163-1170.
- Dawe, H. R., Adams, M., Wheway, G., Szymanska, K., Logan, C. V., Noegel, A. A., Gull, K. & Johnson, C. A. (2009). *Nesprin-2* interacts with *meckelin* and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 122(Pt 15): 2716-2726.
- Dawe, H.R., Farr, H. & Gull K. (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* 120(Pt 1):7-15.
- Dawe, H. R., Smith, U. M., Cullinane, A. R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J. L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., Afford, S. C., Copp, A. J., Kelly, D. A., Gull, K. & Johnson, C. A. (2007). The Meckel-Gruber Syndrome proteins *MKS1* and *meckelin* interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet* 16: 173-186.
- Deane, J. A., Cole, D. G., Seeley, E. S., Diener, D. R. & Rosenbaum, J. L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol* 11(20): 1586-1590.

- Delaval, B., Bright, A., Lawson, N. D. & Doxsey, S. (2011). The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis. *Nat Cell Biol* 13(4): 461-468.
- Dentler, W. L. (1981). Microtubule-membrane interactions in cilia and flagella. *Int Rev Cytol* 72: 1-47.
- Deretic, D. (2006). A role for rhodopsin in a signal transduction cascade that regulates membrane trafficking and photoreceptor polarity. *Vision Res* 46(27): 4427-4433.
- DiBella, L. M., Park, A. & Sun, Z. (2009). Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway. *Hum Mol Genet* 18: 595-606.
- Diniz, M. C., Pacheco, A. C., Farias, K. M. & de Oliveira, D. M. (2012). The eukaryotic flagellum makes the day: novel and unforeseen roles uncovered after post-genomics and proteomics data. *Curr Protein Pept Sci* 13(6): 524-546.
- Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N., Margolis, B., Martens, J. R. & Verhey, K. J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat Cell Biol* 12(7): 703-710.
- Draper, B. W., Morcos, P. A. & Kimmel, C. B. (2001). Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30(3): 154-156.
- Drummond, I. (2009). Studying cilia in zebrafish. *Methods Cell Biol* 93: 197-217.
- Drummond, I. A. & Davidson, A. J. (2010). Zebrafish kidney development. *Methods Cell Biol* 100: 233-260.
- Eggenschwiler, J. T. & Anderson, K. V. (2007). Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 345-373.
- Ekker, S. C. & Larson, J. D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* 30(3): 89-93.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B. & Yost, H. J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132(6): 1247-1260.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B. & Yost, H. J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132: 1247-1260.
- Fan, S., Fogg, V., Wang, Q., Chen, X. W., Liu, C. J. & Margolis, B. (2007). A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* 178(3): 387-398.
- Fan, Y., Esmail, M. A., Ansley, S. J., Blacque, O. E., Boroevich, K., Ross, A. J., Moore, S. J., Badano, J. L., May-Simera, H., Compton, D. S., Green, J. S., Lewis, R. A., van Haelst, M. M., Parfrey, P. S., Baillie, D. L., Beales, P. L., Katsanis, N., Davidson, W. S. & Leroux, M. R.

(2004). Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 36: 989-993.

- Fath, M. A., Mullins, R. F., Searby, C., Nishimura, D. Y., Wei, J., Rahmouni, K., Davis, R. E., Tayeh, M. K., Andrews, M., Yang, B., Sigmund, C. D., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2005). *Mkks*-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 14: 1109-1118.
- Finetti, F., Paccani, S. R., Riparbelli, M. G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G. J., Rosenbaum, J. L. & Baldari, C. T. (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol* 11(11): 1332-1339.
- Flicek, P., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Chen, Y., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gordon, L., Hendrix, M., Hourlier, T., Johnson, N., Kähäri, A., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Kokocinski, F., Kulesha, E., Larsson, P., Longden, I., McLaren, W., Overduin, B., Pritchard, B., Riat, H. S., Rios, D., Ritchie, G. R., Ruffier, M., Schuster, M., Sobral, D., Spudich, G., Tang, Y. A., Trevanion, S., Vandrovcova, J., Vilella, A. J., White, S., Wilder, S. P., Zadissa, A., Zamora, J., Aken, B. L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Durbin, R., Fernández-Suarez, X. M., Herrero, J., Hubbard, T. J., Parker, A., Proctor, G., Vogel, J. & Searle, S. M. (2011). Ensembl 2011. *Nucleic Acid Res* 39: D800-806.
- Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11):880-93.
- Follit, J. A., San Agustin, J. T., Xu, F., Jonassen, J. A., Samtani, R., Lo, C. W. & Pazour, G. J. (2008). The Golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the Golgi complex. *PLoS Genet* 4(12): e1000315.
- Follit, J. A., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. & Pazour, G. J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol Biol Cell* 17(9): 3781-3792.
- Foster, D. A. & Toschi, A. (2009). Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 8(7): 1026-1029.
- Francis, S. S., Sfakianos, J., Lo, B. & Mellman, I. (2011). A hierarchy of signals regulates entry of membrane proteins into the ciliary membrane domain in epithelial cells. *J Cell Biol* 193(1): 219-233.
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A. & Sabatini, D. M. (2006). *mSin1* is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16: 1865-1870.
- Gallagher, A. R., Germino, G. G. & Somlo, S. (2010). Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17(2): 118-130.
- Gangloff, Y. G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J. F., Um, S. H., Brown, E. J., Cereghini, S., Thomas, G. & Kozma, S. C. (2004). Disruption of the mouse

mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol* 24(21): 9508-9516.

- Garcia-Martinez, J. M. & Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416(3): 375-385.
- Gascue, C., Katsanis, N. & Badano, J. L. (2010). Cystic diseases of the kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms. *Pediatr Nephrol* 26(8): 1181-1195.
- Gascue, C., Tan, P. L., Cardenas-Rodriguez, M., Libisch, G., Fernandez-Calero, T., Liu, Y. P., Astrada, S., Robello, C., Naya, H., Katsanis, N. & Badano, J. L. (2012). Direct role of Bardet-Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation. *J Cell Sci* 125: 362-375.
- Geng, L., Okuhara, D., Yu, Z., Tian, X., Cai, Y., Shibasaki, S. & Somlo, S. (2006). Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci* 119(Pt 7): 1383-1395.
- Gerdes, J. M. & Katsanis, N. (2008). Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr Top Dev Biol* 85: 175-195.
- Gerdes, J. M., Liu, Y., Zaghloul, N. A., Leitch, C. C., Lawson, S. S., Kato, M., Beachy, P. A., Beales, P. L., Demartino, G. N., Fisher, S., Badano, J. L. & Katsanis, N. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39: 1350-1360.
- Gerdes, J.M., Davis, E.E. & Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 3;137(1):32-45.
- Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P. & Benmerah, A. (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol Cell* 103(3): 131-144.
- Gilula, N. B. & Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol* 53(2): 494-509.
- Giorgio, G., Alfieri, M., Prattichizzo, C., Zullo, A., Cairo, S. & Franco, B. (2007). Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex. *Mol Biol Cell* 18(11): 4397-4404.
- Godel, L. M. & Engman, D. M. (1999). Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *Embo J* 18(8): 2057-2065.
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. & Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22(17): 2308-2341.
- Grishina, I. & Lattes, B. (2005). A novel Cdk2 interactor is phosphorylated by Cdc7 and associates with components of the replication complexes. *Cell Cycle* 4(8): 1120-1126.

- Gros, J., Feistel, K., Viebahn, C., Blum, M. & Tabin, C. J. (2009). Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick. *Science* 324(5929): 941-944.
- Grunwald, D. J. & Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3(9): 717-724.
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J. & Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11: 859-871.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J. M., Strehl, L., Hirota, Y., Desoeuvre, A., Boutin, C., Han, Y. G., Mirzadeh, Z., Cremer, H., Montcouquiol, M., Sawamoto, K. & Spassky, N. (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol* 12(4): 341-350.
- Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S. & Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11(3): 277-284.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V. P., Guggino, W. B. & Germino, G. G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408(6815): 990-994.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J. & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110(2): 177-189.
- Hartman, T. R., Liu, D., Zilfou, J. T., Robb, V., Morrison, T., Watnick, T. & Henske, E. P. (2009). The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. *Hum Mol Genet* 18(1): 151-163.
- Hashimoto, M. & Hamada, H. (2010). Translation of anterior-posterior polarity into left-right polarity in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 20(4): 433-437.
- Haycraft, C. J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. J. & Yoder, B. K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1: e53.
- Haycraft, C. J., Zhang, Q., Song, B., Jackson, W. S., Detloff, P. J., Serra, R. & Yoder, B. K. (2007). Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. *Development* 134(2): 307-316.

- Heitman, J., Movva, N. R. & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253(5022): 905-909.
- Hernandez-Hernandez, V., Pravicumar, P., Diaz-Font, A., May-Simera, H., Jenkins, D., Knight, M. & Beales, P. L. (2013). Bardet-Biedl syndrome proteins control cilia length through regulation of actin polymerisation. *Hum Mol Genet*.
- Hilton, L. K., White, M. C. & Quarmby, L. M. (2009). The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 389(1): 52-56.
- Hou, Y., Qin, H., Follit, J. A., Pazour, G. J., Rosenbaum, J. L. & Witman, G. B. (2007). Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J Cell Biol* 176(5): 653-665.
- Hresko, R. C. & Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280(49): 40406-40416.
- Huang, J. & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412(2): 179-190.
- Huang, J. & Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 1): 217-222.
- Huang, P. & Schier, A. F. (2009). Dampened Hedgehog signaling but normal Wnt signaling in zebrafish without cilia. *Development* 136(18): 3089-3098.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L. & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426: 83-87.
- Hunnicutt, G. R., Kosfisz, M. G. & Snell, W. J. (1990). Cell body and flagellar agglutinins in *Chlamydomonas reinhardtii*: the cell body plasma membrane is a reservoir for agglutinins whose migration to the flagella is regulated by a functional barrier. *J Cell Biol* 111(4): 1605-1616.
- Hurd, T., Zhou, W., Jenkins, P., Liu, C. J., Swaroop, A., Khanna, H., Martens, J., Hildebrandt, F. & Margolis, B. (2011). The retinitis pigmentosa protein RP2 interacts with polycystin 2 and regulates cilia-mediated vertebrate development. *Hum Mol Genet* 19(22): 4330-4344.
- Ibanez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., Olbrich, H., Kispert, A., Ketelsen, U. P., North, A., Heintz, N. & Omran, H. (2004). Dysfunction of axonemal dynein heavy chain *Mdnah5* inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet* 13: 2133-2141.
- Ibraghimov-Beskrovnyaya, O. & Natoli, T.A. (2011). mTOR signaling in polycystic kidney disease. *Trends Mol Med* 17(11):625-33.

- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C. Y., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O. & Guan, K. L. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126: 955-968.
- Iomini, C., Li, L., Esparza, J. M. & Dutcher, S. K. (2009). Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 183(3): 885-896.
- Irigoien, F. & Badano, J. L. (2011). Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genomics* 12(4): 285-297.
- Ishikawa H. & Marshall WF. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *NatRevMolCellBiol* 12(4):222-34.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. & Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127: 125-137.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A. & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6: 1122-1128.
- Janich, P. & Corbeil, D. (2007). GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett* 581(9): 1783-1787.
- Jenkins, P. M., Hurd, T. W., Zhang, L., McEwen, D. P., Brown, R. L., Margolis, B., Verhey, K. J. & Martens, J. R. (2006). Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Curr Biol* 16(12): 1211-1216.
- Jin, H., White, S. R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S. P., Bazan, J. F. & Nachury, M. V. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* 141: 1208-1219.
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T. & Mizushima, N. (2010). Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem* 285(26): 20109-20116.
- Kamio, T., Asano, A., Hosaka, Y. Z., Khalid, A. M., Yokota, S., Ohta, M., Ohyama, K. & Yamano, Y. (2010). Expression of the centrosomal colon cancer autoantigen gene during spermatogenesis in the maturing rat testis. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(7): 1466-1469.
- Kaneshiro, E. S. (1990). Lipids of ciliary and flagellar membranes. *Ciliary and Flagellar Membranes* R. A. Bloodgood. New York, Plenum Press: 241-265.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Res* 30: 3059-3066.

- Katsanis, N., Ansley, S. J., Badano, J. L., Eichers, E. R., Lewis, R. A., Hoskins, B. E., Scambler, P. J., Davidson, W. S., Beales, P. L. & Lupski, J. R. (2001). Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a mendelian recessive disorder. *Science* 293: 2256-2259.
- Kee, H. L., Dishinger, J. F., Blasius, T. L., Liu, C. J., Margolis, B. & Verhey, K. J. (2012). A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat Cell Biol* 14(4): 431-437.
- Kesavan, K., Lobel-Rice, K., Sun, W., Lapadat, R., Webb, S., Johnson, G. L. & Garrington, T. P. (2004). MEK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol* 199: 140-148.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110(2): 163-175.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11(4): 895-904.
- Kim, J., Krishnaswami, S. R. & Gleeson, J. G. (2008). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum Mol Genet* 17(23): 3796-3805.
- Kim, J., Lee, J. E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P. & Gleeson, J. G. (2010). Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* 464(7291): 1048-1051.
- Kim, J. C., Badano, J. L., Sibold, S., Esmail, M. A., Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., Venner, K., Ansley, S. J., Ross, A. J., Leroux, M. R., Katsanis, N. & Beales, P. L. (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36: 462-470.
- Kim, J. C., Ou, Y. Y., Badano, J. L., Esmail, M. A., Leitch, C. C., Fiedrich, E., Beales, P. L., Archibald, J. M., Katsanis, N., Rattner, J. B. & Leroux, M. R. (2005). 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* 118: 1007-1020.
- Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N. & Wallingford, J. B. (2010). Planar Cell Polarity Acts Through Septins to Control Collective Cell Movement and Ciliogenesis. *Science* 329: 1337-1340.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3): 253-310.
- Kontgen, F., Suss, G., Stewart, C., Steinmetz, M. & Bluethmann, H. (1993). Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* 5(8): 957-964.

- Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W. & Lefkowitz, R. J. (2008). Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science* 320(5884): 1777-1781.
- Koyama, E., Ochiai, T., Rountree, R. B., Kingsley, D. M., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M. & Pacifici, M. (2007). Synovial joint formation during mouse limb skeletogenesis: roles of Indian hedgehog signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 100-112.
- Kozminski, K. G., Beech, P. L. & Rosenbaum, J. L. (1995). The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* 131(6 Pt 1): 1517-1527.
- Kozminski, K. G., Johnson, K. A., Forscher, P. & Rosenbaum, J. L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5519-5523.
- Kramer-Zucker, A. G., Olale, F., Haycraft, C. J., Yoder, B. K., Schier, A. F. & Drummond, I. A. (2005). Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132: 1907-1921.
- Kreiling, J. A., Williams, G. & Creton, R. (2007). Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment. *Dev Dyn* 236(7): 1963-1969.
- Kress, C., Vandormael-Pournin, S., Baldacci, P., Cohen-Tannoudji, M. & Babinet, C. (1998). Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. *Mamm Genome* 9(12): 998-1001.
- Kunz, Y. (2004). *Developmental Biology of teleost fishes*, Springer: 259.
- Kyttala, M., Tallila, J., Salonen, R., Kopra, O., Kohlschmidt, N., Paavola-Sakki, P., Peltonen, L. & Kestila, M. (2006). MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat Genet* 38(2): 155-157.
- Labelle-Cote, M. & Larose, L. (2011). [A uNick protein]. *Med Sci (Paris)* 27(8-9): 746-752.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lambeth, L. S. & Smith, C. A. (2013). Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol* 942: 205-232.
- Laplante, M. & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122: 3589-3594.
- Laplante, M. & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274-293.

- Lee, S., Shen, Z., Robinson, D. N., Briggs, S. & Firtel, R. A. (2010). Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol Biol Cell* 21(11): 1810-1824.
- Leitch, C. C., Zaghloul, N. A., Davis, E. E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Al-Fadhel, M., Lewis, R. A., Eyaid, W., Banin, E., Dollfus, H., Beales, P. L., Badano, J. L. & Katsanis, N. (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40: 443-448.
- Li, J. B., Gerdes, J. M., Haycraft, C. J., Fan, Y., Teslovich, T. M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O. E., Li, L., Leitch, C. C., Lewis, R. A., Green, J. S., Parfrey, P. S., Leroux, M. R., Davidson, W. S., Beales, P. L., Guay-Woodford, L. M., Yoder, B. K., Stormo, G. D., Katsanis, N. & Dutcher, S. K. (2004). Comparative genomic identification of conserved flagellar and basal body proteins that includes a novel gene for Bardet-Biedl syndrome. *Cell* 117: 541-552.
- Liu, L., Das, S., Losert, W. & Parent, C. A. (2010). mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell* 19: 845-857.
- Logan, C. Y. & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Loktev, A. V., Zhang, Q., Beck, J. S., Searby, C. C., Scheetz, T. E., Bazan, J. F., Slusarski, D. C., Sheffield, V. C., Jackson, P. K. & Nachury, M. V. (2008). A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell* 15: 854-865.
- Lovejoy, C. A., Xu, X., Bansbach, C. E., Glick, G. G., Zhao, R., Ye, F., Sirbu, B. M., Titus, L. C., Shyr, Y. & Cortez, D. (2009). Functional genomic screens identify CINP as a genome maintenance protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(46): 19304-19309.
- Loytynoja, A. & Goldman, N. (2005). An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10557-10562.
- Makky, K., Tekiela, J. & Mayer, A. N. (2007). Target of rapamycin (TOR) signaling controls epithelial morphogenesis in the vertebrate intestine. *Dev Biol* 303(2): 501-513.
- Malicki, J., Avanesov, A., Li, J., Yuan, S. & Sun, Z. (2011). Analysis of cilia structure and function in zebrafish. *Methods Cell Biol* 101: 39-74.
- Marion, V., Stutzmann, F., Gérard, M., De Melo, C., Schaefer, E., Clausmann, A., Hellé, S., Delague, V., Souied, E., Barrey, C., Verloes, A., Stoetzel, C. & Dollfus, H. (2012). Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothed trafficking regulator, in a family with Bardet-Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet* 49: 317-321.
- Marshall, W. F. (2008). Basal bodies platforms for building cilia. *Curr Top Dev Biol* 85: 1-22.
- Matsuura, K., Lefebvre, P. A., Kamiya, R. & Hirono, M. (2002). Kinesin-II is not essential for mitosis and cell growth in *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton* 52(4): 195-201.

- Matuoka, K., Miki, H., Takahashi, K. & Takenawa, T. (1997). A novel ligand for an SH3 domain of the adaptor protein Nck bears an SH2 domain and nuclear signaling motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 239(2): 488-492.
- May-Simera HL, K. M., Hernandez V, Osborn DP, Tada M, Beales PL. (2010). Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol* 345: 215-225.
- Mazelova, J., Astuto-Gribble, L., Inoue, H., Tam, B. M., Schonteich, E., Prekeris, R., Moritz, O. L., Randazzo, P. A. & Deretic, D. (2009). Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. *Embo J* 28(3): 183-192.
- McDermott, K. M., Liu, B. Y., Tlsty, T. D. & Pazour, G. J. (2010). Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development. *Curr Biol* 20(8): 731-737.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X. & Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114(1): 61-73.
- McNeill, H. & Woodgett, J. R. (2010). When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(6): 404-413.
- Milenkovic, L., Scott, M. P. & Rohatgi, R. (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* 187(3): 365-374.
- Mirzadeh, Z., Han, Y. G., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (2010). Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci* 30: 2600-2610.
- Mitchell, B., Stubbs, J. L., Huisman, F., Taborak, P., Yu, C. & Kintner, C. (2009). The PCP pathway instructs the planar orientation of ciliated cells in the *Xenopus* larval skin. *Curr Biol* 19(11): 924-929.
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., Saunier, S., Spassky, N., Bastin, P. & Benmerah, A. (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci* 123(Pt 10): 1785-1795.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K. & Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 24(15): 6710-6718.
- Musgrave, A., DeWildt, P., van Etten, I., Pijst, H., Schholma, C., Kooyman, R., Homan, W., and van den Ende, H. (1986). Evidence of a functional membrane barrier in the transition zone between the flagellum and the cell body of *Chlamydomonas eugametos* gametes. *Planta* 167: 544-553.
- Mykytyn, K., Mullins, R. F., Andrews, M., Chiang, A. P., Swiderski, R. E. ç., Yang, B., Braun, T., Casavant, T., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4

(BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8664-8669.

- Nachury, M. V., Loktev, A. V., Zhang, Q., Westlake, C. J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D. C., Scheller, R. H., Bazan, J. F., Sheffield, V. C. & Jackson, P. K. (2007). A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell* 129: 1201-1213.
- Nachury, M. V., Seeley, E. S. & Jin, H. (2010). Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 59-87.
- Nakata, K., Shiba, D., Kobayashi, D. & Yokoyama, T. (2012). Targeting of Nphp3 to the primary cilia is controlled by an N-terminal myristoylation site and coiled-coil domains. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69(4): 221-234.
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., Ingber, D. E. & Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33(2): 129-137.
- Neuhaus, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkruis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., Abdelilah, S., Stainier, D. Y. & Driever, W. (1996). Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development* 123: 357-367.
- Nido, G. S., Méndez, R., Pascual-García, A., Abia, D. & Bastolla, U. (2012). Protein disorder in the centrosome correlates with complexity in cell types number. *Mol Biosyst* 8: 353-367.
- Nishimura, D. Y., Fath, M., Mullins, R. F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J. L., Mykytyn, K., Swiderski, R. E., Yang, B., Carmi, R., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2004). Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16588-16593.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. & Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418(6893): 96-99.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. & Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95: 829-837.
- Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217.
- Nurnberger, J., Bacallao, R. L. & Phillips, C. L. (2002). Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 13(9): 3096-3106.
- Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287(5785): 795-801.

- Ocbina, P. J., Tuson, M. & Anderson, K. V. (2009). Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* 4(8): e6839.
- Oh, W. J. & Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* 10: 2305-2316.
- Olbrich, H., Haffner, K., Kispert, A., Volkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zariwala, M., Noone, P. G., Knowles, M., Mitchison, H. M., Meeks, M., Chung, E. M., Hildebrandt, F., Sudbrak, R. & Omran, H. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* 30(2): 143-144.
- Omori, Y., Zhao, C., Saras, A., Mukhopadhyay, S., Kim, W., Furukawa, T., Sengupta, P., Veraksa, A. & Malicki, J. (2008). Elipsa is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nat Cell Biol* 10(4): 437-444.
- Otto, E. A., Hurd, T. W., Airik, R., Chaki, M., Zhou, W., Stoetzel, C., Patil, S. B., Levy, S., Ghosh, A. K., Murga-Zamalloa, C. A., van Reeuwijk, J., Letteboer, S. J. F., Sang, L., Giles, R. H., Liu, Q., Coene, K. L. M., Estrada-Cuzcano, A., Collin, R. W. J., McLaughlin, H. M., Held, S., Kasanuki, J. M., Ramaswami, G., Conte, J., Lopez, I., Washburn, J., MacDonald, J., Hu, J., Yamashita, Y., Maher, E. R., Guay-Woodford, L., Neumann, H. P. H., Obermüller, N., Koenekoop, R. K., Bergmann, C., Bei, X., Lewis, R. A., Katsanis, N., Lopes, V., Williams, D. S., Lyons, R. H., Dang, C. V., Brito, D. A., Bettencourt Dias, M., Zhang, X., Cavalcoli, J. D., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Pierce, E. A., Jackson, P., Antignac, C., Saunier, S., Roepman, R., Dollfus, H., Khanna, H. & Hildebrandt, F. (2010). Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat Genet* 42: 840-850.
- Otto, E. A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J. F., Hiller, K. S., Mueller, A. M., Ruf, R. G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., Foreman, J. W., Goodship, J. A., Strachan, T., Kispert, A., Wolf, M. T., Gagnadoux, M. F., Nivet, H., Antignac, C., Walz, G., Drummond, I. A., Benzing, T. & Hildebrandt, F. (2003). Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 34: 413-420.
- Ou, G., Blacque, O. E., Snow, J. J., Leroux, M. R. & Scholey, J. M. (2005). Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* 436(7050): 583-587.
- Pagan-Westphal, S. M. & Tabin, C. J. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 93(1): 25-35.
- Pallen, C. J. (2003). Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha): a Src family kinase activator and mediator of multiple biological effects. *Curr Top Med Chem* 3(7): 821-835.
- Park, T. J., Gray, R. S., Sato, A., Habas, R. & Wallingford, J. B. (2005). Subcellular localization and signaling properties of dishevelled in developing vertebrate embryos. *Curr Biol* 15(11): 1039-1044.

- Park, T. J., Mitchell, B. J., Abitua, P. B., Kintner, C. & Wallingford, J. B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet* 40(7): 871-879.
- Patil, H., Tserentsoodol, N., Saha, A., Hao, Y., Webb, M. & Ferreira, P. A. (2012). Selective loss of RPGRIP1-dependent ciliary targeting of NPHP4, RPGR and SDCCAG8 underlies the degeneration of photoreceptor neurons. *Cell Death Dis* 3: e355.
- Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J. & Witman, G. B. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* 170(1): 103-113.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., Vucica, Y., Seeley, E. S., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B. & Cole, D. G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151: 709-718.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L. & Witman, G. B. (1999). The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 144(3): 473-481.
- Pazour, G. J., San Agustin, J. T., Follit, J. A., Rosenbaum, J. L. & Witman, G. B. (2002). Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* 12(11): R378-380.
- Pazour, G. J., Wilkerson, C. G. & Witman, G. B. (1998). A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *J Cell Biol* 141(4): 979-992.
- Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F., Gourlay, R., Magnuson, M. A. & Alessi, D. R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* 405(3): 513-522.
- Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S. & Alessi, D. R. (2011). Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem J* 436(1): 169-179.
- Pedersen, L.B. & Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr Top Dev Biol* 85:23-61.
- Pennarun, G., Escudier, E., Chapelin, C., Bridoux, A. M., Cacheux, V., Roger, G., Clement, A., Goossens, M., Amselem, S. & Duriez, B. (1999). Loss-of-function mutations in a human gene related to Chlamydomonas reinhardtii dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 65(6): 1508-1519.
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S. & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137(5): 873-886.
- Petit, A., Ragu, C., Soler, G., Ottolenghi, C., Schluth, C., Radford-Weiss, I., Schneider-Maunoury, S., Callebaut, I., Dastugue, N., Drabkin, H. A., Bernard, O. A., Romana, S. &

Penard-Lacronique, V. (2012). Functional analysis of the NUP98-CCDC28A fusion protein. *Haematologica* 97: 379-387.

- Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H. & Sassaroli, M. (1998). Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol* 143(6): 1591-1601.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. & Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78(1): 59-66.
- Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. (1985). Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil* 5(3): 175-193.
- Porter, M. E., Bower, R., Knott, J. A., Byrd, P. & Dentler, W. (1999). Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 10(3): 693-712.
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P. & Golemis, E. A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129(7): 1351-1363.
- Qian, F., Germino, F. J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S. & Germino, G. G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16: 179-183.
- Qin, H., Diener, D. R., Geimer, S., Cole, D. G. & Rosenbaum, J. L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* 164(2): 255-266.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H. & Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem* 201(2): 331-335.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 23-36.
- Redin, C., Le Gras, S., Mhamdi, O., Geoffroy, V., Stoetzel, C., Vincent, M. C., Chiurazzi, P., Lacombe, D., Ouertani, I., Petit, F., Till, M., Verloes, A., Jost, B., Chaabouni, H. B., Dollfus, H., Mandel, J. L. & Muller, J. (2012). Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom Syndromes. *J Med Genet* 49: 502-512.
- Reese, T. S. (1965). Olfactory Cilia in the Frog. *J Cell Biol* 25(2): 209-230.
- Reiter, J. F., Blacque, O. E. & Leroux, M. R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 13(7): 608-618.

- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Söding, J. (2011). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* 9: 173-175.
- Robert, A., Margall-Ducos, G., Guidotti, J. E., Bregerie, O., Celati, C., Brechot, C. & Desdouets, C. (2007). The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J Cell Sci* 120(Pt 4): 628-637.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L. & Scott, M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317(5836): 372-376.
- Rosenbaum, J.L. & Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(11):813-25.
- Rosner, M. & Hengstschläger, M. (2008). Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalisation of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet* doi:10.1093/hmg/ddn192.
- Ross, A. J., May-Simera, H., Eichers, E. R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D. J., Leitch, C. C., Chapple, J. P., Munro, P. M., Fisher, S., Tan, P. L., Phillips, H. M., Leroux, M. R., Henderson, D. J., Murdoch, J. N., Copp, A. J., Eliot, M. M., Lupski, J. R., Kemp, D. T., Dollfus, H., Tada, M., Katsanis, N., Forge, A. & Beales, P. L. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37: 1135-1140.
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78(1): 35-43.
- Saci, A., Cantley, L. C. & Carpenter, C. L. (2011). Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell* 42(1): 50-61.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, CSHL Press.
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A. & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25(6): 903-915.
- Sapiro, R., Kostetskii, I., Olds-Clarke, P., Gerton, G. L., Radice, G. L. & Strauss, I. J. (2002). Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol* 22(17): 6298-6305.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14: 1296-1302.

- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L. & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22: 159-168.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
- Satir, P. & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377-400.
- Satir, P., Mitchell, D. R. & Jekely, G. (2008). How did the cilium evolve? *Curr Top Dev Biol* 85: 63-82.
- Schafer, J. C., Haycraft, C. J., Thomas, J. H., Yoder, B. K. & Swoboda, P. (2003). XBX-1 encodes a dynein light intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport and cilia assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14(5): 2057-2070.
- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Nielsen, S. K., Guerra, C. F., Veland, I. R., Stock, C., Hoffmann, E. K., Yoder, B. K., Schwab, A., Satir, P. & Christensen, S. T. (2010). Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 25(2-3): 279-292.
- Schneider, L., Clement, C. A., Teilmann, S. C., Pazour, G. J., Hoffmann, E. K., Satir, P. & Christensen, S. T. (2005). PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol* 15: 1861-1866.
- Schroder, W., Bushell, G. & Sculley, T. (2005). The human stress-activated protein kinase-interacting 1 gene encodes JNK-binding proteins. *Cell Signal* 17: 761-767.
- Schroder, W., Cloonan, N., Bushell, G. & Sculley, T. (2004). Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene* 339: 17-23.
- Schroder, W. A., Buck, M., Cloonan, N., Hancock, J. F., Suhrbier, A., Sculley, T. & Bushell, G. (2007). Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell Signal* 19: 1279-1289.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K. & Blum, M. (2007). Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* 17(1): 60-66.
- Seo, S., Baye, L. M., Schulz, N. P., Beck, J. S., Zhang, Q., Slusarski, D. C. & Sheffield, V. C. (2010). BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1488-1493.
- Seo, S., Zhang, Q., Bugge, K., Breslow, D. K., Searby, C. C., Nachury, M. V. & Sheffield, V. C. (2011). A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothed. *PLoS Genet* 7(11): e1002358.

- Sfakianos, J., Togawa, A., Maday, S., Hull, M., Pypaert, M., Cantley, L., Toomre, D. & Mellman, I. (2007). Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 179(6): 1133-1140.
- Shah, A. S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T. O., Kline, J. N. & Welsh, M. J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325(5944): 1131-1134.
- Shillingford, J. M., Murcia, N. S., Larson, C. H., Low, S. H., Hedgepeth, R., Brown, N., Flask, C. A., Novick, A. C., Goldfarb, D. A., Kramer-Zucker, A., Walz, G., Piontek, K. B., Germino, G. G. & Weimbs, T. (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5466-5471.
- Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D. & Magnuson, M. A. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell* 11(4): 583-589.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T. & Walz, G. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37: 537-543.
- Slavotinek, A. & Beales, P. (2011). Clinical utility gene card for: Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 19(3).
- Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21: 951-960.
- Song, H., Hu, J., Chen, W., Elliott, G., Andre, P., Gao, B. & Yang, Y. (2010). Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature* 466(7304): 378-382.
- Sorokin, S. P. (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* 3(2): 207-230.
- Sparagana, S. P. & Roach, E. S. (2000). Tuberous sclerosis complex. *Curr Opin Neurol* 13(2): 115-119.
- Spassky, N., Han, Y. G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M. R., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol* 317(1): 246-259.
- Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E. E., Muller, J., Rix, S., Badano, J. L., Leitch, C. C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., Jalk, N., Vicaire, S., Sarda, P., Hamel, C., Lacombe, D., Holder, M., Odent, S., Holder, S., Brooks, A. S., Elcioglu, N. H., Silva, E. D., Rossillion, B., Sigaudy, S., de Ravel, T. J., Lewis, R. A., Leheup, B., Verloes, A., Amati-Bonneau, P., Mégarbané, A., Poch, O., Bonneau, D., Beales, P. L., Mandel, J. L., Katsanis, N. & Dollfus, H. (2006). BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38: 521-524.

- Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E. E., Zaghoul, N. A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C. C., Sarda, P., Hamel, C., de Ravel, T. J., Lewis, R. A., Friederich, E., Thibault, C., Danse, J. M., Verloes, A., Bonneau, D., Katsanis, N., Poch, O., Mandel, J. L. & Dollfus, H. (2007). Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80: 1-11.
- Stowe, T. R., Wilkinson, C. J., Iqbal, A. & Stearns, T. (2012). The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *Mol Biol Cell* 23(17): 3322-3335.
- Summerton, J. (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 141-158.
- Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, G. J., Cole, D. G., Miller, M. S. & Hopkins, N. (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* 131: 4085-4093.
- Tadros, W. & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136(18): 3033-3042.
- Tam, B. M., Moritz, O. L., Hurd, L. B. & Papermaster, D. S. (2000). Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 151(7): 1369-1380.
- Tanaka, Y., Okada, Y. & Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435(7039): 172-177.
- Tao, B., Bu, S., Yang, Z., Siroky, B., Kappes, J. C., Kispert, A. & Guay-Woodford, L. M. (2009). Cystin localizes to primary cilia via membrane microdomains and a targeting motif. *J Am Soc Nephrol* 20(12): 2570-2580.
- Taschner, M., Bhogaraju, S. & Lorentzen, E. (2012). Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* 83(2): S12-22.
- Tissir, F. & Goffinet, A. M. (2010). Planar cell polarity signaling in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 20(5): 572-577.
- Tobin, J. L. & Beales, P. L. (2008). Restoration of renal function in zebrafish models of ciliopathies. *Pediatr Nephrol* 23: 2095-2099.
- Tobin, J. L. & Beales, P. L. (2009). The nonmotile ciliopathies. *Genet Med* 11(6): 386-402.
- Tobin, J. L., Di Franco, M., Eichers, E., May-Simera, H., Garcia, M., Yan, J., Quinlan, R., Justice, M. J., Hennekam, R. C., Briscoe, J., Tada, M., Mayor, R., Burns, A. J., Lupski, J. R., Hammond, P. & Beales, P. L. (2008). Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6714-6719.

- Toyoshima, H. & Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78(1): 67-74.
- Tran, P. V., Haycraft, C. J., Besschetnova, T. Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R. W., Herron, B. J., Chesebro, A. L., Qiu, H., Scherz, P. J., Shah, J. V., Yoder, B. K. & Beier, D. R. (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet* 40(4): 403-410.
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V. P. & Walz, G. (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6965-6970.
- Varjosalo, M. & Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 22(18): 2454-2472.
- Veleri, S., Bishop, K., Dalle Nogare, D. E., English, M. A., Foskett, T. J., Chitnis, A., Sood, R., Liu, P. & Swaroop, A. (2012). Knockdown of Bardet-Biedl syndrome gene BBS9/PTHB1 leads to cilia defects. *PLoS One* 7: e34389.
- Vezina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28(10): 721-726.
- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B. & Ruther, U. (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* 134(14): 2569-2577.
- Voronina, V. A., Takemaru, K., Treuting, P., Love, D., Grubb, B. R., Hajjar, A. M., Adams, A., Li, F. Q. & Moon, R. T. (2009). Inactivation of Chibby affects function of motile airway cilia. *J Cell Biol* 185(2): 225-233.
- Walczak-Sztulpa, J., Eggenschwiler, J., Osborn, D., Brown, D. A., Emma, F., Klingenberg, C., Hennekam, R. C., Torre, G., Garshasbi, M., Tzschach, A., Szczepanska, M., Krawczynski, M., Zachwieja, J., Zwolinska, D., Beales, P. L., Ropers, H. H., Latos-Bielenska, A. & Kuss, A. W. (2010). Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner syndrome, is a ciliopathy caused by mutations in the IFT122 gene. *Am J Hum Genet* 86: 949-956.
- Walther, Z., Vashishtha, M. & Hall, J. L. (1994). The *Chlamydomonas* FLA10 gene encodes a novel kinesin-homologous protein. *J Cell Biol* 126(1): 175-188.
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. & Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331-367.
- Wallingford, J. B. (2006). Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2: R227-234.
- Wallingford, J. B. (2010). Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol* 22(5): 597-604.

- Wang, S. Z. & Roberts, R. M. (2004). Interaction of stress-activated protein kinase-interacting protein-1 with the interferon receptor subunit IFNAR2 in uterine endometrium. *Endocrinology* 145(12): 5820-5831.
- Wang, Y., Wang, Y., Xu, Y., Tong, W., Pan, T., Li, J., Sun, S., Shao, J., Ding, H., Toyoda, T. & Yuan, Z. (2011). Hepatitis C virus NS5B protein delays S phase progression in human hepatocyte-derived cells by relocalizing cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP). *J Biol Chem* 286(30): 26603-26615.
- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T. & Hamada, H. (2003). The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* 130: 1725-1734.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M. & Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1179-1181
- Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ling, K. & Hu, J. (2012). The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nat Cell Biol* 14(9): 950-957.
- Wilkinson, M. G., Pino, T. S., Tournier, S., Buck, V., Martin, H., Christiansen, J., Wilkinson, D. G. & Millar, J. B. (1999). Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J* 18: 4210-4221.
- Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T. & Guan, K. L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20: 2820-2832.
- Yen, H. J., Tayeh, M. K., Mullins, R. F., Stone, E. M., Sheffield, V. C. & Slusarski, D. C. (2006). Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet* 15: 667-677.
- Yoder, B. K., Hou, X. & Guay-Woodford, L. M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13: 2508-2516.
- Yoder, B. K., Richards, W. G., Sweeney, W. E., Wilkinson, J. E., Avener, E. D. & Woychik, R. P. (1995). Insertional mutagenesis and molecular analysis of a new gene associated with polycystic kidney disease. *Proc Assoc Am Physicians* 107(3): 314-323.
- Yokote, K., Mori, S., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Heldin, C. H. & Claesson-Welsh, L. (1996). Structural determinants in the platelet-derived growth factor alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis. *J Biol Chem* 271(9): 5101-5111.
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J. A., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, B. E., Pennekamp, P. & Hamada, H. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* 338(6104): 226-231.

- Yuan, S., Li, J., Diener, D. R., Choma, M. A., Rosenbaum, J. L. & Sun, Z. (2012). Target-of-rapamycin complex 1 (Torc1) signaling modulates cilia size and function through protein synthesis regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2021-2026.
- Zaghloul, N. A. & Katsanis, N. (2011). Zebrafish assays of ciliopathies. *Methods Cell Biol* 105: 257-272.
- Zaghloul, N. A., Liu, Y., Gerdes, J. M., Gascue, C., Oh, E. C., Leitch, C. C., Bromberg, Y., Binkley, J., Leibel, R. L., Sidow, A., Badano, J. L. & Katsanis, N. (2010). Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10602-10607.
- Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E. M. & Sheffield, V. C. (2012). Intrinsic protein-protein interaction-mediated and chaperonin-assisted sequential assembly of stable bardet-biedl syndrome protein complex, the BBSome. *J Biol Chem* 287(24): 20625-20635.
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813(11): 1978-1986.
- Zhao, C. & Malicki, J. (2011). Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos. *Embo J* 30(13): 2532-2544.
- Zimmermann, K. W. (1898). Beitrage zur Kenntniss einiger Drusen und Epithelien. *Archiv fur Mikroskopische Anatomie* 52: 552-706.
- Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 21-35.

Agradecimientos

Muchas fueron las personas que me ayudaron en el desarrollo de esta tesis. Les debo un enorme agradecimiento y me siento muy afortunada de haber podido aprender y compartir mucho con cada uno de ellos.

- A mi orientador José Badano porque confió en mí y me dio un lugar en el que pude aprender, crecer y desarrollarme científicamente. Es muy difícil dejar por escrito el profundo agradecimiento que le tengo por su enorme generosidad y paciencia. Su constante optimismo me permitió superar las malas épocas y disfrutar de las buenas. Fue un placer haber compartido con él la aventura de empezar un laboratorio nuevo, fue una experiencia de la que aprendimos muchísimo los dos.
- Al tribunal de esta tesis: Silvia, Flavio y Kate por su gran disposición para corregir la tesis y por la ayuda que me brindaron a lo largo de todos estos años.
- A Flor Irigoín porque fue parte esencial de esta tesis. Su enorme inteligencia y calidad humana fueron fundamentales para poder superar los malos momentos. Fue un placer haber podido trabajar codo a codo con ella.
- A Ceci Gascue porque fue una excelente compañera de doctorado, siempre alegre y muy generosa.
- Al resto de mis compañeras de laboratorio: Rossina, Belén, Paola y Victoria. Fueron muchos los años compartidos y por suerte siempre hubo un ambiente muy lindo y divertido de trabajo.
- A mis amigas y compañeras de la UATE: Martina, Gera, Paula y Marcela. Gracias por haber vivido juntas la increíble experiencia de mis primeros años en el IPMon.
- A todas las unidades del IPMon que participaron de este trabajo y que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.
- Al IPMon no científico: Compras, UGC, Beatriz, Mario, Marcelo y Luis. Gracias por haber hecho mucho más fácil el trabajo.
- A Dan Osborn y Philip Beales y a todo el laboratorio de Molecular Medicine Unit del Institute of Child Health. Gracias por haber sido tan generosos al enseñarme a trabajar con el pez cebra, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitirme disfrutar tanto los meses en Londres.
- A mi familia, mis amigos y a Bruno porque sin su apoyo no hubiese podido.

Publicaciones científicas:

- Cardenas-Rodriguez, M. & Badano, J. L. (2009). Ciliary Biology: Understanding the Cellular and Genetic Basis of Human Ciliopathies. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 151C: 263-280.
- Cardenas-Rodriguez, M., Osborn, D.P., Irigoín, F., Graña, M., Romero, H., Beales, P.L. and Badano, J.L. (2013). Characterization of *CCDC28B* reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome. *Hum Genet.* Jan;132(1):91-105.
- Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., Osborn, D.P., Gascue, C., Katsanis, N., Beales, P.L. and Badano, J.L. (2013). 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.* Oct 15;22(20):4031-42.