



Tesis de Maestría en Biología Celular y Molecular
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

***“Análisis de los mecanismos que regulan la
expresión, localización y función de CCDC28B, un
modificador del síndrome de Bardet Biedl”***

Lic. Rossina Novas
Orientador: Dr. José L. Badano

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal:
Dra. Patricia Cassina
Dra. Rossana Sapiro
Dr. Flavio Zolessi

Diciembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer de manera especial al Dr. José Badano por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección. Por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años. Su aporte es invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

A mis compañeros del laboratorio: Cecilia, Magdalena, Florencia, Belén, Victoria, Paola y Matías. Por generar un clima cálido de trabajo y por ser tan generosos a la hora de ayudarme y compartir sus conocimientos. Todos ellos han dejado su marca en mi formación tanto profesional como personal.

Al resto de mis compañeros del Instituto y amigos que de diferentes formas me ayudaron a cumplir este objetivo.

A mis padres, por creer en mí, por su apoyo incondicional y por acompañarme durante el transcurso de esta tesis con una comprensión y paciencia a prueba de todo. A ellos por siempre mi corazón y agradecimiento.

Finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar económicamente este trabajo otorgándome una beca de Maestría.

A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

El síndrome de Bardet Biedl (BBS) es una enfermedad genéticamente heterogénea con significativa variabilidad inter e intra familiar. Si bien en la mayoría de los casos BBS se hereda de forma autosómica recesiva, en algunas familias se ha documentado que mutaciones en más de un gen colaboran para modular la presentación del síndrome. Al día de hoy se han identificado 17 genes BBS (*BBS1-12, MKS1, CEP290, FRITZ/C2ORF86, LZFTL1*) y un modificador secundario de la enfermedad, *CCDC28B* (del inglés coiled-coil domain containing protein 28B). *CCDC28B* ha sido identificado como un modificador dado que mutaciones en este gen no son suficientes para producir la enfermedad, pero en algunas familias sí contribuyen a modificar la severidad con la que se manifiesta cuando se encuentran en un contexto genéticamente sensibilizado por la presencia de mutaciones en otros genes BBS.

Las proteínas de BBS se localizan en los centrosomas y cuerpos basales de las cilias, participando activamente tanto en la formación y mantenimiento, como en la funcionalidad de estos organelos. Por este motivo, BBS ha sido categorizada como una ciliopatía. Las cilias primarias, también denominadas sensoriales o inmóviles, fueron durante años consideradas organelos vestigiales sin una función aparente. Sin embargo, hoy día se sabe que estas cilias cumplen diversos roles biológicos que van desde la mecano- y quimio-sensación hasta la transducción de importantes vías de señalización parácrina como por ejemplo la vía de Wnt, Sonic Hedgehog (Shh) o PDGF(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3)(1-3). Por tanto, si bien este tipo de cilias en general carece de movilidad, cumplen un rol protagónico en la regulación de la homeostasis celular, sensando señales extracelulares que afectan decisiones que tienen que ver con proliferación, polaridad, crecimiento neuronal, diferenciación o mantenimiento, entre otras.

Si bien hasta la fecha se han identificado un gran número de genes BBS, y todas las proteínas codificadas por estos cumplen un rol a nivel de las cilias, el rol biológico de este grupo de proteínas no se conoce completamente. En el caso del modificador secundario *CCDC28B*, hoy día sabemos que en células e *in vivo* en pez cebra, *CCDC28B* juega un rol en ciliogénesis y en la modulación de la vía mTOR. *CCDC28B* interactúa con SIN1, un miembro del complejo mTOR2, y esta interacción es relevante para regular la actividad de SIN1 en el

contexto de mTORC2 así como fuera de él, controlando el largo de las cilias. Sin embargo, y al igual que para el resto de las proteínas BBS, su rol biológico exacto no ha sido completamente dilucidado. El objetivo de este proyecto es por tanto continuar con la caracterización funcional del modificador secundario de BBS, CCDC28B, para profundizar en el mecanismo por el cual esta proteína regula la ciliogénesis y la actividad de la vía mTOR, así como potencialmente identificar otras posibles funciones que pueda tener. Para esto por un lado intentamos obtener datos acerca de la regulación de la expresión y localización de CCDC28B, analizando diferentes condiciones de cultivo así como diferentes estímulos. Por otro lado, continuamos con la confirmación y caracterización de interactores previamente identificados durante mi tesis de grado. Durante esa tesis utilizando un ensayo doble-híbrido encontramos que CCDC28B interactúa con dos proteínas asociadas al esqueleto de microtúbulos que podrían ser importantes para su rol en el contexto de las cilias. Una de ellas es la proteína de unión a los extremos positivos de los microtúbulos EB3, y la otra es la cadena liviana de la kinesina KLC1.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión y localización de CCDC28B es dinámica cambiando en distintas condiciones de cultivo. A su vez, la localización de CCDC28B dependería de su interacción con EB3 y KLC1 así como del esqueleto de microtúbulos. En conjunto, nuestros datos en células e in vivo apoyan la posibilidad de que CCDC28B necesite de su interacción con EB3 y KLC1 para cumplir su rol biológico. En suma, en esta tesis obtuvimos datos originales que no solo son relevantes para entender la función de CCDC28B sino que también nos permiten hipotetizar sobre un posible escenario en el cual CCDC28B requeriría de EB3 y KLC1 para realizar su función tanto como activador de la vía de mTOR así como para cumplir su rol a nivel ciliar.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Las cilias primarias y sus enfermedades asociadas: las ciliopatías	7
1.2 Modo de herencia de las ciliopatías	10
1.3 El síndrome de Bardet-Biedl	11
1.4 Identificación de CCDC28B: un modificador secundario del síndrome de Bardet-Biedl	12
1.5 Rol biológico de CCDC28B: su vinculación con ciliogénesis y mTORC2.	15
1.6. Localización sub-celular	18
1.7 Identificación de nuevos interactores de CCDC28B.....	21
1.8 Objetivos del trabajo.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 Cultivos celulares	24
2.1.1 Líneas celulares utilizadas y condiciones de cultivo	24
2.1.2 Sobre-expresión de genes en células de mamífero con ADN plasmídico.....	25
2.1.3 Disminución de la expresión de genes en células de mamífero	25
2.1.4 Sincronización de cultivos celulares y citometría de flujo	26
2.2 Medios y protocolos para el trabajo con bacterias	28
2.2.1 Medios	28
2.2.2 Transformación de bacterias	28
2.2.3 Extracción de ADN plasmídico	29
2.3 Análisis de proteínas en células de mamífero	29
2.3.1 Extracción de proteínas: lisado de células	29
2.3.2 Cuantificación de proteínas	29
2.3.3. Ensayo de Co-inmunoprecipitación	30
2.3.4. Western Blot	31
2.3.5. Inmunofluorescencia	32
2.4. Microscopía.....	33
2.5 Extracción de ARN de células de mamífero	33
2.6 Preparación de ADN copia (ADNc).....	34
2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
2.7.1 Amplificación por PCR convencional.....	35

2.7.2. PCR en Tiempo Real	35
2.8 Purificación de productos de PCR	37
2.9 Electroforesis en geles de Agarosa	38
2.10 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa	38
2.11 Digestión con enzimas de restricción	38
2.12 Ligación en vectores.....	38
2.13. Clonado en vectores de expresión.....	39
2.14. Modelo <i>in vivo</i> : pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	39
2.14.1 Inhibición de la expresión de genes en embriones de pez cebra	41
2.14.2 Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra	41
2.14.3 Extracción de ARN de embriones de pez cebra	41
2.14.4 Inmunofluorescencia en embriones de pez cebra.....	42
3.RESULTADOS	43
3.1 Análisis de la localización sub-celular de CCDC28B	43
3.1.1 Tratamiento con Colcemida.....	44
3.1.2 Generación de líneas estables.	46
3.2 Análisis de la expresión de CCDC28B.....	49
3.2.1 Análisis de la expresión en cultivos de baja y alta densidad.....	49
3.2.2 Análisis de la expresión en diferentes etapas del ciclo celular	57
3.2.3 Análisis de la expresión en ausencia y presencia de cilia	59
3.3. Confirmación y caracterización de interactores de CCDC28B	61
3.3.1 Confirmación de la interacción de CCDC28B con EB3 y KLC1 en células de mamífero	61
3.3.2 Caracterización de las interacciones en células en cultivo	63
3.3.3. Caracterización de las interacciones <i>in vivo</i> en pez cebra	76
4. DISCUSIÓN	92
4.1 Análisis de la localización de <i>CCDC28B</i>	92
4.2 Análisis de la expresión de <i>CCDC28B</i>	94
4.3 Caracterización de los interactores.....	97
5. REFERENCIAS.....	102

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las ciliias primarias y sus enfermedades asociadas: las ciliopatías

La cilia primaria es un organelo altamente conservado en la evolución de los vertebrados, que a modo de antena se proyecta en copia única de la mayoría de las células humanas cuando no se están dividiendo. Está formada por un esqueleto, el axonema, compuesto por arreglos de 9 dobletes de microtúbulos que se extienden a partir de uno de los centriolos modificados del centrosoma: el centriolo madre que conforma el cuerpo basal. A diferencia de las ciliias móviles ("9+2"), las ciliias primarias carecen del par de microtúbulos central ("9+0"; Fig.1) y son en general inmóviles, si bien existen excepciones encontrándose ciliias "9+0" móviles y "9+2" inmóviles (4, 5).

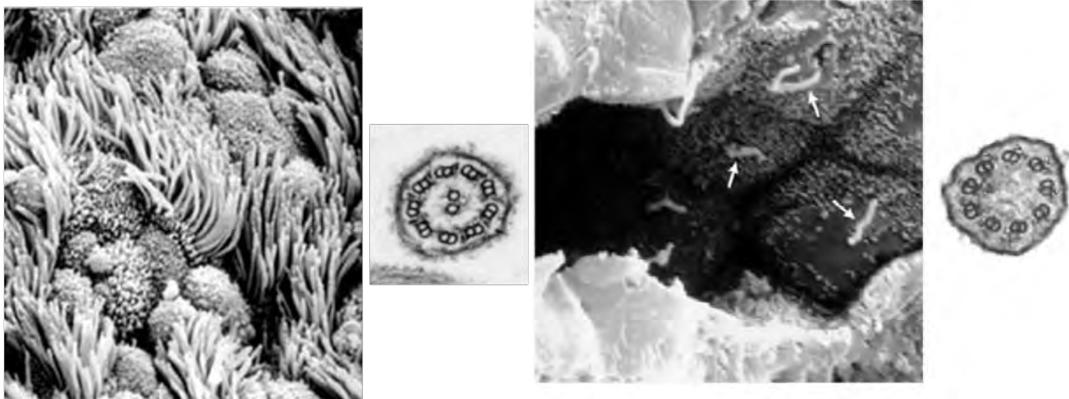


Fig.1. Ciliias primarias y móviles. Imágenes de microscopía electrónica adaptadas de (6). A la izquierda ciliias móviles de tráquea y un corte transversal de su axonema con la organización de microtúbulos característica ("9+2"). A la derecha ciliias primarias del epitelio del tubo renal y un corte transversal de su axonema ("9+0").

El axonema se encuentra recubierto por una bicapa lipídica, continuación de la membrana plasmática, que presenta un contenido proteico y lipídico enriquecido en receptores y canales iónicos específicos. La separación de este organelo con el resto de los compartimentos citosólicos, se encuentra delimitada por la llamada zona de transición que regula la entrada de diferentes precursores y proteínas de transporte a la cilia (7). Todas las proteínas necesarias para la formación, mantenimiento y función de la cilia son sintetizadas

en el cuerpo celular y un mecanismo especializado que se denomina transporte intraflagelar (IFT) es esencial para su transporte desde el lugar de síntesis hacia el sitio de ensamblado del axonema y la punta de la cilia. Se trata de un proceso bidireccional que utiliza motores y adaptadores moleculares para mover complejos moleculares, denominados partículas IFT, hacia dentro y fuera de la cilia (movimientos anterógrados y retrógrados respectivamente) (3, 8, 9) (Fig.2).

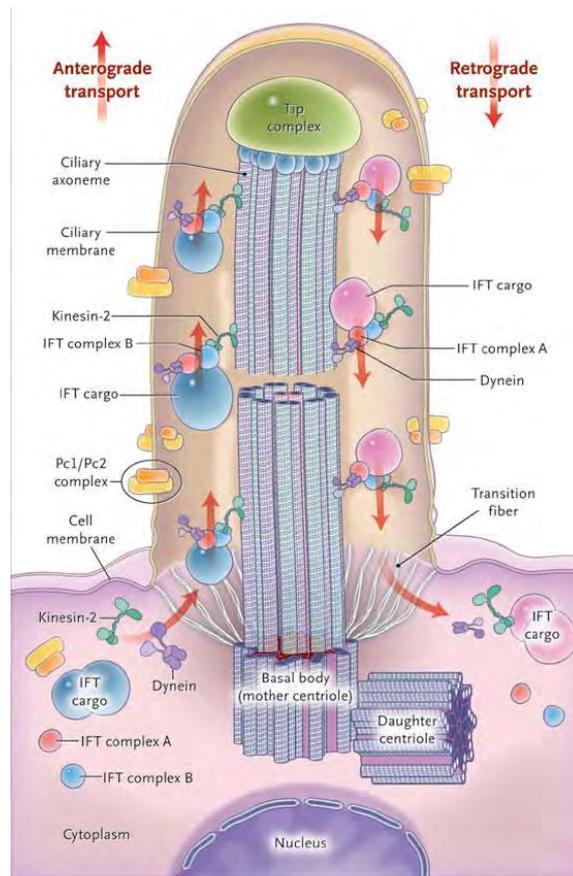


Fig.2. Estructura básica de la cilia y transporte intraflagelar. La cilia es una estructura en forma de pelo, que emana de la superficie de la célula y está formada por un esqueleto de microtúbulos, el axonema, que está cubierto por una membrana especializada y se ensambla a partir de un cuerpo basal conformado por el centríolo madre. Las fibras de transición actúan como filtro para el pasaje de moléculas hacia la cilia. Los componentes del axonema y la membrana, son transportados por macromoléculas (complejos A y B) del complejo de transporte intraflagelar (IFT) hacia la punta de la cilia mediante la Kinesina-2 (transporte anterógrado), y hacia la base por medio de la dineína (transporte retrógrado). Tomado de (8).

Las cilia primarias fueron durante años consideradas organelos vestigiales sin una función aparente. Sin embargo, hoy día se sabe que estos organelos cumplen diversos roles biológicos que van desde la mecano- y quimio-sensación hasta la transducción de importantes vías de señalización parácrina como por ejemplo la vía de Wnt, Sonic Hedgehog

(Shh) o PDGF α (1-3). La cilia sensa una gran variedad de señales extracelulares que afectan decisiones de las células que tienen que ver con proliferación, polaridad, crecimiento neuronal y diferenciación entre otros. En este contexto, las cilias pueden actuar como quimiosensores, fotorreceptores, mecanosensores, osmosensores, termosensores, sensores olfatorios y sensores hormonales (8).

Consistente con su conservación evolutiva, ubicua distribución y participación en diferentes vías de señalización, se ha visto que defectos en estos organelos derivan en una amplia variedad de enfermedades humanas con fenotipos solapados, que colectivamente se denominan ciliopatías. Este grupo de patologías comprende desde fenotipos relativamente específicos o restringidos a un determinado órgano o tejido, como por ejemplo la poliquistosis renal, hasta síndromes altamente pleiotrópicos que afectan múltiples órganos y sistemas como lo son los síndromes de Joubert (JS; OMIM 213300), Alström (ALMS; OMIM 203800), Meckel-Gruber (MKS; OMIM 249000) y Bardet-Biedl (BBS; OMIM 209900)(6) (Tabla 1).

	PKD	NPHP	MKKS	SLSN	EVC	JATD	OFD	ALMS	JS	BBS	MKS
CNS malformations					●	●	●	●	●	●	●
Cystic kidney	●	●		●		●	●	●	●	●	●
Diabetes								●		●	
Gonadal malformations			●		●					●	●
Heart disease			●		●					●	
Hepatic dysfunction	●	●		●		●	●	●	●	●	●
Mental retardation/Developmental delay					●	●	●		●	●	●
Obesity								●		●	
Polydactyly			●		●	●			●	●	●
Pulmonary dysfunction								●			
Retinal degeneration				●		●		●	●	●	
Left-right asymmetry defects		●		●		●			●	●	●
Skeletal defects					●	●	●				

PKD, polycystic kidney disease; NPHP, nephronophthisis; MKKS, McKusick-Kaufman syndrome; SLSN, Senior-Løken syndrome; EVC, Ellis-van Creveld; JATD, Jeune asphyxiating thoracic dystrophy; OFD, orofacioidigital syndrome; ALMS, Alström syndrome; JS, Joubert syndrome/Cerebello-oculo-renal syndrome; BBS, Bardet-Biedl syndrome; MKS, Meckel-Gruber syndrome; CNS, Central nervous system.

Tabla 1. Ciliopatías y los principales fenotipos que las caracterizan. Tomado de (3).

1.2 Modo de herencia de las ciliopatías

Históricamente las enfermedades genéticas humanas fueron clasificadas en monogénicas o Mendelianas y complejas o multifactoriales. En el caso de las enfermedades monogénicas, uno o dos alelos son los responsables del fenotipo y siguen un patrón de herencia mendeliano (dominante, recesivo, autosómico, ligado al X o mitocondriales), mientras que en el caso de los multifactoriales son varios alelos, involucrando un número elevado de genes, y el ambiente, quienes contribuyen al fenotipo. Para el caso de las enfermedades monogénicas esta caracterización genética puede resultar simplista, ya que en muchos casos mutaciones en un único gen no son suficientes para explicar las diferencias en penetrancia y/o expresividad observadas entre, y sobre todo dentro, de una misma familia afectada por una patología determinada. Una tercera categoría, denominada oligogénica, englobaría situaciones donde si bien puede haber un gen principal, alelos mutados en un número de genes con menor contribución así como locus modificadores, interactúan para modular la presentación clínica (severidad y frecuencia de la patología) definiendo un grupo intermedio entre rasgos mendelianos y complejos (10).

En muchos casos la oligogenicidad fue descubierta por azar. Muchas enfermedades humanas que inicialmente fueron consideradas puramente monogénicas han presentado dificultades a la hora de analizar datos mutacionales y genéticos que solo pudieron ser resueltos evaluando esquemas de herencia más complejos.

Desde un punto de vista celular y molecular, los modelos de oligogenicidad se basan en la existencia de sistemas redundantes en los que distintas proteínas pueden en mayor o menor medida suplantar la función de otras y por tanto mutaciones abarcando más de un gen son necesarias para abolir la funcionalidad de la vía o complejo proteico (10).

El concepto de ciliopatía implica que diferentes patologías comparten un defecto celular común: defectos a nivel de la formación, estructura o funcionalidad de las cilias. Por tanto, estas patologías pueden ser causadas por mutaciones en diferentes genes asociados al mismo o distintos aspectos de la biología de estos organelos, resultando por tanto en fenotipos solapados o incluso en la misma enfermedad. Si a esto le sumamos la posibilidad de que distintas proteínas ciliares trabajen en vías complementarias, la misma vía o inclusive el mismo complejo, no debería sorprender que mutaciones en un mismo gen puedan estar

asociadas a más de una ciliopatía. A nivel clínico, estos conceptos a nivel celular son los causantes de que la mayoría de las ciliopatías sean patologías genéticamente heterogéneas y que muchas de ellas presenten a su vez patrones de herencia oligogénica donde mutaciones en más de un locus segregan junto con la enfermedad.

1.3 El síndrome de Bardet-Biedl

El Síndrome de Bardet Biedl (BBS por Bardet-Biedl Syndrome) es una ciliopatía que se caracteriza fenotípicamente por seis rasgos principales que se consideran “sellos” de la enfermedad por ser los que aparecen con más frecuencia asociados a ella. Estos son degeneración de retina, obesidad, hipogonadismo, polidactilia, retardo mental y disfunciones renales. A su vez, los pacientes pueden presentar otras patologías secundarias con respecto a su prevalencia, que incluyen por ejemplo problemas neurológicos, retardo del habla, diabetes mellitus, anomalías dentales, anomalías del corazón, ataxia y anosmia (11, 12). Su prevalencia es baja, aunque la frecuencia varía según la población analizada en un rango que va de 1:160.000 en poblaciones del norte de Europa hasta 1:13.500 en algunas poblaciones Árabes (con alta consanguinidad) (12). En poblaciones caucásicas, en general la incidencia estimada es de 1:100.000. Sin embargo, existe un gran solapamiento fenotípico, genético y bioquímico (co-localización de proteínas y participación en las mismas vías de señalización) entre BBS y otras ciliopatías por lo que obtener información acerca de los defectos celulares y moleculares que causan BBS, probablemente facilite nuestro entendimiento acerca de la base celular de esta y otras patologías. A su vez, es importante resaltar que aunque las ciliopatías en general tienen baja prevalencia, los distintos rasgos que las caracterizan representan patologías comunes y de alto impacto a nivel de salud pública, por lo que el estudio de las ciliopatías y el desarrollo de acciones terapéuticas puede potencialmente beneficiar a un amplio número de pacientes.

BBS es una enfermedad genéticamente heterogénea con significativa variabilidad inter e intra-familiar. Si bien en la mayoría de los casos BBS se hereda de forma autosómica recesiva, la evaluación genética de varias familias donde este modo de herencia no se cumplía demostró la existencia de casos de herencia oligogénica (13-15). Al día de hoy se han identificado 17 genes BBS (*BBS1-12, MKS1, CEP290, FRITZ/C2ORF86, LZFTL1*; Refs. (16-

18)). Además de la interacción genética entre estos distintos genes causales, se ha identificado un modificador secundario de la enfermedad, *CCDC28B* (del inglés coiled-coil domain containing protein 28B), también llamado *MGC1203*.

Las proteínas BBS caracterizadas a la fecha se localizan principalmente en los centrosomas y cuerpos basales de las ciliias, participando activamente tanto en la formación y mantenimiento, como en la funcionalidad de estos organelos (19-25). En lo que respecta a la formación y mantenimiento, se ha demostrado que un grupo de proteínas BBS conforma un complejo octamérico denominado BBsoma que cumple funciones importantes durante la ciliogénesis (24, 25). Funcionalmente, se ha demostrado que la ausencia de proteínas BBS resulta en problemas durante la transducción de la vías de Shh (26) y de Wnt (2). En ésta última, se vió que altera el balance entre dos de sus cascadas efectoras más importantes: la vía canónica dependiente de β -catenina y la vía no-canónica también conocida como PCP (“planar cell polarity”) (27, 28). Sin embargo, no se sabe cuál es el rol exacto de las distintas proteínas BBS, tanto en lo que respecta a la vía de Wnt como en la biología de las ciliias en general, así como tampoco en lo que respecta a posibles roles extra-ciliares. Por ejemplo, recientemente nuestro grupo demostró que BBS7 también se localiza dentro del núcleo y está implicada en la regulación transcripcional (29). A su vez, en ese trabajo también se vinculó a otras proteínas BBS con proteínas nucleares por lo que futuros experimentos permitirán demostrar si esta es una función particular de BBS7 o es compartida por otras proteínas BBS.

En suma, si bien ha habido avances significativos en nuestro conocimiento acerca del rol biológico de este grupo de proteínas, pensamos que es importante continuar trabajando en la caracterización de algunas de las proteínas de BBS así como también el modificador secundario *CCDC28B*.

1.4 Identificación de *CCDC28B*: un modificador secundario del síndrome de Bardet-Biedl

Como se mencionó anteriormente, los modelos que explican los fenómenos de oligogenicidad se basan en la existencia de sistemas redundantes en los que distintas proteínas pueden, en mayor o menor medida, suplantar la función de otras, haciendo necesaria la co-existencia de mutaciones en varias de ellas para abolir completamente la

funcionalidad de un complejo o una vía. Surgió entonces la hipótesis de que genes que codificaran proteínas que co-localizaran con las BBS, interactuaran con ellas o compartieran las mismas vías de señalización, podrían ser buenos candidatos tanto a causar como a contribuir en la modificación fenotípica del síndrome (20). Mediante varios ensayos doble híbrido en levaduras se identificaron proteínas que pudieran interactuar con una de las proteínas BBS conocidas, BBS4, encontrándose 60 posibles interactores. Debido al rol biológico conocido de las BBS, para filtrar y priorizar la lista de interactores, se buscó aquellas que al mismo tiempo formaran parte del proteoma ciliar, una colección enriquecida en proteínas ciliares (30, 31). Solo una secuencia se encontró en ambos juegos de datos: *CCDC28B* (Fig.3). Posteriormente se mostró que esta interacción no es restringida a BBS4, sino que también se encontró por co-inmunoprecipitación que *CCDC28B* interactúa con otras proteínas BBS (20).

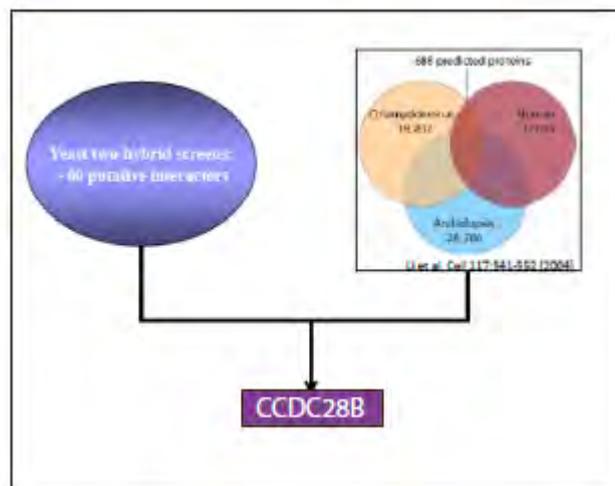


Fig.3. Identificación de *CCDC28B*. Mediante ensayos de doble híbrido en levaduras se identificaron proteínas que pudieran interactuar con BBS4 (donde se encontraron más de 60), y se buscó aquellas que al mismo tiempo formaran parte del proteoma ciliar, una colección enriquecida en proteínas ciliares (31); (www.ciliaproteome.org). Solo una secuencia se encontró en ambos juegos de datos: *CCDC28B*.

Con el objetivo de determinar si *CCDC28B* cumplía un rol en la aparición y/o desarrollo de la enfermedad, se secuenció *CCDC28B* en una colección de pacientes con BBS. De esta manera se detectó una alteración en la penúltima base del exón tres de *CCDC28B*, que si bien no resulta en un cambio de amino ácido, afecta el splicing normal del gen. Se demostró que esta transversión C-T en esta posición (residuo 430) afecta el patrón de splicing, favoreciendo la producción de una isoforma con una delección de cinco bases que resulta en

un cambio del marco abierto de lectura y la introducción de un codón de terminación prematuro (Fig.4). Por lo tanto la mutación tiene su efecto a nivel del ARN resultando en una disminución en la cantidad de ARNm de *CCDC28B* disponible.

Sin embargo, el análisis de un grupo de familias afectadas con BBS determinó que mutaciones en *CCDC28B* no son suficientes para desarrollar la patología pero si podían interactuar con mutaciones en otros genes BBS para modular la presentación y severidad del síndrome. Por ejemplo, en algunas familias se observó que solo estaban afectados (diagnosticados con BBS) aquellos individuos que eran homocigotas para una mutación en un gen causal BBS y además eran heterocigotas para esta mutación en *CCDC28B*. En estas mismas familias, los homocigotas para la mutación en el gen *BBS* sin mutaciones en *CCDC28B* y los heterocigotas para la mutación en *BBS* y *CCDC28B* no estaban afectados. En otras familias se observó que hermanos homocigotas para la misma mutación en un gen *BBS*, uno de ellos presentando además la mutación en *CCDC28B*, se correlacionaba con una presentación más severa de la enfermedad. En los casos de estas familias mencionadas anteriormente por lo tanto, la presencia de mutaciones en *CCDC28B* explicaba diferencias en penetrancia y expresividad. En suma, *CCDC28B* sumó un ejemplo más de que la oligogenicidad podría explicar, al menos en parte, la alta variabilidad clínica inter e intrafamiliar que presenta el síndrome (20). En definitiva, mutaciones en *CCDC28B* no son suficientes para producir la enfermedad, pero en algunas familias sí contribuyen a modificar la severidad con la que se manifiesta cuando se encuentran en un contexto genéticamente sensibilizado por la presencia de mutaciones en otros genes BBS (20).

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

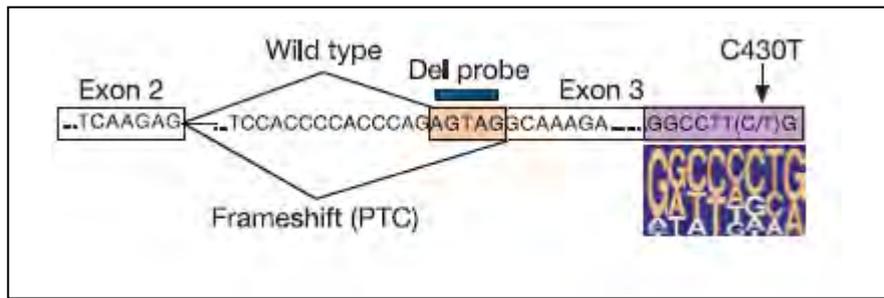


Fig.4. Defectos del splicing en la variante 430T de CCDC28B. Adaptado de (20). Se produce un transcripto mutado que tiene una delección de cinco pares de bases (cuadro naranja). La posición del cambio C430T se muestra en el contexto de un posible sitio de unión para SC35 (recuadro violeta, abajo se muestra la secuencia consenso).

1.5 Rol biológico de CCDC28B: su vinculación con ciliogénesis y mTORC2.

CCDC28B codifica una proteína de 200 aminoácidos, conservada en los metazoarios ciliados (32), que no presenta ningún motivo reconocible aparte de un dominio coiled-coil, típicamente involucrados en mediar interacciones proteína-proteína, ubicado en la región C-terminal de la proteína (32, 33). La región N-terminal de la proteína se predice como una región desordenada (34). Sin embargo, el análisis *in silico* de su secuencia, utilizando un programa que predice motivos funcionales en proteínas (The Eukaryotic Linear Motif RESOURCE FOR Functional Sites in Proteins) (35), identifica posibles motivos que podrían ser relevantes en su función tanto ciliar como fuera de este organelo. Por ejemplo se predice que *CCDC28B* presenta un motivo de unión a calmodulina, un motivo activador de MAPK y motivos de localización y exportación nuclear (señales NLS por “nuclear localization signals” y NES por “nuclear export signals”, respectivamente) (32).

Como parte del trabajo de tesis doctoral de la PhD. Magdalena Cárdenas-Rodríguez en el laboratorio, se ha comenzado a disecar el rol funcional de esta proteína. Hoy día sabemos que en células e *in vivo* en pez cebra (*Danio rerio*), *CCDC28B* juega un rol en ciliogénesis (32) y en la modulación de la vía mTOR (36).

En cuanto a su rol en ciliogénesis, sabemos que *CCDC28B* participa activamente en la biología de las cili ya que su depleción, tanto en células como en el pez cebra, resulta en una reducción en el largo de estos organelos. Por otro lado, se vio que el knockdown de *ccdc28b* en Zebrafish resulta en una serie de fenotipos que se asemejan a los vistos para distintos morfantes de genes ciliares y otros mutantes BBS. Por ejemplo, los morfantes *ccdc28b* se caracterizan por defectos en la pigmentación, malformaciones craneo-faciales e

hidrocefalia. A su vez, estos embriones presentan defectos en ciliogénesis y/o en la organización de las cilias en diferentes tejidos ciliados (32).

Para comenzar a diseccionar el mecanismo por el cual CCDC28B afecta ciliogénesis, se comenzó por la identificación del complejo proteico en el cual participa, una herramienta poderosa para ganar información funcional sobre proteínas. Por este motivo, en el laboratorio hemos realizado dos ensayos de doble híbrido (Cytotrap, Stratagene) en levaduras. En primer lugar, se realizó uno utilizando la isoforma BC_002462 (CCDC28B BC) que codifica la proteína más extensa (242 aa) y luego se utilizó la isoforma NM_024296 (CCDC28B NM) que se traduce en una proteína de 200 aa (20). En el primer ensayo realizado con la isoforma BC_002462 se identificaron cuatro interactores: cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP), Nck-associated protein 5 (NCKAP5), protein tyrosine phosphatase receptor A (PTPRA) y mitogen-activated protein kinase associated protein 1 (MAPKAP1), también llamada SAPK1 interacting protein (SIN1). De particular interés resultó SIN1, miembro de uno de los complejos mTOR (mTORC2).

La vía de mTOR (del inglés “mechanistic or mammalian target of rapamycin”) es un regulador central de la homeostasis celular. Integra señales extra e intracelulares y sirve como centro regulador del metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación celular (37). La vía de mTOR por tanto regula procesos claramente alterados en algunos de los fenotipos que caracterizan BBS así como otras ciliopatías como por ejemplo la formación de quistes renales donde se observa, entre otros defectos, un desbalance entre proliferación y diferenciación. Esta vía está compuesta por dos grandes complejos multiproteicos, mTORC1 y mTORC2 que tienen una composición distinta y regulan diferentes procesos celulares.

mTORC1 fue el primero de ambos complejos en ser caracterizado, su actividad es inhibida por la droga rapamicina y está compuesto por cinco proteínas: mTOR que es la serina/treonina quinasa que nuclea ambos complejos, RAPTOR, mLST8, PRAS40 y DEPTOR. mTORC1 responde e integra señales de disponibilidad de aminoácidos, estrés, oxígeno, energía y factores de crecimiento, para regular la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular promoviendo procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y de lípidos así como limitando procesos catabólicos como la autofagia (por revisiones extensas en el tema ver (37, 38)).

mTORC2 está compuesto por seis proteínas algunas de las cuales son compartidas con mTORC1: mTOR, RICTOR, mSIN1, PROTOR-1, mLST8 y DEPTOR. En comparación con

mTORC1, es mucho menos lo que se conoce sobre la vía de mTORC2 (en parte porque no se conocen inhibidores específicos), pero se ha determinado que juega un rol en supervivencia, proliferación, metabolismo y principalmente en la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular (39). mTORC2 regula muchos de estos procesos celulares a través de la activación de diferentes quinasas de la subfamilia AGC como ser Akt y PKC α . Se demostró por ejemplo que mTORC2 fosforila directamente a AKT en la serina 473 y esta fosforilación es requerida para su completa activación (40).

Sumado al rol central de esta vía en la homeostasis celular, nuestro interés en la interacción CCDC28B-SIN1 se vio reforzado recientemente tras varios reportes vinculando la vía de mTOR directamente con las cilias, aunque los estudios publicados se han centrado principalmente en mTORC1. Una primera asociación entre la vía de mTOR y la cilia surgió de un trabajo donde se muestra que la alteración de la vía de mTOR puede estar ligada a una alteración de la función mecanosensora de la cilias primarias del epitelio renal y ser la causante de la formación de quistes renales (41). Otro estudio mostró que la depleción de Tcs1a, un inhibidor de mTOR, *in vivo* en pez cebra produce fenotipos ciliares (42). Más recientemente, se reportó que mTORC1 modularía el largo de las cilias a través de la regulación de la síntesis de proteínas precursoras de las cilias (43). Finalmente se vio una asociación directa entre la cilia y la vía de mTOR en un estudio donde muestran que la flexión de la cilia, ocasionado por el movimiento de fluídos extracelulares, disminuye la actividad de mTORC1 al activar la quinasa LKB1, un inhibidor de mTORC1 ubicado en el cuerpo basal (44).

En nuestro laboratorio se demostró que CCDC28B interactúa con SIN1, un miembro del complejo mTORC2, y que esta interacción es relevante tanto en el contexto de la regulación del largo de la cilia como en la modulación de la actividad de mTOR.

Primero se mostró que CCDC28B actúa como un regulador positivo de la vía de mTORC2 facilitando el ensamblado o promoviendo la estabilidad del complejo. Se vio que depletar CCDC28B resulta en una reducción de la actividad de mTORC2 y su sobreexpresión en un aumento en la actividad de éste complejo. Esto se correlaciona con la cantidad de complejo disponible ya que en ausencia de CCDC28B las interacciones SIN1-RICTOR y SIN1-mTOR se encuentran reducidas, efecto que no se explica por cambios en los niveles totales de SIN1, Rictor o mTOR que no se ven afectados (36).

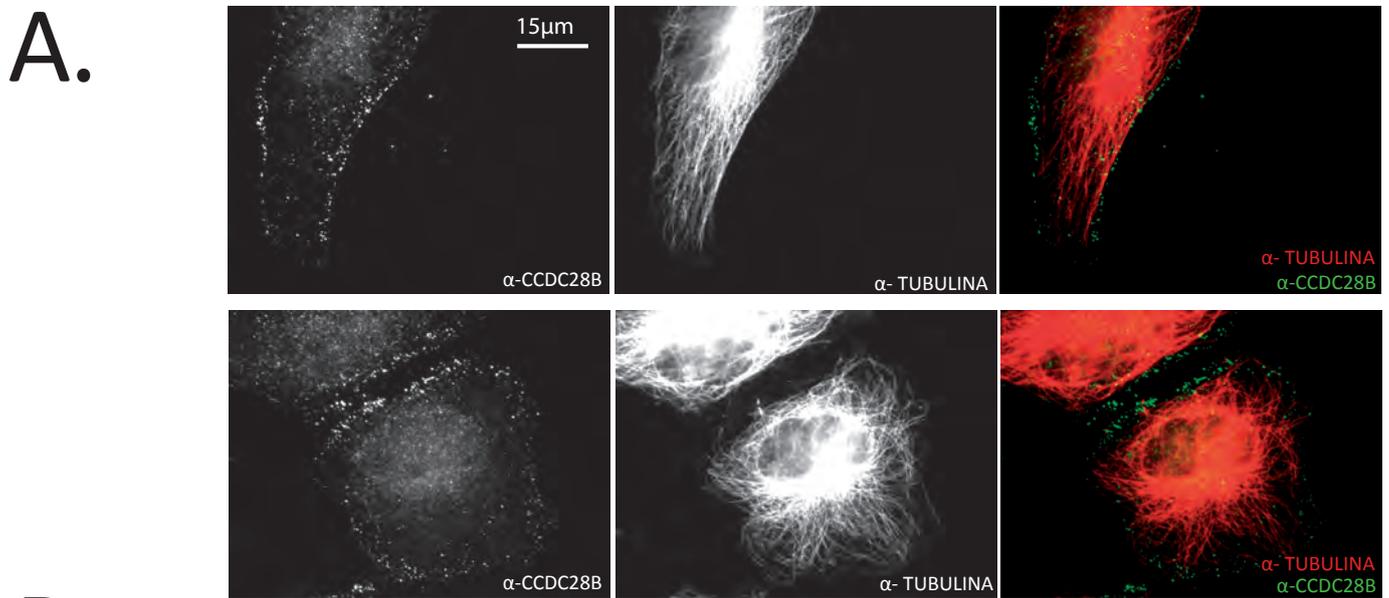
Luego se mostró que la habilidad de CCDC28B de regular el largo de la cilia depende, al menos en parte, de su interacción con SIN1, y el rol de SIN1 en ciliogénesis es independiente de su rol en el contexto de mTORC2. Se mostró primero que los embriones morfantes de *sin1* en pez cebra presentan cilias más cortas mientras que este efecto no se observó depletando *riCTOR*, otro componente principal de mTORC2. Luego se realizaron ensayos de interacción génica entre *ccdc28b* y *sin1* en pez cebra donde se mostró que estos dos genes interactúan para regular ciliogénesis. Por último, mediante ensayos de rescate se observó que la sobreexpresión de *sin1* es capaz de rescatar, por lo menos parcialmente, el fenotipo ciliar de *ccdc28b* (36).

Si bien todavía no conocemos el mecanismo por el cual SIN1 afecta ciliogénesis, se sabe que regula, al menos indirectamente, diferentes cascadas de señalización de MAPKS (mitogen activated protein kinases), y resulta interesante que las MAPKS han estado implicadas en la regulación de IFT y en ciliogénesis (45, 46). Por tanto, CCDC28B podría regular el largo de la cilia a través de su interacción con SIN1 (o mediando la interacción de SIN1 con otras proteínas) y la consecuente regulación de la señalización por MAPKS. Por otro lado CCDC28B interactúa con varias proteínas BBS que forman parte del BBSoma, un complejo que se sabe participa en ciliogénesis (25). Por lo tanto, otra posibilidad es que CCDC28B afecte la cilia, por lo menos en parte, independientemente de SIN1.

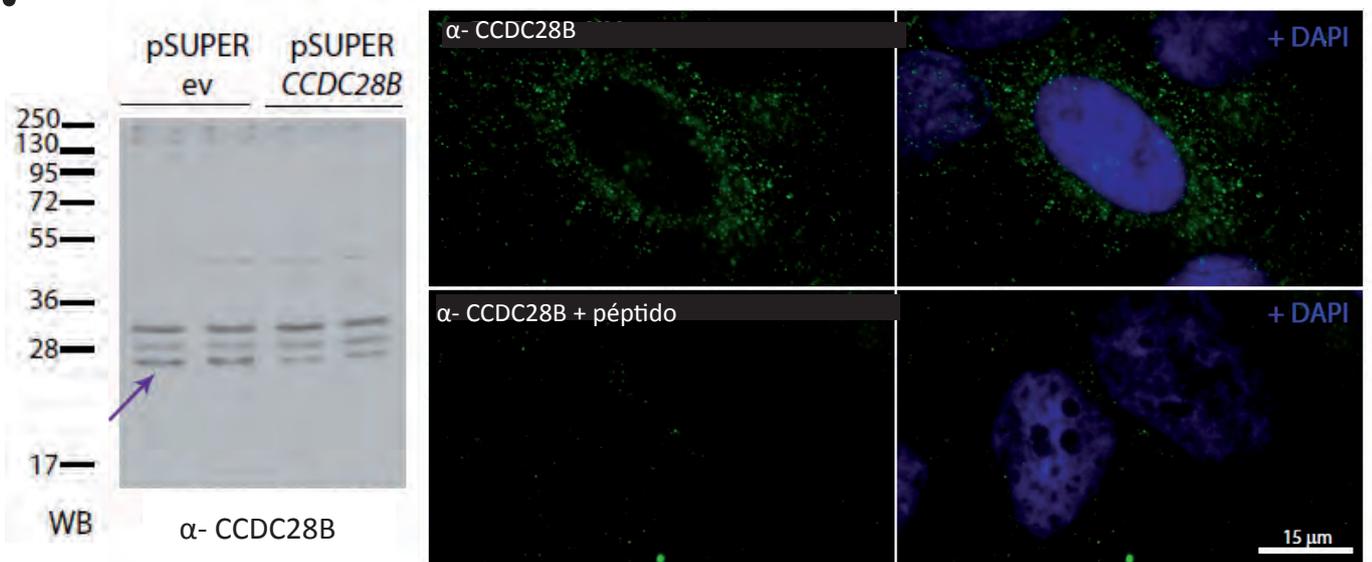
1.6. Localización sub-celular

CCDC28B fue reportada originalmente como una proteína centrosómica, presentando por tanto un patrón de localización similar al de la mayoría de las proteínas BBS testeadas hasta la fecha (20). En el laboratorio hemos generado varios anticuerpos contra CCDC28B que no recapitulan este patrón sino que dan una señal más compleja involucrando señal nuclear, citoplasmática y una señal mostrando acúmulos mayormente concentrados en la periferia de la célula (Fig.5A). Sin embargo la calidad de estos anticuerpos no es buena ya que si bien reconocen CCDC28B como se demuestra por Western Blot en donde se comparan muestras control con células en donde CCDC28B ha sido depletada por ARNi, también reaccionan con otras proteínas (Fig.5B).

En definitiva, sabemos que la señal observada proviene de nuestros anticuerpos primarios (ya que la misma desaparece si pre-incubamos con el péptido contra el que fueron hechos) pero no hemos podido determinar con exactitud si toda o parte de esa señal corresponde a CCDC28B (Fig.5B). Actualmente en el laboratorio se está tratando de hacer knockdowns y ver que señal “desaparece” pero esto no ha sido fácil porque además de presentar una localización “compleja”, la misma parece ser altamente dinámica (Fig.5C). Esto ha generado una gran dificultad para poder por un lado definir con exactitud el patrón de localización “normal” de la proteína (Fig.5).



B.



Imágenes tomada y adaptada de la tesis de Doctorado de Dra. Magdalena Cárdenas.

C.

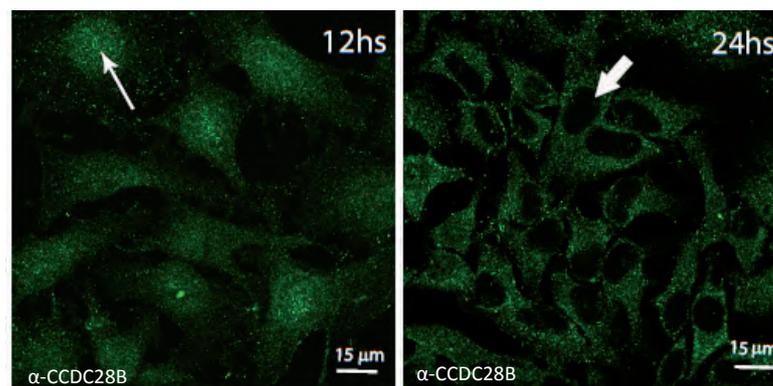


Imagen tomada de la tesis de Doctorado de Dra. Magdalena Cárdenas.

Fig.5 Localización sub-celular de CCDC28B. **A.** Inmunomarcación con anticuerpo anti CCDC28B donde se observa marcación nuclear y citoplasmática así como acúmulos distribuidos por el citoplasma y enriquecidos en la periferia de la célula. **B.** A la izquierda Western Blot utilizando un anticuerpo anti CCDC28B donde se comparan muestras control con células en donde CCDC28B ha sido depletada por ARNi. Se observa que la banda de abajo (indicada por la flecha) disminuye su intensidad. A la derecha inmunofluorescencia en células incubadas con el anticuerpo anti CCDC28B solo, o con el anticuerpo anti CCDC28B+ el péptido contra el que fue hecho. En este último caso vemos que se pierde toda la señal. **C.** Inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-CCDC28B a las 12 y 24 horas post-plaqueo.

1.7 Identificación de nuevos interactores de CCDC28B

Para continuar obteniendo información funcional acerca de CCDC28B en el marco de mi tesina de grado realizamos un segundo ensayo de doble híbrido en levaduras, esta vez utilizando la isoforma CCDC28B_NM como punto de partida. A partir de ese ensayo identificamos cuatro potenciales interactores: microtubule end binding protein 3 (EB3), Kinesin light chain 1 (KLC1), Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (EIF3) y CCR4-NOT (CNOT). Dado que EB3 y KLC1 son proteínas asociadas a microtúbulos, pensamos que su interacción con CCDC28B podría brindarnos información relevante para entender el vínculo entre nuestra proteína de interés y la ciliogénesis. De hecho, esta posibilidad se vio reforzada cuando en el año 2011 se publicó un trabajo que vincula directamente a EB3 en ciliogénesis (47). Por estos motivos decidimos centrarnos en estos dos interactores en el marco de mi trabajo de maestría.

Las proteínas EB (End-binding), son una familia de proteínas central dentro del grupo de las proteínas de unión al extremo positivo de los microtúbulos (+TIPS de plus-end- tracking proteins), que se asocian directamente a ellos y median el reclutamiento de otras +TIPS a este sitio (48). En mamíferos existen tres EBs (EB1, EB2 y EB3) que son estructuralmente similares (57-66% de identidad aminoacídica), y que son codificadas por tres genes distintos (*MAPRE1*, *MAPRE2* y *MAPRE3* respectivamente) (49). Los tres miembros de la familia de EB forman homodímeros tanto *in vivo* como *in vitro* y EB1 y EB3 también forman heterodímeros que podrían ser funcionalmente distintos a los homodímeros (50, 51). Estudios revelan que existe un grado significativo de redundancia funcional entre EB1 y EB3, aunque también se han reportado funciones específicas para cada una de ellas (52). Con respecto a la distribución de su expresión, EB1 presenta una distribución ubicua mientras que EB3 se expresa preferencialmente en el Sistema Nervioso Central (53). La función de las EB ha sido principalmente estudiada en el contexto de su unión al extremo positivo de los microtúbulos en crecimiento, (52) donde regulan su dinámica y están involucradas en su unión a una gran variedad de estructuras celulares (red de actina, membrana, transporte de vesículas en neuronas y deposición de proteínas en membrana) (54). Las proteínas EBs en células usualmente promueven la dinámica y el crecimiento de los microtúbulos y suprimen las catástrofes (55-57). Sin embargo experimentos *in vitro* (58), donde se analiza de forma directa y aislada el efecto de EB sobre los microtúbulos, han sido controversiales ya que se

han reportado diferentes tasas de crecimiento y acortamiento de los microtúbulos, inducción y supresión de catástrofes, y también que no influyen en su dinámica (56, 58-62). Esto sugiere que la influencia de las EB en los microtúbulos es una combinación del efecto de su unión directa sobre ellos y de los efectos causados por las proteínas que reclutan o que ven de alguna forma afectada su localización celular.

Por otro lado, y de manera muy interesante en el marco de esta tesis, un estudio reciente demostró que EB1 y EB3 también se localizan en los centrosomas, donde cumplen un rol en ciliogénesis que es independiente de su función en el extremo positivo de los microtúbulos citoplasmáticos. A través de su unión al extremo negativo de los microtúbulos en el cuerpo basal, facilitarían el tráfico vesicular a la base de la cilia (47). En este mismo estudio se demostró que EB3 se localiza en la punta de las cilia móviles y regula el largo de la cilia así como la formación de una estructura fibrosa en forma de red asociada al cuerpo basal denominada “rootlet filaments” (47).

El otro posible interacto con el que decidimos seguir trabajando es la cadena liviana de la kinesina1 (KLC1). La kinesina 1 (la primera descubierta y más abundante de la familia de las kinesinas), es un motor molecular que mueve cargas hacia el extremo positivo de los microtúbulos (63). Está compuesta por dos pares de cadenas pesadas (KHCs) que utilizan la hidrólisis de ATP para moverse sobre los microtúbulos, y por dos pares de cadenas livianas (KLCs) que regulan la actividad de las KHC y median su unión a las diferentes proteínas o complejos que son transportados. Ambas subunidades en vertebrados son codificadas por 3 genes diferentes. KLC1, la más estudiada de las cadenas livianas, se expresa de forma ubicua pero se encuentra enriquecida en tejidos neuronales y se une por su extremo N-terminal a las KHC y a cargas a través de su dominio c-terminal (64). Hay muchas variantes de splicing de *KLC1*, que presentan su variabilidad en el extremo C-terminal y que le darían a la kinesina su especificidad de carga (65). La isoforma que nosotros identificamos como interacto de CCDC28B en el ensayo doble híbrido, fue la isoforma KLC1D que preferencialmente se une a vesículas derivadas del aparato de Golgi (65, 66). Resultó interesante, en el contexto de esta tesis, que se ha reportado que cadenas livianas de la kinesina 1, entre ellas KLC1, interactúan con los “rootlet filaments” que juegan un rol en el transporte intracelular brindando un esqueleto para el transporte de proteínas ciliares (67, 68).

Dado que los dos potenciales interactores de CCDC28B identificados están estrechamente vinculados al esqueleto de microtúbulos y en particular a las cilia, pensamos por

tanto que la caracterización funcional de estas proteínas brindará información relevante para entender el rol de CCDC28B tanto en la biología de las cilias como posiblemente en la regulación de mTORC2.

1.8 Objetivos del trabajo

Dados los antecedentes presentados anteriormente, el objetivo de este proyecto fue continuar con la caracterización funcional del modificador secundario de BBS, CCDC28B, para profundizar en el mecanismo por el cual esta proteína regula la ciliogénesis y la actividad de la vía mTOR, así como potencialmente identificar otras posibles funciones que pueda tener.

Para esto nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificar factores que influyen en la dinámica de la localización sub-celular de CCDC28B.
- 2) Determinar si los niveles de ARN y proteína de CCDC28B cambian en diferentes condiciones de cultivo o ante diferentes estímulos.

Pensamos que estos dos primeros objetivos brindarán información relevante para correlacionar cambios en la expresión/localización de CCDC28B con la actividad de mTORC2, ciliogenesis, u otras actividades en las cuales participe esta proteína.

- 3) Confirmar y caracterizar la interacción de CCDC28B con EB3 y KLC1.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

2.1.1 Líneas celulares utilizadas y condiciones de cultivo

Los experimentos en células de mamífero se realizaron en las siguientes líneas celulares:

Humanas:

HeLa. Linaje de células derivadas de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida de una paciente llamada Henrietta Lacks (HeLa). Crecidas en DMEM con alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/streptomycin (50 µg/µl).

HEK293-FT. (Human Embryonic Kidney 293 cells). Línea celular originalmente derivada de células de riñón de embrión humano. Crecidas en DMEM con alta glucosa suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina/streptomycin (50 µg/µl), Geneticina G418 (500 µg/ml), Piruvato de Sodio (1mM) y Aminoácidos no esenciales (0.1mM).

hTERT- RPE. Línea celular derivada de células del epitelio pigmentado de retina humana que fueron inmortalizadas utilizando la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) crecidas en medio 1:1 DMEM alta glucosa y F12 suplementado con SFB y 0.01 mg/ml de Higromicina B.

Ratón:

NIH3T3 Línea celular derivada de fibroblastos de embrión murino. Crecidas en DMEM con alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/streptomycin (50 µg/µl).

Todas las células fueron crecidas a 37°C y 5% CO₂.

2.1.2 Sobre-expresión de genes en células de mamífero con ADN plasmídico

La transfección transitoria de plásmidos de ADN en las células de mamífero se realizó por el método de Fosfato de Calcio o Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).

El método de Fosfato de Calcio se basa en su capacidad de, en buffer HBS (Hepes Buffered Saline), formar un precipitado que incorpora el ADN y se adhiere a la membrana celular de manera que el plásmido de interés puede ser fácilmente internalizado por endocitosis. Se utilizó el protocolo de “Current protocols in Molecular Biology”(69).

La Lipofectamine™ 2000 contienen subunidades lípidicas que forman liposomas en ambientes acuosos y atrapan el ADN. Estos liposomas se fusionan electroestáticamente a la membrana plasmática permitiendo el pasaje del ADN a través de ella hacia el citoplasma. Se siguió la guía de transfección proporcionada por el fabricante (Cat.No.11668).

2.1.3 Disminución de la expresión de genes en células de mamífero

Para reducir la expresión de genes se utilizaron los Stealths RNAi™ siRNA (Invitrogen) debido a que utilizan ARNi modificados químicamente que proveen mayor especificidad, aumentan su estabilidad en suero y medio de cultivo y disminuyen su toxicidad celular en comparación con los siARN convencionales. Los oligos stealth fueron transfectados en células de mamífero utilizando la Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Se utilizaron los siguientes Stealths:

Para líneas celulares humanas (secuencia proporcionada en sentido 5'-3' y complementaria al ARNm del gen blanco):

MAPRE3: CCUGCACCUCAACUAUACCCAAGAU

MAPRE1: GGAUCA AUGAGUCUCUGCAGUUGAA

KLC1: CCUACUGAAUGAUGCCUUGGCUAUU

CCDC28B: UCAGUAAUUCUAUCCAGAAGCUGCA

Para líneas celulares murinas:

Mapre3: CCCAGGUGAUCAGAUCUUCAACAAA

Klc1: UCACGCAGGAUGAGAUCUUCUUA

Como oligo de ARN control se utilizó un oligo stealth con bajo contenido GC (comparable al de los distintos oligos utilizados), el cual no hibrida con ningún ARNm conocido.

2.1.4 Sincronización de cultivos celulares y citometría de flujo

Sincronización de cultivos de NIH3T3.

Sincronización en fase G0

Para sincronizar las células en fase G0 se cultivaron en ausencia de SBF durante 72 horas. El SBF posee componentes (factores de crecimiento y otros aún no identificados) que son indispensables para el crecimiento y proliferación celular. Es así que el cultivo de células en ausencia de suero induce a las mismas a salir del ciclo y entrar en fase G0 (70). 24 horas en ausencia de SBF es suficiente para que las células que ya pasaron el primer punto de chequeo completen el ciclo y entren en G0 (71) (72).

Sincronización en fases G1/S, S y G2

Para obtener cultivos celulares enriquecidos en células en las distintas fases del ciclo se puso a punto la técnica de doble bloqueo con timidina realizando algunas modificaciones a un protocolo ya descrito (73). Con este protocolo las células se arrestan en la interfase G1/S, ya que se impide la síntesis de ADN por una retroinhibición negativa de la síntesis de nucleótidos (74).

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

horas de la reactivación un 63 y 22 % de células se encuentran en fase S y G2 respectivamente.

La sincronización de los cultivos se verificó mediante citometría de flujo.

Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

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

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

El citómetro de flujo utilizado fue el CyAn ADP (Dako). El laser usado para excitar al IP fue el azul (488nm) ya que el IP tiene un máximo de absorción a 536 nm. Este laser también es el utilizado para analizar las propiedades de dispersión de la luz de la célula que dan información de tamaño y granularidad de la célula. Esta información es colectada por los detectores forward scatter (FSC) y side scatter (SSC) respectivamente. El IP tiene un máximo de emisión a 623 nm por lo que el detector utilizado fue el FL2 que colecta luz en un ancho de banda de 575/25 nm.

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

2.2 Medios y protocolos para el trabajo con bacterias

2.2.1 Medios

Se crecieron bacterias *E.coli* en medio Luria y Bertani (LB) (10g de tryptone, 5g. de extracto de levaduras. 5g. de NaCl y H₂O hasta 1 litro), en LB Agar (1.5% de Agar en LB) y en medio S.O.C (20g. de tryptone, 5g de extracto de levaduras, NaCl 10nM KCl 2,5Mm, MgCl₂ 10Nm, MgSO₄ 10Nm y 20mM de glucosa).

2.2.2 Transformación de bacterias

Se utilizó el método de choque térmico. En breve: se agrega de 1-10ng de ADN a 40µL de bacterias *E.coli* competentes de la cepa DH5α, se incuba en hielo por 30 minutos y luego se realiza a un choque térmico en un baño a 42°C por 45 segundos para permitir el ingreso del ADN a las células. Se retorna al hielo por 2 minutos. Se agrega 900µl de medio rico SOC y se deja agitando a 200 rpm por una hora a 37°C para estabilizar las células y permitir que aquellas bacterias que incorporaron el plásmido expresen el gen que les confiere resistencia

al antibiótico. Finalmente se plaquea en LB agar conteniendo el antibiótico selectivo y se incuban las placas a 37°C toda la noche.

2.2.3 Extracción de ADN plasmídico

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

2.3 Análisis de proteínas en células de mamífero

2.3.1 Extracción de proteínas: lisado de células

A las placas de células se agrega Buffer de lisis (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1%NP-40) suplementado con inhibidor de proteasas y Ortovanadato de Sodio (1 ml por placa de 10 cm), y se incuban en hielo por 15 minutos. Se rastrilla las placas para levantar el lisado de células, se transfiere el mismo a tubos que se incuban en hielo durante 15 minutos vortexeando cada dos y finalmente se centrifuga a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (lisado) se transfiere a un nuevo tubo.

2.3.2 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de cuantificación con BCA (Ácido Bicinconínico) que se basa en la formación de un complejo entre proteínas y Cu^{2+} que en condiciones alcalinas reduce el Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ obtenido, forma un complejo con BCA de color azul-púrpura, estimable mediante espectrofotometría, de modo que la cantidad de complejo coloreado será

proporcional a la cantidad de Cu^{2+} reducido, y por lo tanto, a la cantidad de proteína presente en el medio (75).

En este método se añaden 200 μL del colorante (BSA y solución de sulfato de cobre) en 10 μl de cada muestra (estándar de concentración conocida, blanco y la muestra a cuantificar en distintas diluciones) se incuba durante 30 minutos a 37°C y se procede a la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Se construye una curva de calibración (concentración en función de la absorbancia a 570 nm) con los datos de la muestra estándar, a partir de la cual se calcula la concentración de las muestras problema.

2.3.3. Ensayo de Co-inmunoprecipitación

Preparación de las células

Se co-transfectaron células HEK293 por el método de fosfato de calcio en placas de 10 cm con pHA CCDC28B junto con pMYC EV, EB3 o KLC1. A las 6 horas se lavó con PBS para remover los restos de precipitado, se agregó medio fresco y se incubaron las células por 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

Preparación del lisado celular

A las 48 horas post-transfección se les retiró el medio de cultivo a las células, se agregó 1ml de Buffer CHAPS (HEPES 40 mM, NaCl 120 mM, EDTA 1 Mm, NaF 50 Mm, Na_3VO_4 0,5mM, CHAPS 0,3%) suplementado con inhibidor de proteasas y se incubó en hielo por 10 minutos. Se rastrilló las placas para levantar el lisado de células, se transfirió el mismo a tubos que se incubaron en hielo durante 15 minutos agitando cada tanto y se centrifugaron a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C .

Preparación de las perlas de agar para inmunoprecipitación (“beads”)

Para cada muestra se utilizaron 35 μl de beads con proteína G unida a un anticuerpo anti-Myc monoclonal. Se lavaron con buffer CHAPS dos veces y luego del último lavado se centrifugaron durante 1 minuto a 12000g.

Unión del lisado celular con las beads

A las beads preparadas se agregó 1ml del lisado celular. Se resuspendió completamente y se dejó incubando 4 horas con inversión continua a 4°C.

Las beads fueron posteriormente lavadas 3 veces durante 10 minutos con buffer CHAPS, centrifugando entre lavados a 8.200 g por 30 seg. Luego del último lavado, se centrifugó 15min. a 13.000 rpm, se resuspendió en Laemmli buffer 4x (3g Tris-HCl pH 6.8, 40ml glicerol, 5g SDS, 5mg azul de bromofenol, H₂O ultrapura csp 100 ml y 10% β-mercaptoetanol), se hirvieron las muestras y se realizó un SDS-PAGE (sección 2.3.4). Posteriormente se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo Monoclonal anti HA (Sigma-Aldrich #6908).

2.3.4. Western Blot

SDS-PAGE

Separamos las proteínas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por su acrónimo en inglés).

Previo a la corrida electroforética las muestras se hierven en Laemmli Buffer por 5 minutos, se enfrían en hielo y se carga en el gel la cantidad deseada. Dependiendo del tamaño de las proteínas evaluadas en cada caso utilizamos geles con entre 10% y 15% de acrilamida. La electroforesis se realizó a 30mA por gel en buffer TGS (TRIS-HCL 24mM, Glicina 192 mM y SDS 3,5mM).

Transferencia de proteínas a membrana

Luego de que la electroforesis se completara, se equilibró el gel en buffer de transferencia y se hidrató la membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride, Amersham-GE Healthcare) en metanol antes de montar el aparato de transferencia. El aparato de transferencia consiste en un casete que se ensambla con una esponja, papel absorbente, gel, membrana, papel absorbente y esponja, en este orden. Se realizó la transferencia de proteínas aplicando un campo eléctrico a través del gel hacia la membrana de 400mA en buffer de transferencia (1xTGS, 20% metanol) durante 2 horas a 4°C.

Detección de las proteínas

Después de la transferencia se bloqueó la membrana, durante 40 min o toda la noche a 4°C, con una solución de 5% de leche en PBS-T (PBS con 0,2% Tween 20) y se lavó 3 veces con PBS-T sin leche (5 minutos cada uno con agitación). Luego se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-T o PBS-T con 5% de leche (dependiendo el anticuerpo utilizado) por 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (nuevamente dependiendo del anticuerpo) con agitación, se lavó 3 veces con PBS-T (10 minutos cada uno con agitación) y a continuación se incubó con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a peróxidasa de rábano por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con PBS-T se procedió a la detección de la proteína utilizando el sistema de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo scientific) y placas de rayos X. Este es un método no radiactivo basado en la emisión de luz que ocurre durante la oxidación del luminol por la peroxidasa que es capturada en una lámina de rayos X.

Los anticuerpos comerciales utilizados en Western Blot fueron los siguientes:

- Monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich #H6908).
- Monoclonal anti-Myc (Sigma-Aldrich #M4439)
- Monoclonal anti-EB3 (Absea número clon: KT53)
- Monoclonal Anti-FosfoAkt(S473) (Cell Signaling #4060)
- Monoclonal Anti-Akt (Cell Signaling #4685)
- Monoclonal Anti- α -Tubulina (Sigma-Aldrich #6074)
- Anti-Mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich #A9044)
- Monoclonal Anti-GAPDH (Sigma-Aldrich #G8795)
- Anti-Rabbit IgG HRP (Sigma-Aldrich #A0545)
- Anti-Rat IgG HRP (Sigma-Aldrich #A9037)

2.3.5. Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia se crecieron células sobre cubreobjetos colocados en placas de 35 mm. Se quitó el medio de cultivo y se lavó las células con PBS. Luego las muestras se fijaron por 10min con metanol a -20°C o paraformaldehído 4% a temperatura ambiente. Se permeabilizó en Tritón X 0.1% 1-10 minutos con agitación y se bloqueó con suero fetal bovino al 5.5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente

con agitación. Después se incubaron las células con el anticuerpo primario diluído en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS se incubó con el anticuerpo secundario, también diluído en PBS, conjugado a un fluoróforo durante una hora a temperatura ambiente y luego por 10 minutos se incubó con DAPI (4,6- diamidino-2-phenylindole) para teñir los núcleos ya que este agente se intercala en el ADN. Por último se realizaron dos lavados con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con la solución de montaje Prolong Gold Antifade (Invitrogen). Una vez colocado el anticuerpo secundario todos los pasos se realizaron protegiendo los cubreobjetos de la luz para evitar la excitación de los fluoróforos y por tanto la pérdida de señal.

Los anticuerpos comerciales utilizados en inmunofluorescencia fueron los siguientes:

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

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

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

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

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

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

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

Marcador nuclear: DAPI (Invitrogen #D1306)

TOPRO (Invitrogen #T3605)

2.4. Microscopía

Para la captura de imágenes se utilizó el microscopio de epifluorescencia 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.

2.5 Extracción de ARN de células de mamífero

La extracción de ARN utilizando Trizol (Total RNA Isolation Reagent de Invitrogen) se basa en la solubilidad diferencial de los componentes celulares entre dos fases no miscibles. El Trizol está compuesto por una mezcla de fenol (donde los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidino (agente desnaturalizante de proteínas e inhibidor de proteasas) a

pH 4,5. Así la integridad del ARN se mantiene durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una etapa de centrifugación permite separar la fase acuosa que contiene el ARN de la fase orgánica (ADN y proteínas). El ARN se recupera mediante una precipitación con isopropanol.

En el caso de células adherentes se puede incubar las mismas directamente en Trizol tratar el cultivo con tripsina de manera de levantar las células para luego de una centrifugación a 1300 rpm resuspenderlas en Trizol. Inmediatamente se incuba 5 minutos a temperatura ambiente para luego agregar cloroformo. Se agita vigorosamente por 15 segundos e incuba unos minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifuga 15 min a 12.000g y 4°C. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo agregándole isopropanol, se incuba a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifuga a 12000g y 4°C por 10 minutos más. Posteriormente se descarta el sobrenadante y el pellet obtenido (conteniendo el ARN) es lavado con etanol 75%. Se realiza una última centrifugación de 5 minutos a 7500g y 4°C, luego de la cual se remueve completamente el sobrenadante dejando secar el pellet a temperatura ambiente. Éste finalmente se resuspende en H₂O libre de ARNasas e incuba 10 minutos a 56°C para estabilizarlo.

2.6 Preparación de ADN copia (ADNc)

El ARN extraído por el método del Trizol (como se describe en 2.5) se utilizó para obtener ADNc utilizando el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se prepara la muestra de ARN y primer utilizando hasta 5µg de ARN, 1µl de 10Mm dNTP mix, 1 µL de oligo dT y agua, tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato) para inhibir ARNasas, hasta llegar a un volumen de 10 µl. Cada muestra se incuba a 65°C por 5 minutos y luego se deja 1 minuto en hielo. A esta muestra se le agregan 9 µl del un mix que contiene 10x RT buffer, 25Mm MgCl₂, DTT y un inhibidor de ARNasas (RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor) y se incuba a 42°C por 2 minutos. Luego se agrega la transcriptasa reversa (SuperScript™ II RT) y se incuba a 42°C por 50 minutos. Se termina la reacción incubando a 70°C por 15 minutos y se deja enfriar en hielo. Por último se centrifuga, se agrega RNase H para degradar el ARN molde y se incuba a 37°C por 20 minutos.

2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.7.1 Amplificación por PCR convencional

Ésta se llevó a cabo en una reacción de volumen final de 25µl, conteniendo ADN o ADNc como molde, 2,5µl de Buffer 10x (Tris-HCl pH 8.7, KCl,(NH₄)SO₄, y MgCl₂), 0,5 µl de una mezcla de dNTPs a 0,2mM, 1 µl de cada primer a una concentración de 10µM, 0,25 U de Dream Taq y H₂O para completar los 25 µl.

El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente:

- 95°C durante 5 min

Ciclado (n ciclos):

- 95°C durante 30 segundos (desnaturalización)

- 54°C-57°C durante 30 segundos (dependiendo de los primers utilizados)

- 72°C durante un tiempo dependiente del largo del amplicón (aproximadamente 1 min por Kb)

La reacción de PCR se terminó con una extensión a 72°C durante 10 min y el posterior enfriamiento de las muestras a 4°C.

2.7.2. PCR en Tiempo Real

PCR en tiempo real es uno de los métodos más sensibles y confiables para cuantificar la expresión de genes. La PCR en tiempo real explota el hecho de que la cantidad de producto amplificado durante la fase exponencial de la reacción es proporcional a la cantidad de templado inicial (76, 77). Durante la fase exponencial, el producto de la PCR idealmente se duplica en cada ciclo si la eficiencia de la reacción es del 100%.

La dinámica de la PCR en tiempo real generalmente se sigue utilizando marcadores fluorescentes: genéricos o específicos. La detección genérica se basa en la utilización de colorantes que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR. Una vez que el colorante se une al ácido nucleído formado en la reacción, este emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real. Por lo tanto, un aumento del

producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR; esto permite que las concentraciones de ADN o ADNc puedan ser cuantificadas o relativizadas entre diferentes muestras (78). Varios de estos marcadores se han descrito pero los más utilizados son los colorantes SYBR® Green y SYBR® Gold. En este trabajo utilizamos SYBR® Green que se une al surco menor del ADN doble hebra.

Se midió la incorporación de SYBR green utilizando el Quantimix Easy SYG KIT (BioTools) siguiendo el protocolo del fabricante.

Como gen housekeeping (constitutivo-control) se utilizó *GAPDH*. El equipo utilizado fue el Corbett rg-6000 y el análisis de datos fue realizado mediante el programa Rotor-Gene 6000 series 1.7. software. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

30 segundos a 95°C para desnaturalizar el ADN, 30 segundos para el alineamiento a 54°C-57°C (dependiendo de los primers utilizados) y 30 segundos a 72°C de extensión.

Los datos de PCR en tiempo real pueden ser cuantificados de manera absoluta o relativa. Cuando no es necesario conocer el número de copias solo detectar cambios fisiológicos en expresión génica, como en nuestro caso, la cuantificación relativa es un método adecuado, más sencillo y rápido. Éste se basa en la comparación entre la expresión de un gen blanco versus la de un gen referencia y se llama método Ct comparativo o $\Delta\Delta C_t$. El cálculo se realiza con las siguientes ecuaciones y procedimiento (79):

$$\Delta C_t = C_t \text{ blanco} - C_t \text{ referencia} \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ control} \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad \text{Ecuación (3)}$$

1. Se determina el valor C_t de cada reacción, que es el valor de ciclo umbral (del inglés: threshold cycle value, CT)
2. Se calcula la diferencia en los valores de C_t del gen de interés (blanco) y el control endógeno (referencia). Esto es el ΔC_t que se muestra en la ecuación (1).
3. Se resta el ΔC_t de la condición control menos el ΔC_t de la condición tratada para hallar el $\Delta\Delta C_t$ como se muestra en la ecuación (2).

4. Para calcular la proporción de cambio en la expresión del gen de interés en la muestra tratada respecto al control, el valor negativo de $\Delta\Delta C_t$ se transforma en el exponencial de 2 como se muestra en la ecuación (3) (R viene de proporción en inglés: ratio). Se usa el valor 2 porque se asume que la eficiencia de la reacción es máxima y por tanto la cantidad de producto se duplica en cada ciclo.

Los primers utilizados tanto en PCR convencional como PCR en tiempo real se detallan en la tabla siguiente (Tabla 2).

SECUENCIA	
MGCmoRTPCR-F	5' ACTCCCTCATTTGCCATCAC 3'
MGCmoRTPCR-R	5' ATCAGCATTCTCTGCCAAGTG 3'
mGapdhintF	5' TGTTCCTACCCCAATGTGT 3'
mGapdhintR	5' TGTGAGGGAGATGCTCAGTG 3'
EB1huRT-PCR FWD	5' AGGCCCATCTCAACACAGAG 3'
EB1huRT-PCR REV	5' GCCTTCATCTGTGGCATAACA 3'
EB3huRT-PCR FWD	5' TCCAGGCCAAACTAGAGCAT 3'
EB3huRT-PCR REV	5' TCCTCTGTGGAAGCTGCTGTG 3'
MAPRE3AFwd	5' ATTGAGAACCTGAGCCGACA 3'
MAPRE3ARev	5' CCTCTAAAAGCTGCCTGGA 3'
MAPRE3BFwd	5' TGAACGACTCTCTGCAGCTC3'
MAPRE3BRev	5' TGTCCACGTTTCATCCTCTTG 3'

Tabla 2. Primers utilizados en PCR convencional o en tiempo Real. Nombre del primer y susecuencia 5'3'.

2.8 Purificación de productos de PCR

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

2.9 Electroforesis en geles de Agarosa

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

2.10 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN una vez separados en geles de agarosa se utilizó el Quick gel extraction kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se escinde el fragmento de gel conteniendo el ADN y se disuelve usando un buffer de solubilización. El gel disuelto se vuelca en una columna que contiene una membrana de sílica y el ADN se une específicamente a ella en varios pasos de centrifugación. La membrana por último es lavada con un buffer que contiene etanol para remover impurezas y el ADN purificado luego es eluído usando un buffer de elusión o agua.

2.11 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (o endonucleasas de restricción) reconocen secuencias cortas de ADN (4-8pb) y cortan ADN doble hebra en sitios específicos dentro o adyacente a la secuencia de reconocimiento.

Digerimos ADN agregando las enzimas de restricción, el buffer correspondiente, BSA (en caso de ser necesario) y agua para completar el volumen final deseado. Se incubaron las reacciones a la temperatura óptima indicada por las enzimas (37°C) durante toda la noche o por 2 horas dependiendo del caso.

2.12 Ligación en vectores

Los insertos se ligaron en los vectores correspondientes utilizando la T4 DNA ligasa y el buffer correspondiente. Esta enzima (producto del gen 30 del bacteriófago T4 fue purificada a partir de una cepa de *E. coli* portadora de un plásmido hiperproductor de dicha proteína)

cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosfato y uno 3'OH en una molécula de ADN de doble cadena, tanto si los extremos son romos como cohesivos. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche.

2.13. Clonado en vectores de expresión

El clonado en los vectores de expresión se realizó amplificando los marcos abiertos de lectura (ORFs) de los distintos genes a partir de ADNc y por medio de una PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA polymerase, Stratagene) junto con primers conteniendo la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas. Se corrió los productos de PCR en geles de Agarosa y luego se los purificó utilizando el Quick gel extraction kit (Invitrogen). Los vectores de destino y los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas y luego purificados utilizando el kit PureLink PCR Purification (Invitrogen). Posteriormente se ligó vector e inserto como se describe en 2.11 y finalmente las ligaciones fueron transformadas en bacterias *E. coli* competentes (como se detalla en 2.2.2). Para confirmar la presencia del inserto en el vector, se aislaron los plásmidos de las bacterias según se describe en 2.2.3, se digirieron con las enzimas de restricción utilizadas y se corrieron los productos de digestión en un gel de Agarosa. Los clones que resultaron positivos fueron analizados por secuenciación.

2.14. Modelo *in vivo*: pez cebra (*Danio rerio*)

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.

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 (80). *Danio rerio* es un pez teleosteo, 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. 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. 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) (81).

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 146 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_rerio/zmp).

Inhibición de la expresión de genes en embriones de pez cebra

Una de las técnicas más utilizadas para inhibir la expresión de genes en el pez cebra es la microinyección de morfolidos en el vitelo de embriones tempranos (estadio de 1 a 8 células). Los morfolidos (MO) son oligómeros, análogos químicamente a los ácidos nucleicos, que presentan un anillo de morfolido en lugar de ribosa, y las bases están unidas entre sí por enlaces fosforodiamidato. Estas modificaciones hacen que estos oligos sean estables ya que no son reconocidos por ninguna endonucleasa. Sin embargo, sí hibridan con alta afinidad a secuencias nucleotídicas complementarias de simple cadena (por ejemplo los ARNm correspondientes) y de esta forma interactúan con ellas. Existen dos tipos de morfolidos que se diferencian en su modo de acción: los MO atg o bloqueadores de la traducción que se unen a secuencias complementarias dentro de la región 5' UTR del ARNm

bloqueando de este modo el sitio donde se unen los ribosomas y el comienzo de la traducción, y los MO splice que se unen por complementariedad a las secuencias de unión exón-intrón alterando el correcto procesamiento de los ARNm.

2.14.1 Inhibición de la expresión de genes en embriones de pez cebra

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 1nl 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 minutos previamente a ser utilizadas.

Loa morfolinos utilizados se detallan a continuación:

MOstd: CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

MOspl *ccdc28b*: TTTAGAAGACGCACACAAACCTTGT

MOspl *mapre3a*: CAGGCAGTTGGACCCACCTGAACAT

MOspl *mapre3b*: TACTGAAGACTCGTGACGCACCTGA

Mospl *k1c1*: TCCTGAACAGTGGTGCCTTACCTGT

2.14.2 Sobre-expresión de genes en embriones de pez cebra

La sobre-expresión de *Ccdc28b* en los embriones de pez cebra se realizó por medio de la inyección de ARNm en el vitelo.

2.14.3 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 (≤ 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 (<12000 g). Se remueve y descarta el SN. Se lava el pellet con 50 µl de EtOH 75%. Se vortexea y se centrifuga durante 5 min a 4°C (<7500 g). Se deja secar el pellet durante 5 min. El pellet se disuelve en 10 µl 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.

2.14.4 Inmunofluorescencia en embriones de pez cebra

Se utilizaron embriones que fueron incubados con PTU 0.003% (1-phenyl 2-thiourea) 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 y 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 Proteínasa K durante 20 min (embriones 24 hpf) o 30 min (embriones ≥ 48 hpf). Se detuvo la reacción por fijación con PFA 4% durante 20 min. Luego se lavaron dos veces con PBS-Triton (1%) durante 5 min y fueron bloqueados con 5% de suero fetal bovino (SFB) durante 1 hora. Se incubó con los anticuerpos primarios en PBS-T (1%) + 2% SFB, ON a 4°C. Al día siguiente se realizaron cuatro lavados con PBS-T (1%) de 10 min cada uno y luego se incubó con los anticuerpos secundarios apropiados y un marcador nuclear, 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 (Glicerol 75%, Tris 0.1 M pH8) para su observación por microscopía confocal.

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

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

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

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG1 (γ1) (Invitrogen #A21121)

Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse IgG2b (γ2b) (Invitrogen #A21144)

3.RESULTADOS

3.1 Análisis de la localización sub-celular de CCDC28B

Un parámetro importante para entender la función de CCDC28B es establecer su patrón de localización (objetivo que formó parte de la tesis de doctorado de Magdalena Cárdenas-Rodríguez) y evaluar si la localización de la proteína es dinámica y de ser así, identificar factores que influyan en la misma, objetivo que nos planteamos al comienzo de este proyecto de tesis.

Como ya mencionamos previamente, CCDC28B fue reportada originalmente como una proteína centrosómica. Sin embargo, en el laboratorio hemos generado varios anticuerpos contra CCDC28B, y los patrones de localización que hemos obtenido no se restringen a este organelo ya que observamos señal tanto en el núcleo celular como en el citoplasma donde se ve una señal difusa y acúmulos asociados a la membrana plasmática. Lamentablemente la calidad de estos anticuerpos nos ha dificultado y retrasado significativamente en este objetivo ya que si bien reconocen CCDC28B en Western Blot, también reaccionan inespecíficamente con otras proteínas (Fig.5). Esto ha generado una gran dificultad para poder por un lado definir con exactitud el patrón de localización “normal” de la proteína y por otro estudiar cambios relacionados a condiciones de cultivo o para determinar la relación biológica de CCDC28B y sus interactores. Dicho esto, algunos resultados que se han obtenido en el laboratorio y en el marco de esta tesis resultan sumamente interesantes, a la vez que podrían brindar información valiosa para entender la relación funcional de CCDC28B con la regulación de la ciliogénesis y la actividad de mTORC2. Por lo tanto, creemos que ameritan ser presentados y discutidos en este trabajo.

3.1.1 Tratamiento con Colcemida

A pesar de no poder determinar completamente la especificidad de nuestro anticuerpo anti-CCDC28B, por distintos motivos nos resultó interesante la posibilidad de que esta proteína se localice tanto en el núcleo como en forma de acúmulos en asociación o proximidad a la membrana plasmática. Por ejemplo, se ha visto que la localización de distintos componentes de la vía mTOR es regulada, parámetro que afecta la actividad de la vía y en particular por ejemplo, la fosforilación de AKT por parte de mTORC2 se daría en proximidad a la membrana plasmática (37).

Nos enfocamos entonces en tratar de entender que es lo que esta regulando la localización de CCDC28B, centrándonos en particular en la localización de CCDC28B en forma de acúmulos próximos a la membrana plasmática. Cabe destacar que CCDC28B fue identificada inicialmente como un interactor de BBS4 y se sabe que BBS4 es transportada por microtúbulos e interactúa con dineínas (82). A su vez, dos de los interactores que identificamos para CCDC28B mediante un ensayo doble híbrido son proteínas asociadas a los microtúbulos y al transporte basado en ellos (EB3 y KLC1). Por estos motivos pensamos que el esqueleto de microtúbulos podría estar jugando un rol en la localización de CCDC28B. Para testear esta hipótesis tratamos células HeLa crecidas sobre cubreobjetos en placas de seis pocillos con Colcemida (un inhibidor de la polimerización de microtúbulos) para afectar el esqueleto de microtúbulos y analizar los efectos en la localización de CCDC28B por inmunofluorescencia. Tratamos las células con 0.24µg/ml de Colcemida durante 30min., 1h. y 1h.30min. A los 30min. de tratamiento el efecto de la droga sobre el esqueleto de microtúbulos fue leve (Fig. 6), pero igualmente se evidenció una disminución en la cantidad de acúmulos de CCDC28B en la membrana y mayor dispersión de éstos en el citoplasma. Este efecto fue aún más evidente con tiempos de tratamiento con Colcemida más extensos: a la hora u hora y media el esqueleto de microtúbulos se encuentra significativamente afectado y ya no se visualizaron acúmulos de CCDC28B en la periferia de la célula, observándose solo una tinción citoplasmática homogénea (Fig.6).

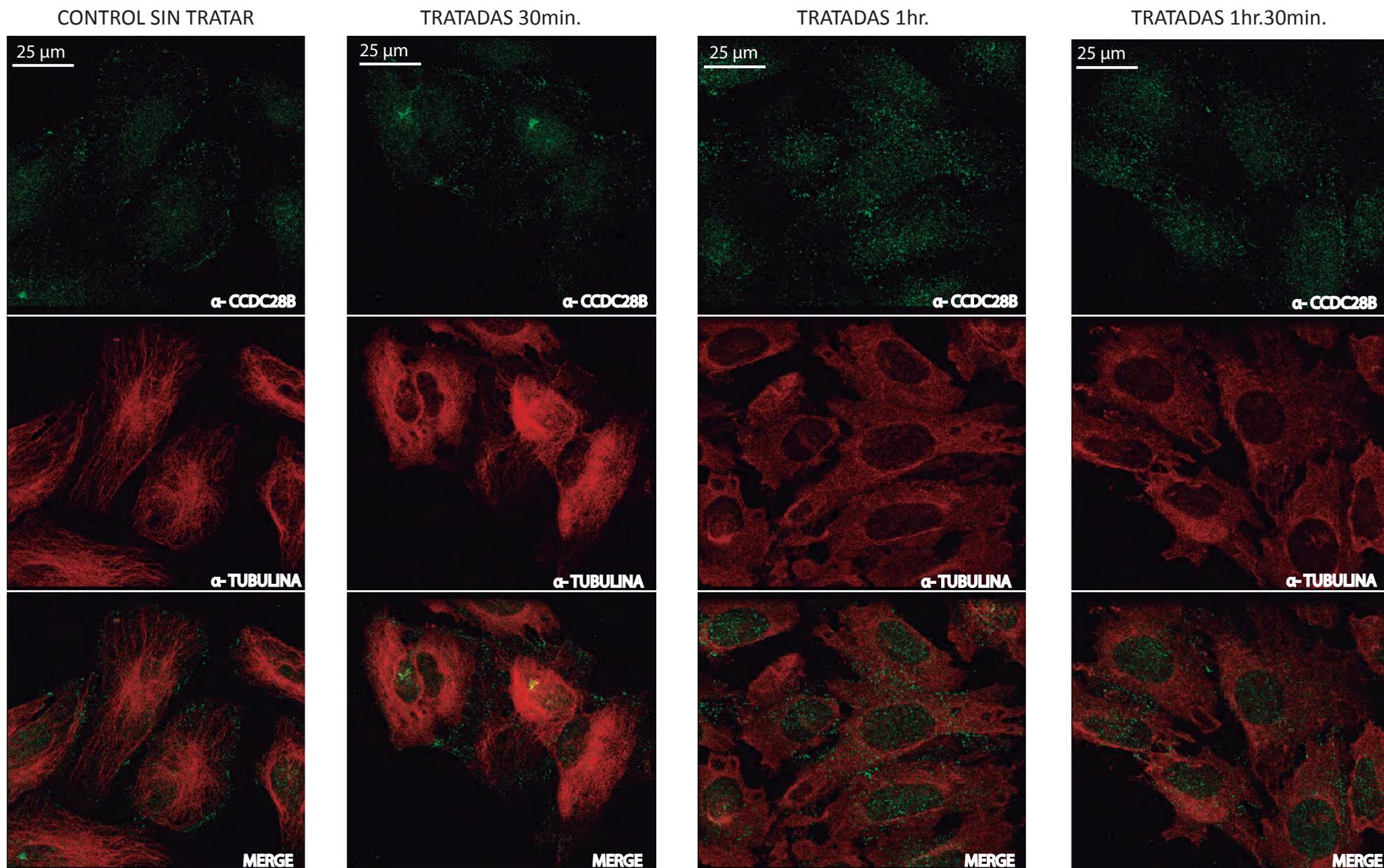


Fig. 6. Inmunomarcado con anticuerpo anti-CCDC28B en HeLa tratadas con Colcemida. Se trató células HeLa con 0,24 µg/ml de Colcemida por 30 min., 1 hr y 1 hr. 30min y se analizó la localización celular de CCDC28B por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-CCDC28B (verde) y anti-tubulina (rojo) para visualizar el esqueleto de microtúbulos y verificar que la Colcemida los estuviera afectando.

3.1.2 Generación de líneas estables.

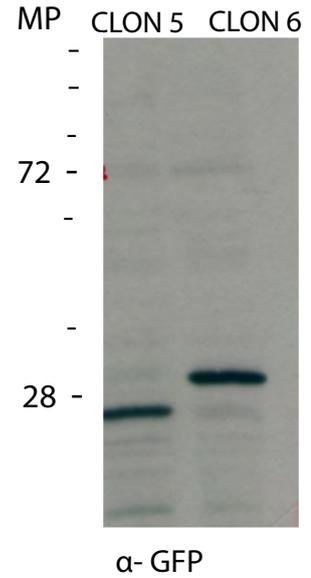
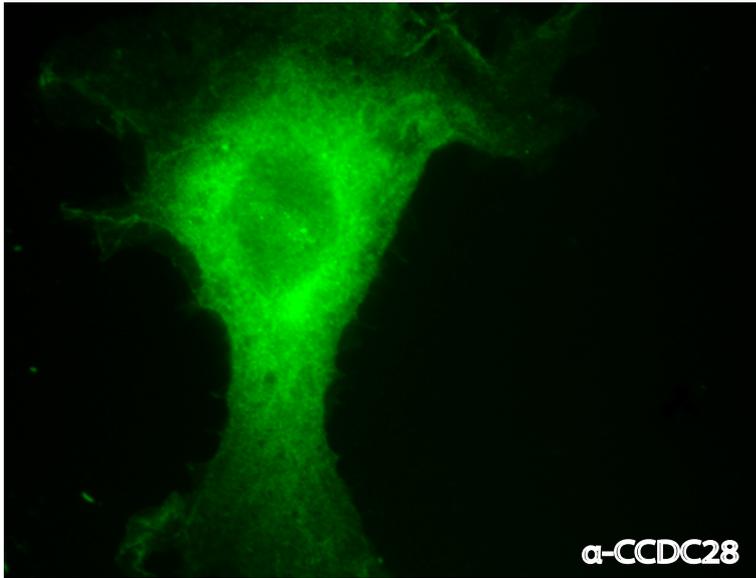
En paralelo a la puesta a punto de nuestros anticuerpos en lo cual seguimos trabajando, pensamos que expresar CCDC28B fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) sería una herramienta sumamente útil, en especial si se tiene en cuenta que la localización de CCDC28B parece ser dinámica. Esperábamos que la presencia de GFP, aunque se trate de una proteína grande, no interfiriera con la localización normal de CCDC28B y nos permitiera evaluar la localización de esta proteína así como observar en tiempo real los cambios en su localización sub-celular bajo diferentes estímulos.

Para esto realizamos dos construcciones diferentes utilizando el vector pEGFP-N2. Primero generamos una construcción que nos permitía expresar CCDC28B fusionada al extremo N-terminal de la proteína GFP. Transfectamos transientemente células NIH3T3 con esta construcción pero no pudimos recapitular la localización que habíamos observado para la proteína endógena. Tampoco pudimos recapitular ninguna localización que pareciera fisiológicamente relevante. Esto pudo deberse a que el vector contiene un promotor fuerte (CMV) y que por tanto, al sobre-expresar la proteína la misma “inunde” la célula. Pensando en esta posibilidad, decidimos utilizar nuestra construcción para realizar una línea estable en células NIH3T3, pero nuevamente no pudimos visualizar una localización específica (Fig.7A izquierda). Cuando verificamos por Western Blot la expresión de la proteína de fusión GFP-CCDC28B comprobamos que la línea expresaba una forma truncada ya que la proteína detectada tenía menor tamaño del esperado (Fig. 7A derecha). Podría ser que la proteína GFP este interviniendo en el normal plegamiento y/o funcionamiento de CCDC28B generando un efecto tóxico por lo cual solo recuperamos aquellos clones que expresan formas truncadas y por tanto posiblemente de función nula. Decidimos entonces realizar una segunda construcción, esta vez colocando un linker de 9 aminoácidos (GLY-GLY-SER X3) entre el extremo C-terminal de CCDC28B y la proteína GFP, razonando que la introducción de este linker podría facilitar el plegamiento de CCDC28B. Lamentablemente esta construcción tampoco mostró un patrón de localización específico cuando se transfectó con ella células de manera transiente (Fig.7B), nuevamente quizás por efecto de la sobre-expresión, por lo cual intentaremos generar una nueva línea estable.

7.A



CCDC28B_NM -GFP



7.B

CCDC28B_NM LINKER-GFP

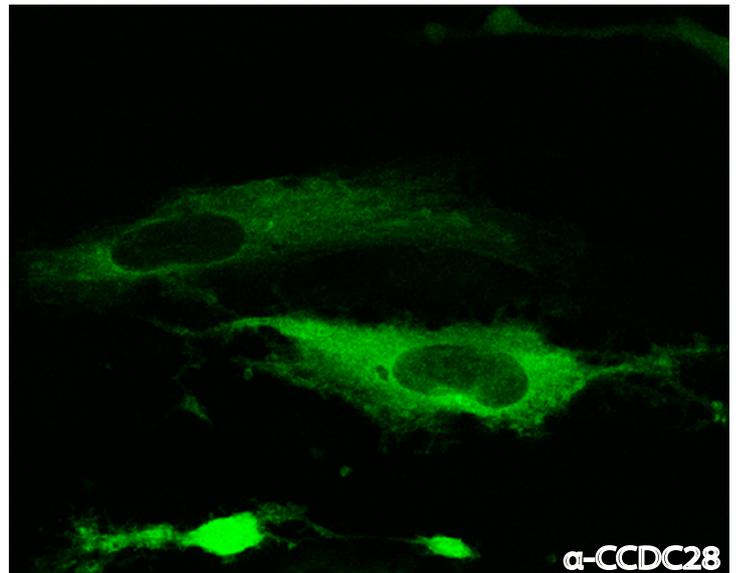
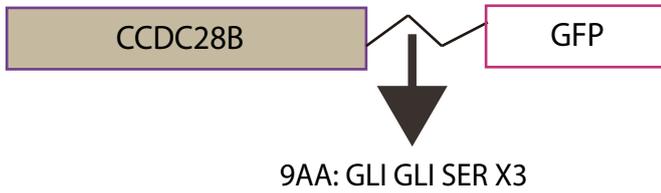


Fig.7. Intentos de generar líneas estables. A. A la izquierda arriba, esquema de la primer construcción realizada que nos permitía expresar GFP fusionada al extremo C-terminal de CCDC28B. A la izquierda abajo, inmunofluorescencia en NIH3T3 de células transfectadas con esta construcción de manera estable donde no se observa ninguna localización específica. A la derecha, Western Blot utilizando un anticuerpo anti- GFP de los clones obtenidos en la generación de la línea estable donde se observa que ambos generan un producto de menor tamaño molecular que el esperado. CCDC28B tiene un peso molecular de 22KDa y GFP de 27 KDaB por lo que el tamaño esperado era de 50KDa aprox. para la proteína de fusión. A la izquierda, esquema de la segunda construcción realizada donde, a diferencia de la construcción anterior, se adicionó un link de 9 AA (GLI GLI SER X3) entre el extremo c-terminal de CCDC28B y la proteína GFP. A la derecha, inmunofluorescencia de células NIH3T3 transfectadas con esta construcción de manera transitoria que tampoco mostró un patrón de localización específico.

En resumen, nuestros resultados en combinación con lo presentado en el trabajo de doctorado de Magdalena Cárdenas-Rodríguez, indican que la localización de CCDC28B no estaría restringida a la región del centrosoma sino que la proteína se localizaría tanto en el núcleo celular como en el citoplasma en estructuras de tipo vesículas que se ubican en proximidad a la membrana plasmática. A su vez, la localización de CCDC28B sería dinámica y dependería de un esqueleto de microtúbulos funcional.

3.2 Análisis de la expresión de *CCDC28B*

3.2.1 Análisis de la expresión en cultivos de baja y alta densidad

En el marco de mi tesina de grado, nos interesamos en analizar que ocurría con la expresión de *CCDC28B* en presencia y ausencia de cilia. Para esto, comenzamos utilizando la línea celular murina NIH3T3 y analizando la expresión de *Ccdc28b* en dos condiciones de cultivo: baja y alta densidad, pensando que estas condiciones podrían corresponderse con ausencia y presencia de cilia respectivamente. Las cilias son estructuras post-mitóticas que están presentes cuando las células se encuentran en G0/G1 y al principio de la fase S mientras que son generalmente reabsorbidas por la célula durante la división celular (3). Las NIH3T3 presentan inhibición por contacto por lo cual un cultivo de alta densidad pensamos que estaría enriquecido en células quiescentes y por tanto ciliadas, en comparación a un cultivo de baja densidad donde esperábamos que la mayoría de las células estuvieran en proliferación y por tanto no presentarían cilias. Resultó interesante que nuestros datos preliminares, obtenidos mediante PCR semi-cuantitativo, indicaron que la expresión de *Ccdc28b* cambiaba en estas dos condiciones, aumentando su expresión cuando el cultivo es de alta densidad.

En el contexto de este trabajo, y para continuar caracterizando la expresión de *CCDC28B*, en primer lugar decidimos confirmar estos resultados preliminares comparando los patrones y niveles de expresión de *Ccdc28b* en las mismas condiciones de cultivo (baja y alta densidad) pero utilizando una tecnología más sensible y precisa como lo es la PCR en tiempo real.

En primer lugar decidimos evaluar si las condiciones de cultivo seleccionadas efectivamente se correlacionaban con presencia-ausencia de cilias. Para esto, crecimos células NIH3T3 sobre cubre-objetos y realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra tubulina acetilada que marca el esqueleto de microtúbulos de las cilias. Tomamos imágenes en el microscopio confocal y utilizando el programa Image J contamos número de células ciliadas en cada condición. Contrario a lo esperado, no encontramos diferencias en el porcentaje de células ciliadas (Fig.8). Pensamos que este resultado podría deberse a que si bien la condición de baja densidad se trata de un cultivo en proliferación, dados los tiempos de las diferentes etapas del ciclo celular, existía la posibilidad de que el cultivo estuviera

enriquecido en células en G1, etapa que es compatible con la presencia de cilias (83). Por lo tanto, estos resultados sugirieron que, de poder confirmar la existencia de cambios en la expresión de *Ccdc28b*, los mismos no estarían directamente relacionados con la presencia de estos organelos sino que responderían a cambios en las condiciones del cultivo.

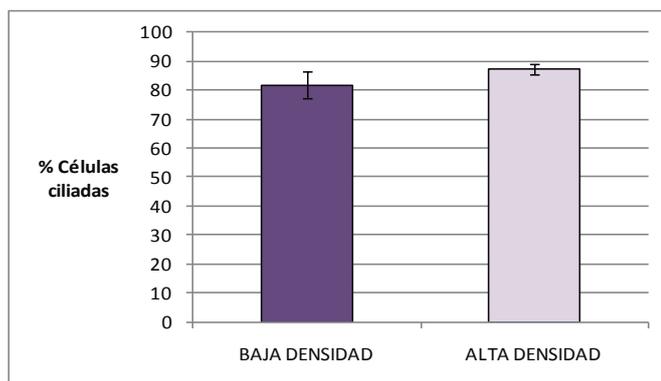


Fig.8. Cuantificación del % de células ciliadas en cultivos de alta y baja densidad. Detectamos cilias por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra tubulina acetilada. Cuantificamos el mismo número de células para cada condición y no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células ciliadas ($81.8\% \pm 4.7$ en cultivos de baja densidad vs $87.5\% \pm 1.9$ en cultivos de alta densidad, $p > 0.05$).

Para evaluar los niveles de expresión de *Ccdc28b* realizamos RT-PCR en tiempo real a partir de ARN extraído de células NIH3T3 crecidas en placas de seis pocillos realizando el experimento por triplicado. Para obtener las condiciones de alta y baja densidad plaqueamos diferentes cantidades de células y sacrificamos los cultivos a las 24h. A partir del ARN generamos ADNc y amplificamos *Ccdc28b* por PCR en tiempo real utilizando primers específicos. Como control amplificamos *Gapdh* debido a que es un gen de expresión constitutiva que no esperábamos presentara diferencias entre las dos condiciones analizadas. Para analizar los resultados obtuvimos los valores de Ct (del inglés cycle threshold) y realizamos la cuantificación relativa de la expresión de *Ccdc28b* entre las condiciones testeadas. Nuevamente observamos un aumento en los niveles de expresión de *Ccdc28b* en la condición de alta densidad en comparación con la de baja (Fig.9A).

Una vez confirmado este resultado nos interesó analizar si los cambios de expresión observados a nivel del ARNm en estas condiciones, se correspondía con cambios en los niveles de la proteína. Para esto repetimos el experimento en las mismas condiciones de cultivo, esta vez extrayendo proteína de células NIH3T3 crecidas en placas de 10cm (por triplicado para cada condición). Una vez hecha la extracción de proteína total, determinamos su concentración, cargamos cantidades iguales de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12% y realizamos un Western Blot utilizando un anticuerpo contra CCDC28B. Nuevamente utilizamos *Gapdh* como control de carga. Los films revelados fueron escaneados para obtener imágenes digitales que posteriormente procedimos a analizar para determinar la intensidad de las bandas mediante un software de análisis de imágenes (Image J). A diferencia de lo observado evaluando niveles de ARNm, nuestros datos mostraron que los niveles de CCDC28B no cambian significativamente entre las condiciones analizadas, aunque si observamos una tendencia a que exista un aumento en la condición de alta densidad (Fig.9B). No observar cambios a nivel de la proteína pudo deberse a que la a que por ejemplo el tiempo transcurrido desde el aumento de la expresión de *Ccdc28b* a nivel de ARNm no fue suficiente para que pudiera observarse un efecto a nivel de proteína.

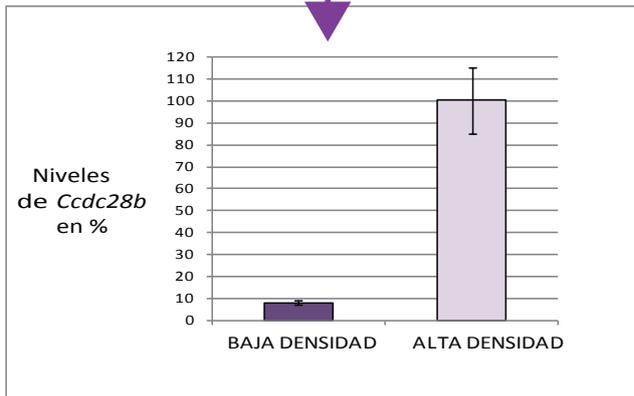
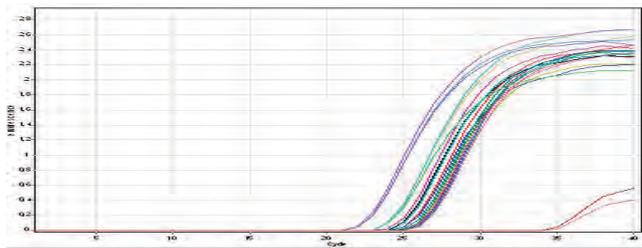
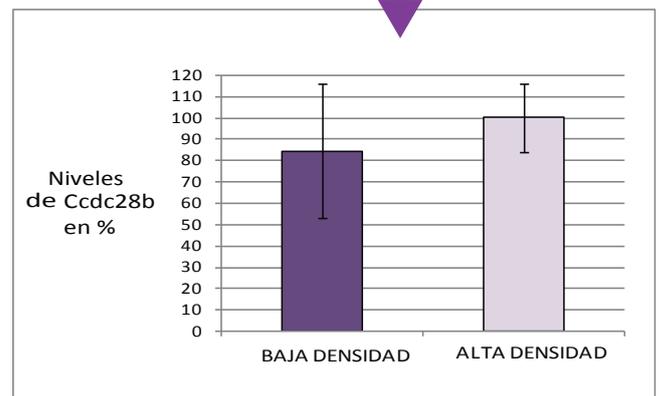
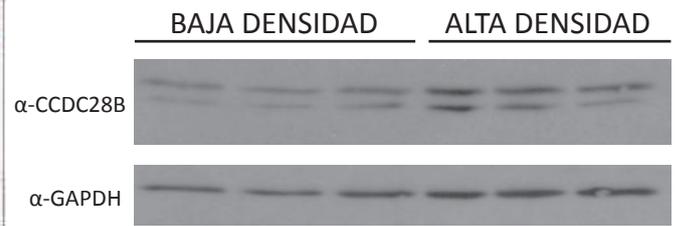
A.**B.**

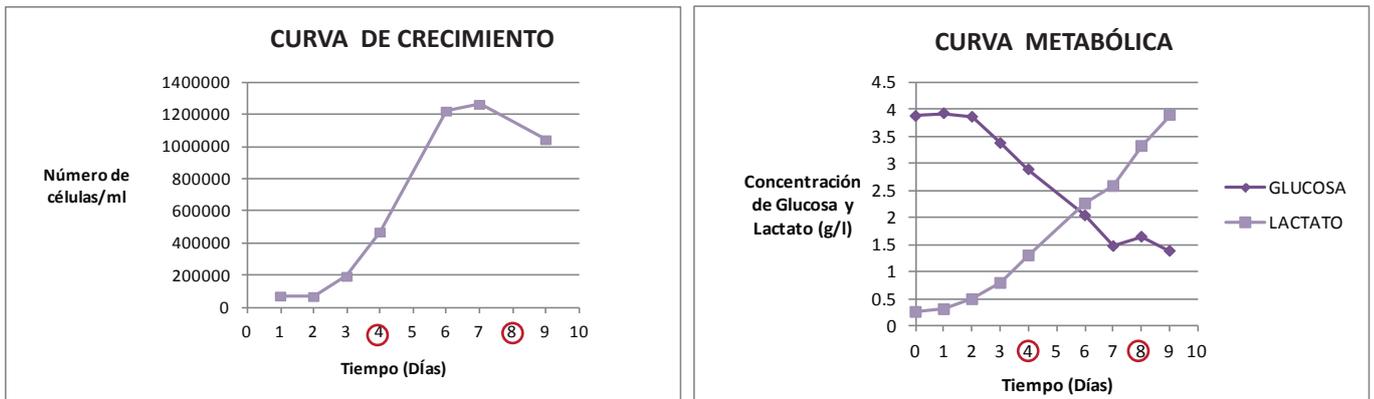
Fig.9. Niveles de CCDC28B en cultivos de alta y baja densidad. A. Cuantificación de la expresión de *Ccdc28b* por RT-PCR en tiempo real. Tomando la expresión de *Ccdc28b* en cultivos de alta densidad como el 100% ($\pm 15\%$), observamos una reducción significativa de la expresión en cultivos de baja densidad ($8\% \pm 1\%$, $p < 0.05$). **B.** Cuantificación de los niveles de *Ccdc28b* por Western Blot no resultaron en una reducción significativa en los cultivos de baja densidad en relación a los de alta ($p > 0.05$).

Teniendo en cuenta esta última posibilidad nos interesó obtener condiciones de alta y baja densidad partiendo en ambos casos del mismo número de células y sacrificando los cultivos a diferentes tiempos (días) post-plaqueo. Para poder definir con mayor exactitud los tiempos a evaluar, y de manera de caracterizar y estandarizar las dos condiciones de cultivo analizadas, realizamos un estudio del crecimiento y del metabolismo de la línea celular NIH3T3 (Fig.10A). De esta manera pudimos basarnos en parámetros metabólicos, además de la confluencia, para elegir dos condiciones de cultivo que representaran efectivamente fases de crecimiento diferentes. Para construir la curva metabólica y de crecimiento, plaqueamos el mismo número de células en cada pocillo de una placa de 24. Posteriormente, levantamos tres pocillos por día (triplicados), durante nueve días, y en cada caso evaluamos el número de células y la concentración de glucosa y lactato del medio (Fig. 7A). Como se puede observar comparando las dos curvas, el medio de los cultivos en proliferación presentó mayor concentración de glucosa comparado con el lactato y esta diferencia fue disminuyendo con los días en cultivo hasta revertirse cuando las células alcanzaron la fase estacionaria en la curva de crecimiento (Fig. 10A). Basándonos en estos datos, elegimos el día 4 y 8 para evaluar y comparar la expresión de CCDC28B por ser condiciones metabólicas y de crecimiento marcadamente diferentes: a los 4 días el cultivo es de baja densidad y se encuentra en plena fase de crecimiento con niveles de glucosa por encima de los niveles de lactato mientras que a los 8 días el cultivo es de alta densidad, se encuentra en fase estacionaria de crecimiento y presenta niveles de glucosa muy por debajo de los niveles de lactato.

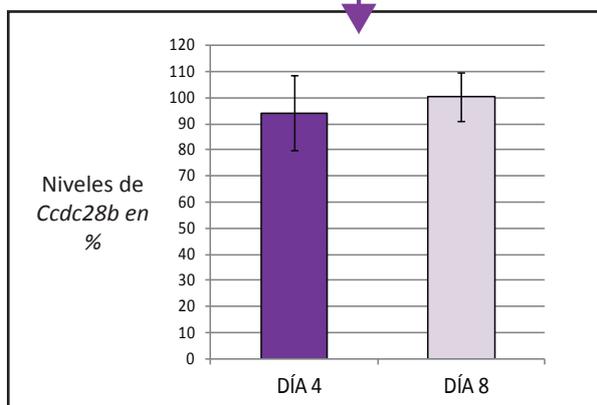
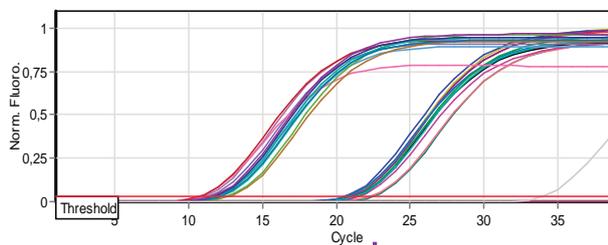
En esas dos condiciones evaluamos la expresión de *Ccdc28b* por RT-PCR en tiempo real y los niveles de proteína por Western Blot (Fig.10B). Dado que en los experimentos anteriores observamos un leve aumento en la expresión de *Gapdh* en la condición de alta densidad (Fig.10B), en esta oportunidad decidimos realizar el RT-PCR en tiempo real utilizamos los mismos primers específicos antes mencionados y *Ciclophilina* (otro gen de expresión constitutiva) como control. A su vez, para el Western Blot utilizamos el mismo anticuerpo contra CCDC28B y Tubulina como control de carga. En esta oportunidad, si bien no observamos diferencias significativas en la expresión del ARNm de *Ccdc28b* entre ambas condiciones (Fig.10B1), los niveles de proteína aumentaron en el cultivo de alta densidad de 8 días (Fig.10B2). Creemos que hay distintas posibilidades para explicar y compatibilizar las diferencias observadas en los resultados obtenidos con cada diseño experimental (ver

discusión), por lo que nuestros datos indicaron que los niveles de CCDC28B cambian en distintas condiciones de cultivo o quizás en diferentes etapas del ciclo celular.

A.



B.1.



B.2.

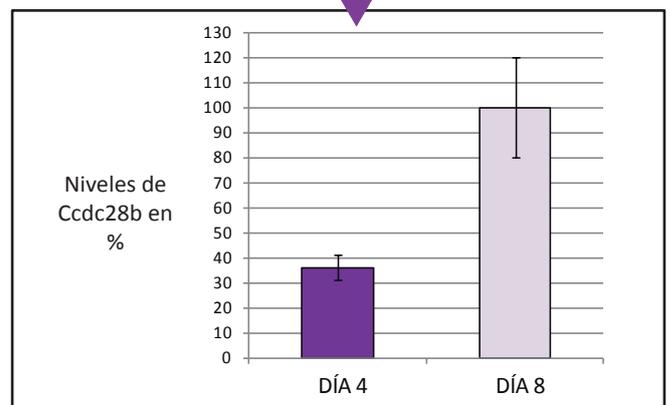
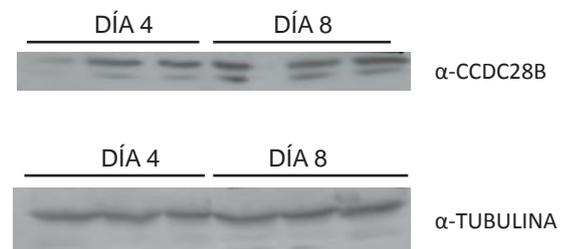


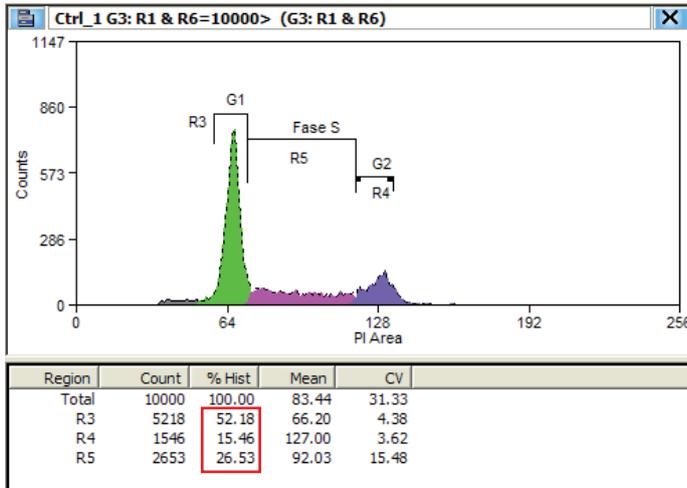
Fig.10. Niveles de *Ccdc28b* y niveles de *Ccdc28b* en cultivos con diferentes características metabólicas. A. Caracterización metabólica de la línea celular NIH3T3. A la izquierda, curva de crecimiento. A la derecha, curva metabólica donde se muestran los cambios en la concentración de Glucosa y Lactato en función del tiempo. Se eligieron para evaluar la expresión de CCDC28B las condición de 4 y 8 días por ser muy diferentes. A los 4 días las células se encuentran a la mitad de la fase de crecimiento de la curva exponencial (600 mil células/ml aprox.) y en el momento de la curva metabólica donde los niveles de glucosa se encuentran por encima de los niveles de Lactato (Glucosa: 2.96 g/l, Lactato: 2.3 g/l). A los 8 días las células se encuentran en la fase estacionaria de la curva de crecimiento (1.200.000 células/ml aprox.) y en el momento metabólico donde los valores de Lactato son muy superiores a los de Glucosa (GLucosa: 1 g/l, Lactato: 4.1 g/l). B.1. Cuantificación de la expresión de *Ccdc28b* a los 4 y 8 días por RT-PCR en Tiempo Real donde no se observan diferencias significativas entre ambas condiciones. B.2. Cuantificación de los niveles de proteína en estas dos mismas condiciones analizados mediante Western Blot, donde se observa una diferencia significativa.

3.2.2 Análisis de la expresión en diferentes etapas del ciclo celular

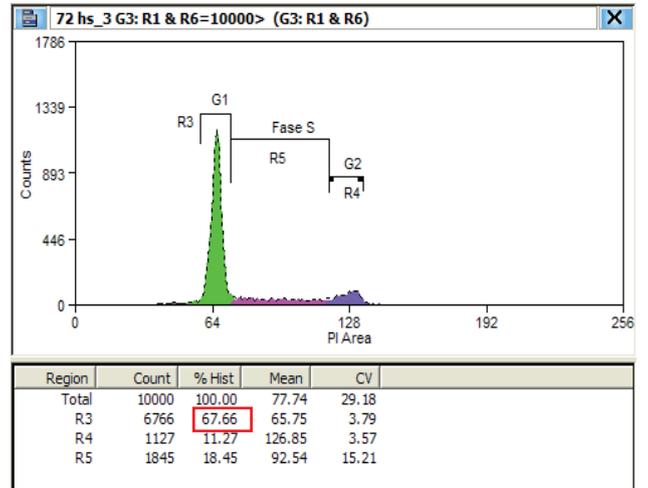
El conjunto de nuestros resultados (RT-PCR, Western, e inmunofluorecencia para evaluar presencia de cilias) demostró que los niveles de CCDC28B cambian en cultivos de alta y baja densidad seguramente en respuesta a cambios asociados con las condiciones de cultivo y/o el ciclo celular. Para testear esta última posibilidad evaluamos los niveles de ARNm de *Ccdc28b* utilizando cultivos de NIH3T3 sincronizados. Crecimos células NIH3T3 en nueve placas de 10cm con DMEM y SFB. A tres de estos cultivos se los privó de SFB por 72 horas para enriquecerlos en células en fase G0/G1. A los seis cultivos restantes se los sincronizó mediante un doble bloqueo de timidina y posteriormente se obtuvieron tres placas de células enriquecidas en fase S y tres placas enriquecidas en células en G2, levantando células a las tres horas y siete horas de liberado el bloqueo respectivamente. Parte de estas muestras fueron analizadas por citometría de flujo donde pudimos verificar el enriquecimiento de células en las diferentes fases del ciclo (Fig.11A), y la otra parte fue procesada para extracción de ARN, producción de ADNc y RT-PCR en tiempo real con primers específicos para amplificar *Ccdc28b* y *Gapdh* como control. La cuantificación relativa mostró una disminución significativa en la expresión de *CCDC28B* en las fases S y G2 respecto a la fase G0/G1 (tomada como el 100%) (Fig.11B).

A.

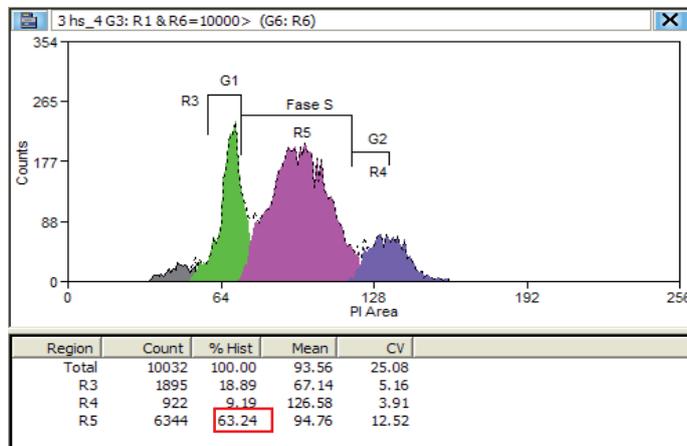
Cultivo sin sincronizar



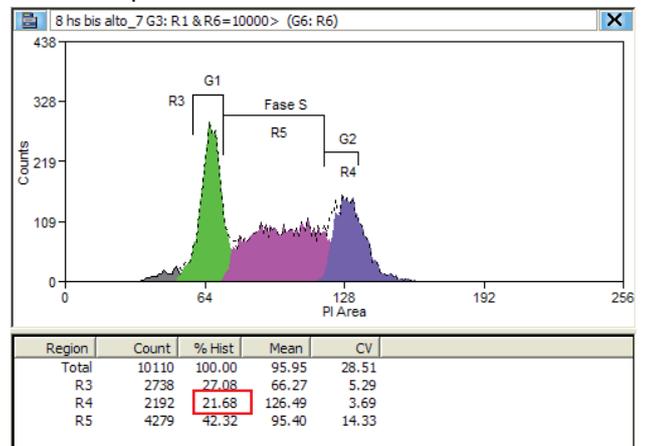
Deprivación de suero 72 hs → G0/G1



Doble bloqueo con Timidina 3hs → S



Doble bloqueo con Timidina 8hs → G2



B.

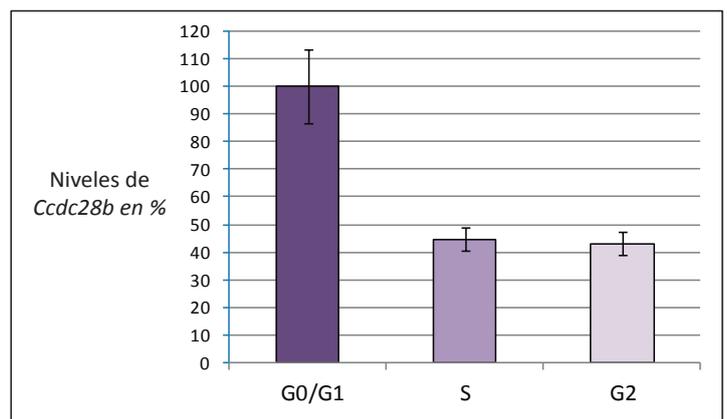
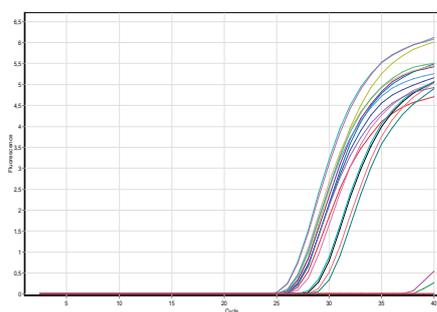


Fig.11. Niveles de *Ccdc28b* en diferentes etapas del ciclo celular. Células de la línea NIH3T3 fueron sincronizadas utilizando el método de doble bloqueo con Timidina. **A.** Análisis por citometría de flujo confirmando el enriquecimiento en cada fase del ciclo. **B.** Cuantificación de la expresión de *Ccdc28b* analizada por RT-PCR en Tiempo Real muestra un decrecimiento significativo de sus niveles de expresión en la fase S y G2 en relación a la fase G0/G1 que se tomó como el 100% (45% ± 4.16% en S, 43% ± 4.08% en G2 vs 100% ± 13.24% en G0/G1, $p < 0.05$).

3.2.3 Análisis de la expresión en ausencia y presencia de cilia

Si bien las condiciones de cultivo previamente utilizadas no se correspondieron con ausencia/presencia de cilia, no podíamos descartar la posibilidad de que estos organelos participaran al menos indirectamente en la regulación de *CCDC28B*, por ejemplo mediante la transducción de alguna vía de señalización. A su vez, y dado el reciente rol que nuestro laboratorio reportó de esta proteína en ciliogénesis (32), nos interesaba analizar el impacto directo de la presencia de la cilia en la expresión de *CCDC28B*.

Al momento de realizar estos experimentos, no contábamos con un sistema de ARN de interferencia para depletar cilia en células murinas como las NIH3T3 y por este motivo decidimos utilizar un sistema lentiviral que se había puesto a punto en el laboratorio para depletar cilia en células humanas WI-38. El sistema se basaba en la transducción de hairpins diseñados contra dos genes involucrados en el transporte intraflagelar y por tanto necesarios para la formación y mantenimiento de las cilia: *IFT88* y *KIF3a*. En condiciones control y en ausencia de cilia extrajimos el ARN a partir del cual produjimos ADNc y evaluamos los niveles de *CCDC28B* por PCR en tiempo real utilizando primers específicos para amplificar *CCDC28B* y *GAPDH* como control. Con los valores de Ct obtenidos realizamos la cuantificación relativa de la expresión de *CCDC28B*, no encontrando diferencias significativas entre ausencia y presencia de cilia (Fig.12).

En conjunto por tanto, los resultados obtenidos en esta primera parte de la tesis nos permitieron mostrar que la expresión de CCDC28B cambiaría en diferentes condiciones de cultivo y etapas del ciclo celular independientemente de la presencia-ausencia de cilia.

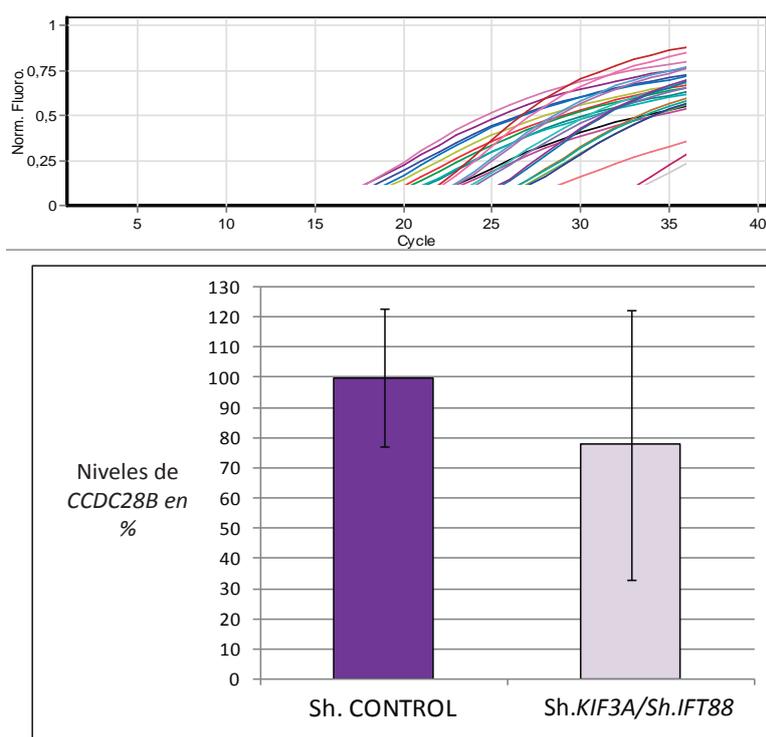


Fig.12. Niveles de *CCDC28B* en ausencia y presencia de cilia. Cuantificación de la expresión de *CCDC28B* por RT-PCR en tiempo real en células de la línea Wi38 transducidas con short hairpin control o co-transducidas con short hairpin *KIF3A* e *IFT88*. La diferencia en expresión observada entre ambas condiciones no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

3.3. Confirmación y caracterización de interactores de CCDC28B

3.3.1 Confirmación de la interacción de CCDC28B con EB3 y KLC1 en células de mamífero

Como mencionamos previamente, en el marco de mi tesina de grado realizamos un ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando CCDC28B_NM como carnada. A partir de este ensayo identificamos como potenciales interactores (entre otros) dos proteínas asociadas a la red de microtúbulos que nos resultaron de sumo interés pensando en su posible relevancia para entender la función de CCDC28B: microtubule end binding protein 3 (EB3) y Kinesin light chain 1 (KLC1). En esta tesis nos centramos en confirmar y comenzar a caracterizar funcionalmente estas interacciones.

Como primer paso, y debido a que la interacción de estas proteínas con CCDC28B_NM fue detectada en levaduras, confirmamos que las interacciones CCDC28B-EB3 y CCDC28B-KLC1 se recapitularan en células de mamífero. Para esto realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en la línea celular humana HEK293-FT. Ya que no contábamos con anticuerpos específicos para las tres proteínas, clonamos los marcos abiertos de lectura (ORF por "open reading frames") correspondientes a los interactores y CCDC28B en los vectores de expresión de mamíferos pCMV-Myc y pCMV-HA respectivamente. De esta manera pudimos expresar las diferentes proteínas de interés fusionadas a "tags" para los que sí contábamos con anticuerpos comerciales (anti-Myc y anti-HA, Sigma). Con estas construcciones transfectamos células HEK293-FT, obtuvimos lisados celulares 48 horas post-transfección, y realizamos inmunoprecipitaciones utilizando el anticuerpo anti-Myc (para inmunoprecipitar Myc-EB3 o Myc-KLC1). Luego por Western Blot, evaluamos la presencia de CCDC28B utilizando el anticuerpo anti-HA. Nuestros datos mostraron que HA-CCDC28B solo es detectada en los inmunoprecipitados cuando es co-expresada con los interactores fusionados al epítipo Myc pero no el epítipo solo (Myc-EV; Fig. 13). Por lo tanto, nuestros datos indicaron que CCDC28B es capaz de interactuar físicamente tanto con EB3 como KLC1 en células de mamíferos.

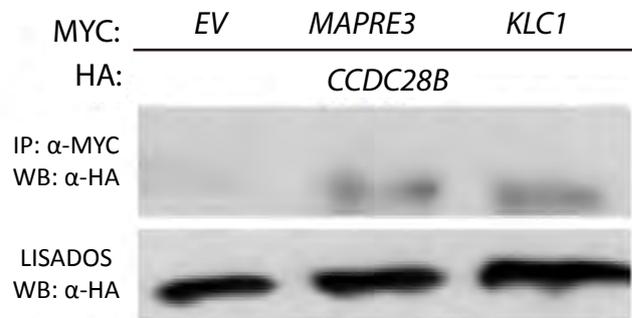


Fig.13. Co-inmunoprecipitaciones. Co-transfectamos transitoriamente Hek293FT con Myc *EV*, Myc *MAPRE3* o *KLC1* y HA *CCDC28B* y realizamos ensayos de inmunoprecipitación con lisados de proteínas de estas células utilizando anticuerpos monoclonales contra Myc. Luego analizamos la presencia de HA-*CCDC28B* por Western Blot utilizando un anticuerpo anti HA.

Una vez confirmadas las interacciones, decidimos estudiar su relevancia funcional, tanto en células en cultivo como *in vivo* en el pez cebra.

3.3.2 Caracterización de las interacciones en células en cultivo

Rol de EB3 y KLC1 en la localización de CCDC28B

Los resultados obtenidos mediante ensayos de inmunofluorescencia (sección 3.2) indicaron que CCDC28B se localizaría tanto en el núcleo celular como en acúmulos (vesículas) asociados a la membrana plasmática. A su vez, mostramos que esta localización periférica depende del esqueleto de microtúbulos ya que se pierde después de que las células son tratadas con colcemida. Dado que tanto EB3 como KLC1 son proteínas que han sido relacionadas funcionalmente con el esqueleto de microtúbulos, pensamos que una posibilidad era que EB3 y/o KLC1 cumplieran un rol en el transporte de CCDC28B y por tanto pudieran mediar en su localización. La estrategia utilizada para estudiar esta posibilidad fue disminuir la expresión de los interactores mediante ARNi y analizar el efecto en la localización de CCDC28B por inmunofluorescencia. En el caso de EB3, se ha reportado cierto grado de redundancia funcional con EB1 (47), por lo que decidimos incluir también este gen en nuestro análisis.

Como herramienta para disminuir la expresión génica de nuestros genes de interés se utilizó la tecnología Stealths RNAiTM siRNA (Invitrogen), debido a que utiliza oligos doble cadena de ARN modificados químicamente que no solo presentan alta especificidad sino que también son más estables en suero y medio de cultivo, transfectan con alta eficiencia, y a su vez son menos tóxicos para las células en comparación con los siARN convencionales.

En primer lugar verificamos la funcionalidad de los Stealths de *MAPRE3*, *MAPRE1* y *KLC1*. Para probar los Stealths de *MAPRE3* y *MAPRE1* transfectamos células HEK293 por triplicado y evaluamos los niveles de ARNm de los genes blanco correspondientes por RT-PCR en tiempo real donde pudimos observar una disminución significativa con respecto a células transfectadas con un Stealth control (Fig.14A). Para probar el Stealth de *KLC1* analizamos la bajada en los niveles de la proteína por Western Blot. No disponíamos de un anticuerpo específico por lo que decidimos utilizar nuestra construcción en el vector pMyc que expresa esta proteína fusionada al epítipo Myc para el cual si contábamos con un anticuerpo. Co-transfectamos dos líneas celulares humanas hTERT-RPE y HEK293 con pMYC-*KLC1* y S.CTRL o

S.*KLC1*, extrajimos proteínas, cuantificamos los lisados para cargar igual cantidad de proteína de cada condición y realizamos el Western Blot utilizando un anticuerpo anti Myc para detectar KLC1 fusionada a este tag. Verificamos que nuestro Stealth era funcional ya que para ambas líneas observamos una disminución marcada en los niveles de KLC1 en las células transfectadas con el S. *KLC1* (Fig.14B).

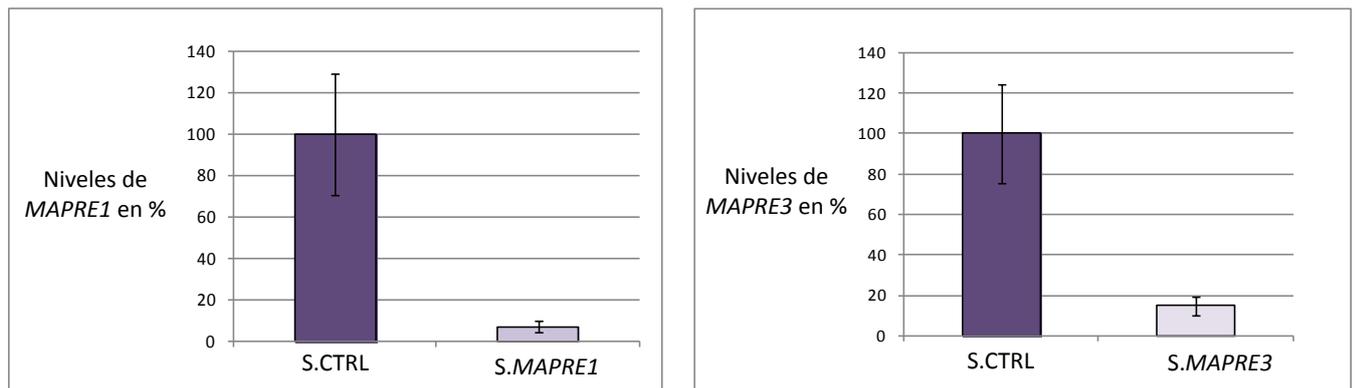
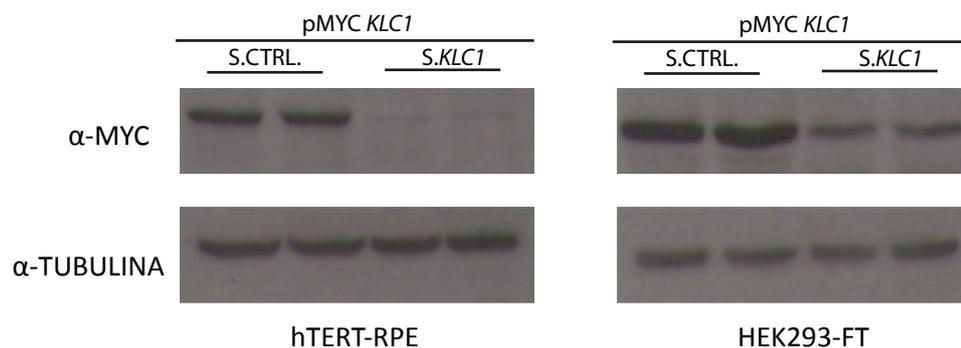
A.**B.**

Fig.14. Prueba de la eficiencia de los Stealths de *MAPRE3*, *MAPRE1* y *KLC1*. **A.** Transfectamos células de la línea HEK-FT con los Stealths de *MAPRE1* y *MAPRE3*. A las 48 horas post transfección levantamos las células, preparamos ARN y cDNA y realizamos PCR en Tiempo Real con primers específicos para amplificar *MAPRE1* o *MAPRE3*. Tanto en las células transfectadas con el S.*MAPRE1* como en las transfectadas con el S.*MAPRE3* se observa una reducción significativa en los niveles de ARNm comparado con las células transfectadas con el S.CTRL tomadas como el 100% (se reduce a $14\% \pm 4.7\%$ con el S.*MAPRE3* y $7.1\% \pm 3.0$ con el S.*MAPRE1*, $p < 0.05$). **B.** Transfectamos células de la línea hTERT-RPE y HEK293-FT con pMYC *KLC1* y S.CTRL. o S.*KLC1*, extrajimos proteínas y realizamos Western Blot con un anticuerpo anti-MYC y anti-Tubulina como control de carga. En ambas líneas observamos que el Stealth de *KLC1* funciona eficientemente ya que se observa una reducción en los niveles de *KLC1*.

Una vez confirmada la funcionalidad de nuestros oligos, transfectamos de manera transiente células HeLa con Stealths para *MAPRE3*, *MAPRE1*, tanto en forma individual como juntos, o *KLC1*, y analizamos por inmunofluorescencia (utilizando un microscopio de Epifluorescencia) la localización de CCDC28B (Fig.15). Si bien la variabilidad en la localización de CCDC28B observada entre distintas células en condiciones control dificulta la cuantificación de los resultados, algunas de las observaciones que pudimos realizar es que las células transfectadas con el Stealth *MAPRE3* y el Stealth *KLC1* mostraron mayor intensidad de señal dentro del núcleo. A su vez, los acúmulos, que en las células tratadas con el Stealth control se encuentran principalmente en la periferia de la célula, aparecen dispersos en el citoplasma (Fig. 15A y 15B). Estas diferencias resultaron menos evidentes en las células transfectadas con el Stealth *MAPRE1* sugiriendo que EB1 no jugaría un rol importante en este proceso. A su vez, tampoco observamos un efecto en células co-transfectadas con Stealth *MAPRE1* y *MAPRE3*, probablemente porque al mantener la cantidad total de Stealth fija transfectamos menos cantidad del Stealth *MAPRE3*. En suma, estos resultados son potencialmente interesantes ya que indican que tanto EB3 como KLC1 podrían estar participando en regular la localización subcelular de CCDC28B, ya sea en lo que respecta a la localización nuclear como a la llegada de CCDC28B a la membrana plasmática. Para confirmar esta posibilidad sin embargo, será fundamental poder cuantificar los cambios observados, siendo una de las principales dificultades la significativa heterogeneidad en el patrón de localización de CCDC28B en condiciones control.

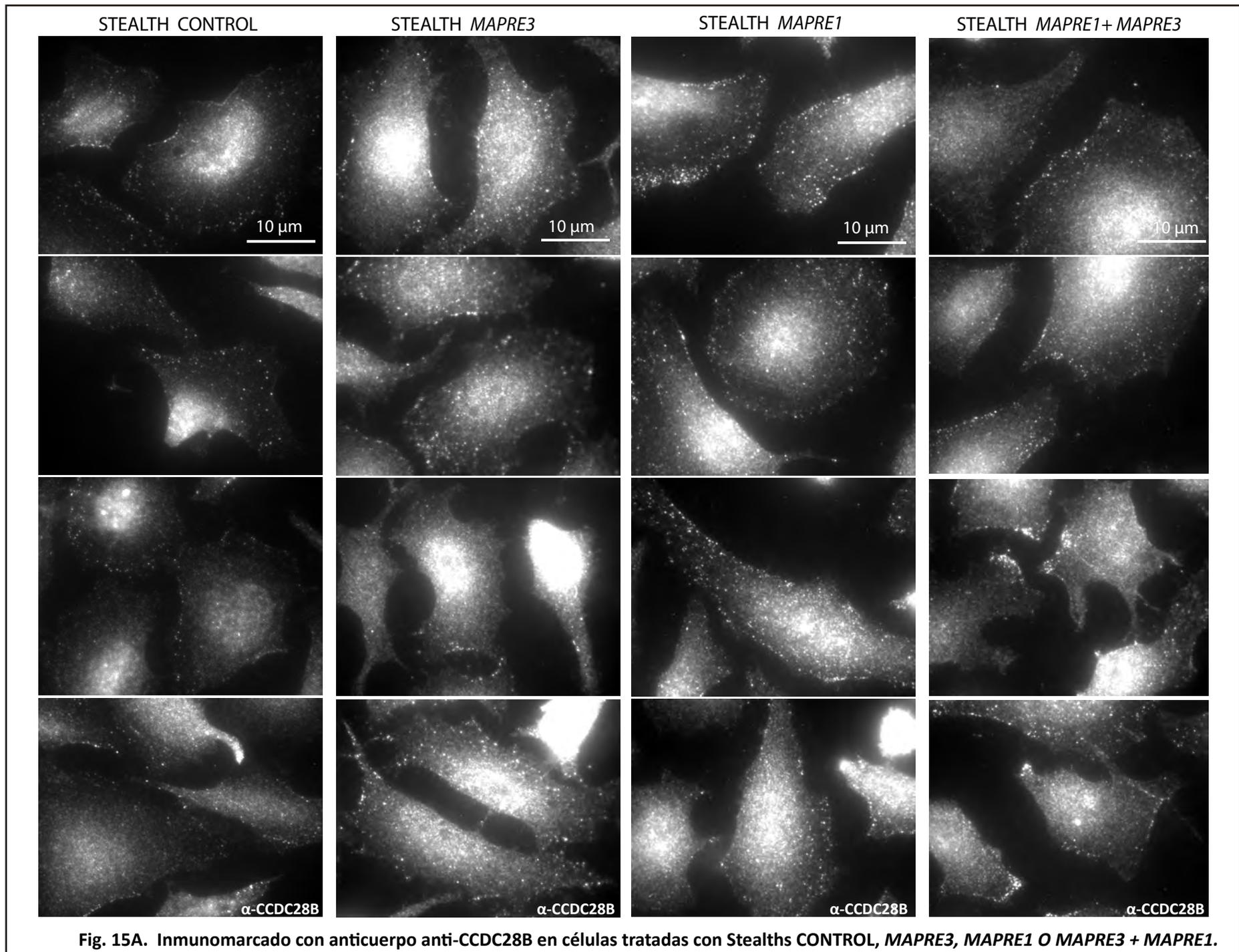
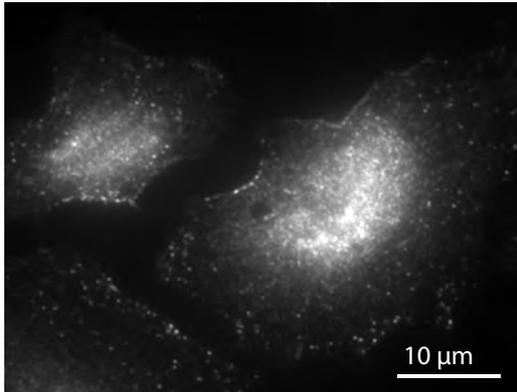


Fig. 15A. Inmunomarcado con anticuerpo anti-CCDC28B en células tratadas con Stealths CONTROL, *MAPRE3*, *MAPRE1* O *MAPRE3* + *MAPRE1*.

STEALTH CONTROL



STEALTH *KLC1*

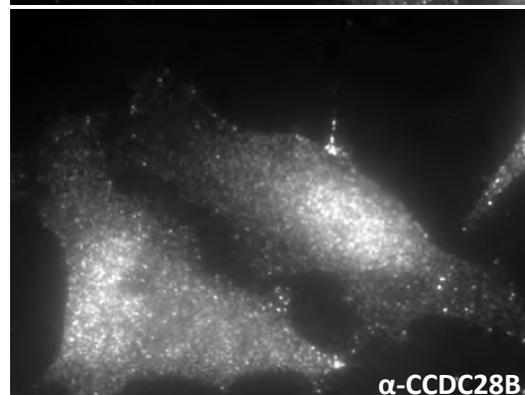
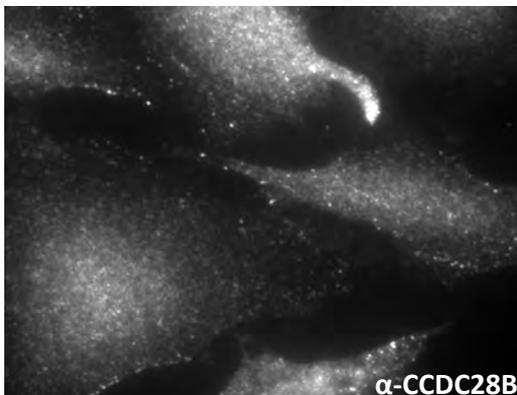
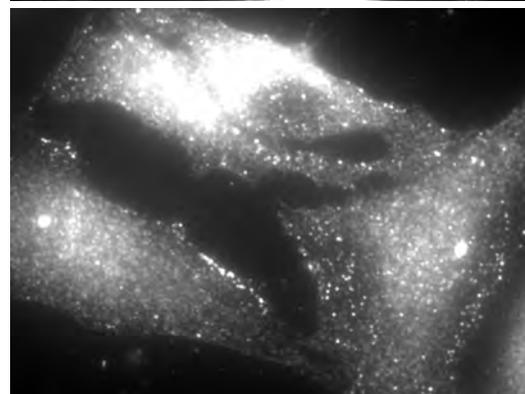
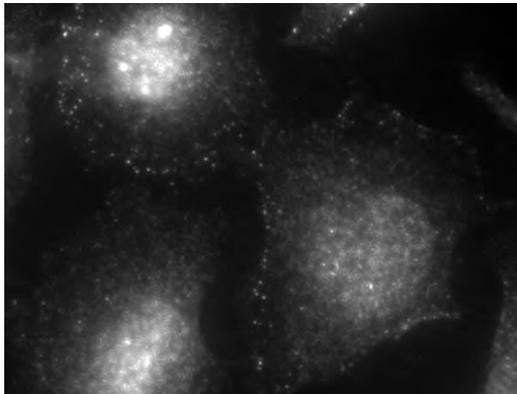
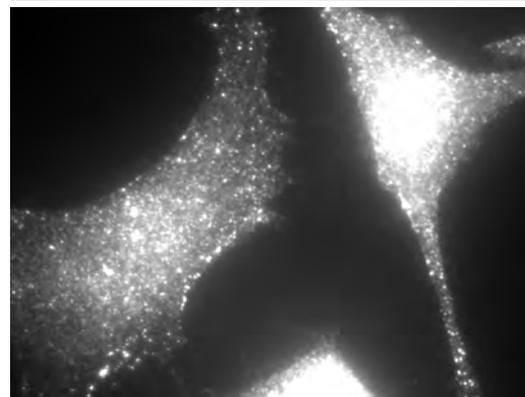
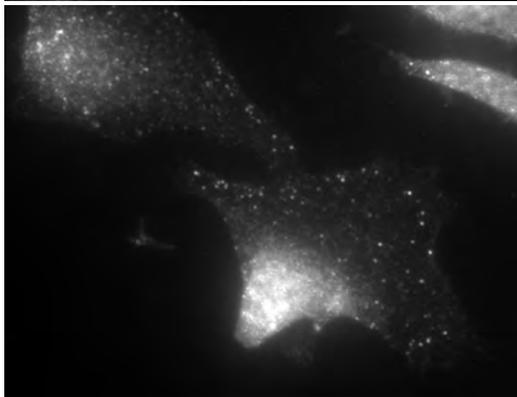
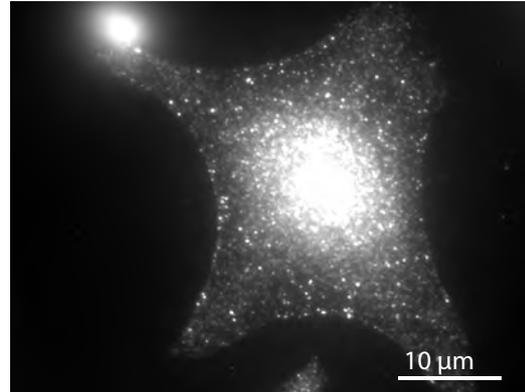


Fig. 15B. Inmunomarcado con anticuerpo anti-CCDC28B en células tratadas con Stealths CONTROL y Stealth de *KLC1*

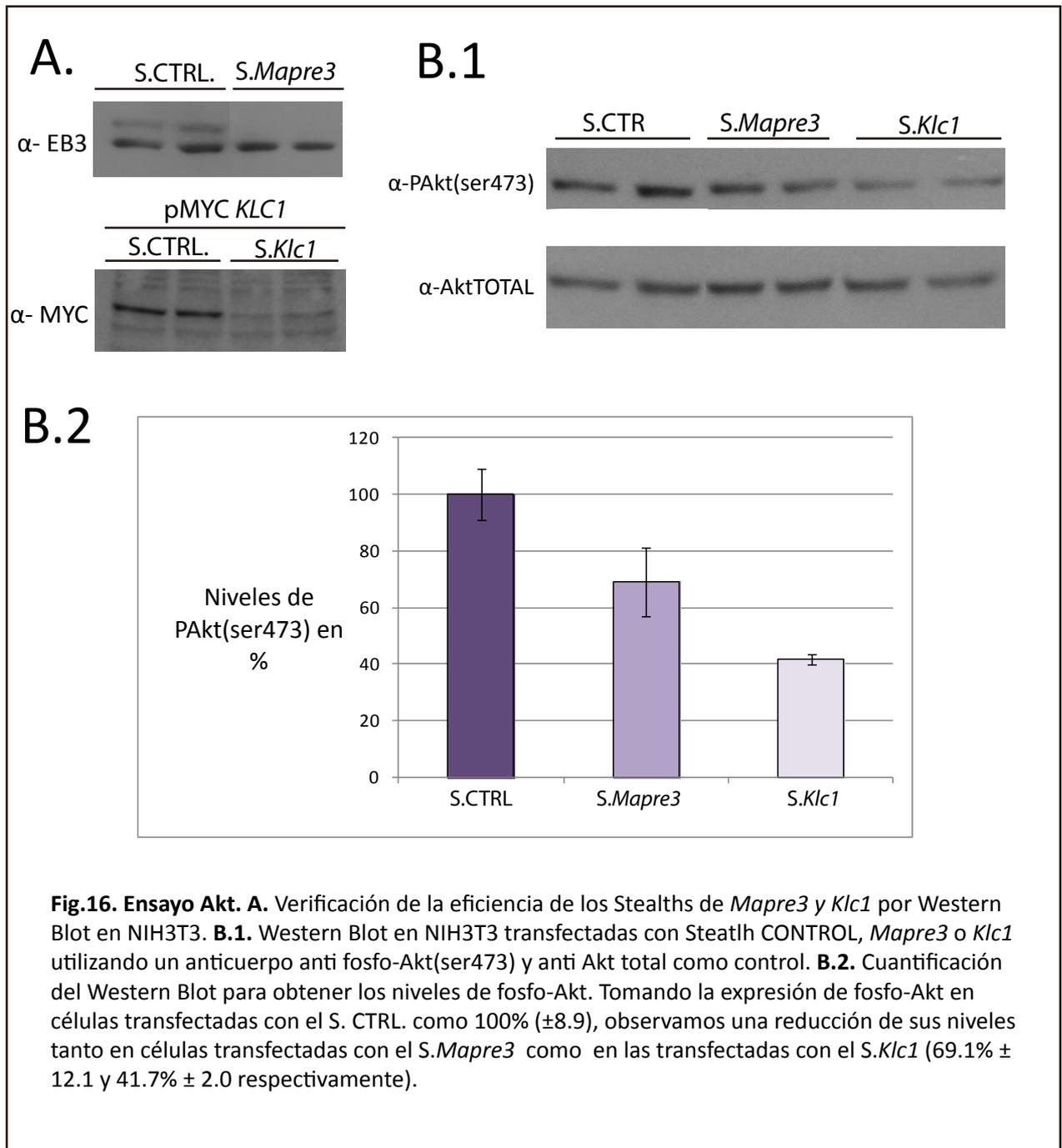
La depleción de EB3 y KLC1 afecta la funcionalidad de mTORC2

Para continuar evaluando la relación funcional entre CCDC28B y sus interactores decidimos enfocarnos en las actividades conocidas y reportadas para CCDC28B tanto en el contexto de mTORC2 como en ciliogénesis. Como ya mencionamos en la introducción, estudios recientes de nuestro laboratorio permitieron demostrar que la actividad del complejo mTOR2 se encuentra afectada cuando se modifican los niveles de CCDC28B (36). Una función de la actividad de mTORC2 es completar la activación de la quinasa Akt fosforilándola en la Serina 473 (84, 85). Es por esto que los niveles de fosfo-Akt(S473) se utilizan habitualmente como reporteros de la actividad de mTORC2 (39). La reducción de los niveles de CCDC28B, tanto en células en cultivo como *in vivo* en el pez cebra, mostró una reducción significativa en los niveles de fosfo-Akt(S473) (36). Decidimos entonces analizar la posibilidad de que la interacción con KLC1 o EB3 fuera importante para la función de CCDC28B en la regulación de la vía mTORC2. Si CCDC28B de alguna manera necesita de su interacción con KLC1 o EB3 para cumplir esta función como agonista de mTORC2, bajando la expresión de los interactores esperábamos ver el mismo efecto sobre fosfo-Akt (S473), que al disminuir la expresión de CCDC28B.

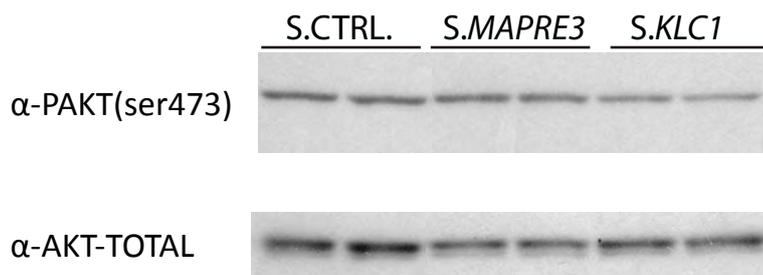
Para estos ensayos utilizamos la línea celular murina NIH3T3 por lo que diseñamos oligos Stealth específicos para los genes *Klc1* y *Mapre3* murinos. Para probar la funcionalidad de el Stealth de *Mapre3* transfectamos NIH3T3 con Stealth Control o Stealth de *Mapre3*, extrajimos proteínas, cuantificamos los lisados para cargar igual cantidad de proteína de cada condición, y realizamos un Western Blot utilizando un anticuerpo anti EB3. De esta manera, pudimos comprobar que los niveles de EB3 bajan significativamente en las células transfectadas con *S.Mapre3* en relación a las células control (Fig. 16A, panel superior). Para probar el Stealth de *Klc1* solo contábamos con KLC1 humano clonado en el vector pMYC por lo que en primer lugar chequeamos el grado de conservación de la secuencia blanco en el ratón. Nuestro Stealth para *Klc1* fue diseñado para reconocer una secuencia dentro de *klc1* que es compartida con su ortólogo humano, presentando solo cinco diferencias a nivel de nucleótidos. Dado que la presencia de bases desapareadas (mismatches) no siempre eliminan la funcionalidad de los ARNi, decidimos utilizar esta construcción para evaluar el Stealth para *Klc1* murino por Western Blot co-transfectando células NIH3T3 con pMYC-KLC1 y S.CTRL o *S.Klc1*. El stealth *Klc1* eficientemente disminuyó los niveles de KLC1 (Fig.16A,

panel inferior). A continuación transfectamos células NIH3T3 con los Stealth y a las 48 horas post-transfección las lisamos y realizamos un Western Blot utilizando tanto un anticuerpo anti fosfo-Akt S473 como un anti Akt-Total como control de manera de poder relativizar los niveles de Akt fosforilado en relación a la cantidad total de proteína. Es interesante que, en comparación con las células transfectadas con el Stealth control, las células transfectadas con el Stealth de *Mapre3* y *Klc1* presentaron un 30% y un 60% menos de fosfo-Akt(S473) respectivamente (Fig.16B). A su vez, confirmamos estos resultados repitiendo el mismo experimento pero utilizando la línea celular humana HEK-FT donde, aunque el efecto fue más leve, observamos la misma tendencia (Fig.17).

En resumen, dado que EB3 y KLC1 afectan en el mismo sentido que CCDC28B la actividad de mTORC2, es posible que lo estén haciendo a través de modificar la funcionalidad de CCDC28B. Para probar esta posibilidad será necesario realizar por ejemplo ensayos de interacción génica donde se disminuya los niveles de CCDC28B junto con EB3 o KLC1 y se observe si la depleción conjunta de estas proteínas exacerba el defecto en la actividad del complejo mTOR2.



A.



B.

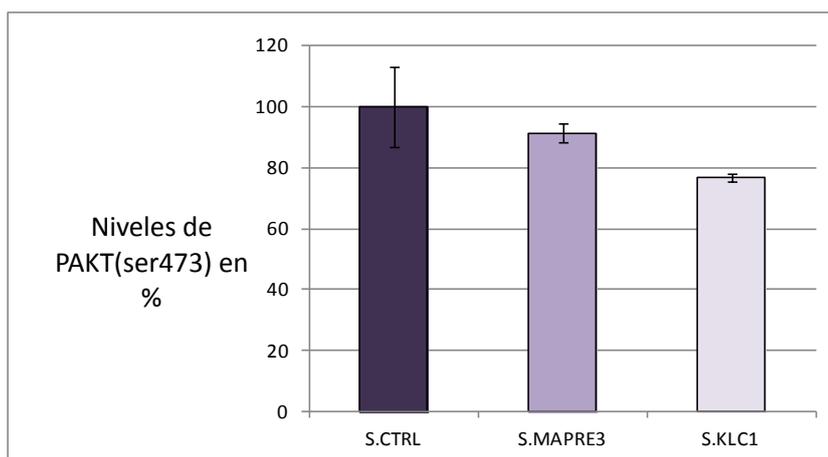


Fig.17. Ensayo AKT en línea celular humana.A. Western Blot en HEK293-FT transfectadas con Stealth CONTROL, *MAPRE3* o *KLC1* utilizando un anticuerpo anti fosfo-AKT(ser473) y anti AKT-TOTAL como control. B. Cuantificación del Western Blot para obtener los niveles de fosfo-AKT. Tomando la expresión de fosfo-AKT en células transfectadas con el S. CTRL. como 100% (± 13.1), observamos una reducción de sus niveles tanto en células transfectadas con el S. *MAPRE3* como en las transfectadas con el S. *KLC1* ($91.4\% \pm 2.9$ y $76.6\% \pm 1$ respectivamente).

Efecto de la depleción de EB3 y KLC1 en el número y largo de las cilias

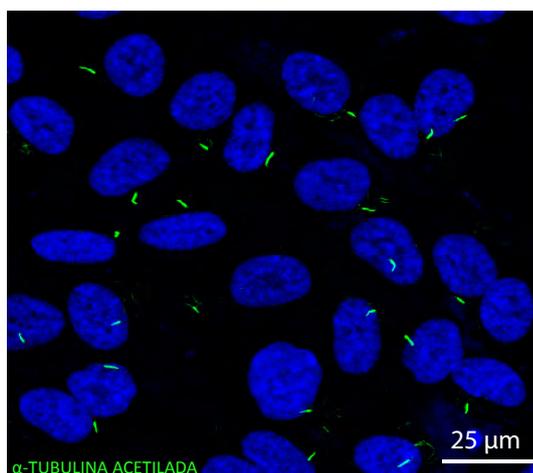
Además de modular la actividad de mTORC2, CCDC28b afecta ciliogénesis en células en cultivo (32). Resulta interesante que también recientemente se mostró que la depleción de EB3 en células en cultivo disminuye la cantidad de células ciliadas (47), dato que apoyaba nuestra hipótesis de que CCDC28B y EB3 pudieran interactuar y tener funciones en común. En primer lugar nos interesó reproducir los resultados publicados y analizar si bajando los niveles de *MAPRE3* se afectaba la ciliogénesis en nuestro sistema. Por otro lado nos interesó también evaluar si el número y/o largo de las cilias se ve afectado en células que expresan menores niveles de *KLC1*.

Como modelo celular utilizamos la línea humana hTERT-RPE por ser no solo la línea celular utilizada en el trabajo donde describen el rol de EB3 en ciliogénesis sino también una línea de referencia en lo que respecta a estudios relacionados a ciliogénesis. Transfectamos estas células con los Stealths para *MAPRE3* o *KLC1* y a las 48 horas post transfección realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti tubulina acetilada para marcar las cilias. Con imágenes obtenidas por microscopía confocal, y utilizando el software ImageJ, cuantificamos el número y largo de las cilias en nuestras muestras problema y los controles correspondientes. Para cada condición analizamos 10 campos (cinco campos por cada réplica biológica) donde contamos y medimos el largo de la cilia de un total aproximado de 200 células.

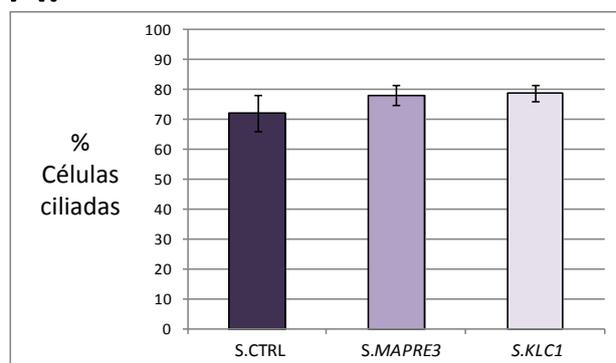
Tanto en las células transfectadas con el Stealth de *MAPRE3* como en las transfectadas con el Stealth de *KLC1*, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células ciliadas cuando las comparamos con células transfectadas con el Stealth control. Con respecto al largo de las cilias, tampoco encontramos diferencias significativas entre las células transfectadas con el Stealth de *MAPRE3* ($3.57\mu\text{m} \pm 0.06$) respecto a las transfectadas con el Stealth control ($3.67\mu\text{m} \pm 0.08$). Sin embargo, en las células transfectadas con el Stealth de *KLC1* observamos un leve aumento en el largo de las cilias ($3.76\mu\text{m} \pm 0.06$, $p < 0.05$) (Fig.18).

En suma nuestros resultados en células en cultivo bajando la expresión de EB3 y *KLC1*, no mostraron efectos importantes en el número y largo de las cilias. Sin embargo dada la discrepancia con lo reportado, al menos para EB3, no podemos descartar la posibilidad de que esto sea un efecto de la eficiencia de transfección o de nuestro sistema para bajar la

expresión de EB3 que quizá no sea lo suficientemente alta. A su vez se deberían evaluar otros tiempos a partir de la transfección.



A.



B.

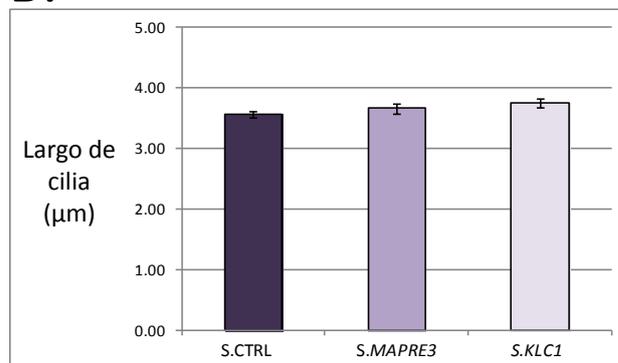


Fig.18. Porcentaje y largo de cilia en células transfectadas con Stealths de *MAPRE3* y *KLC1*. Transfectamos hTERT-RPE con stealths CONTROL, de EB3 o *KLC1* y realizamos, para cada condición de transfección a las 48 horas, ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti tubulina acetilada para marcar la cilia y cuantificar su número y largo. **A.** En el porcentaje de células ciliadas no encontramos diferencias significativas (72.2% ± 5.96 en células transfectadas con S.CTRL vs 78.2% ± 3.37 en las transfectadas con S.MAPRE3 y 78.9% ± 2.74 en las transfectadas con S.KLC1). **B.** La cuantificación del largo de las cilia no mostró diferencias significativas entre las transfectadas con el S.CTRL. (3.67 μm ± 0.08) vs. las transfectadas con el S.MAPRE3 (3.57 μm ± 0.06). Sin embargo las transfectadas con el S.KLC1 (3.76 μm ± 0.06) parecen ser un poco más largas y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,005$).

3.3.3. Caracterización de las interacciones *in vivo* en pez cebra

Para continuar estudiando la posible relevancia fisiológica de la interacción entre CCDC28B, EB3 y KLC1, decidimos utilizar también un modelo *in vivo*, el pez cebra (*Danio rerio*), debido a que es un modelo con muchas ventajas desde el punto de vista experimental y que ha sido muy utilizado para estudiar la biología de las cilias.

Puesta a punto de morfolinós y caracterización de los morfantes de EB3

Una de las técnicas más utilizadas para inhibir la expresión de genes en el pez cebra es la microinyección de morfolinós en el vitelo de embriones tempranos (estadio de 1 a 8 células). Los morfolinós (MO) son oligómeros, análogos químicamente a los ácidos nucleicos, que presentan un anillo de morfolino en lugar de ribosa, y las bases están unidas entre sí por enlaces fosforodiamidato. Estas modificaciones hacen que estos oligos sean estables ya que no son reconocidos por ninguna endonucleasa. Sin embargo, sí hibridan con alta afinidad a secuencias nucleotídicas complementarias de simple cadena (por ejemplo los ARNm correspondientes) y de esta forma interactúan con ellas. Existen dos tipos de morfolinós que se diferencian en su modo de acción: los MO atg o bloqueadores de la traducción que se unen a secuencias complementarias dentro de la región 5' UTR del ARNm bloqueando de este modo el sitio donde se unen los ribosomas y el comienzo de la traducción, y los MO splice que se unen por complementariedad a las secuencias de unión exón-intrón alterando el correcto procesamiento de los ARNm.

Comenzamos por identificar el ortólogo de *MAPRE3* en pez cebra y encontramos que este gen se encuentra duplicado: *mapre3a* y *mapre3b*. Este fenómeno es común para muchos genes debido a la duplicación que sufrió el genoma del ancestro de los peces teleósteos luego de su divergencia con la rama de los mamíferos (86). Cuando los genes están duplicados, en algunos casos una sola de las copias retiene la función del gen original mientras que la otra copia se transforma en pseudogen por la acumulación de mutaciones deletéreas. En otros casos, y en particular en los genes con múltiples funciones, mutaciones en una o ambas copias, lleva a la pérdida de alguna de las funciones del gen ancestral ortólogo siendo entonces ambas copias necesarias para cumplir todas sus funciones (87). Por este motivo tuvimos que trabajar con dos morfolinós específicos que nos permitieron bajar la expresión tanto de cada gen por separado así como ambos en forma simultánea. Los

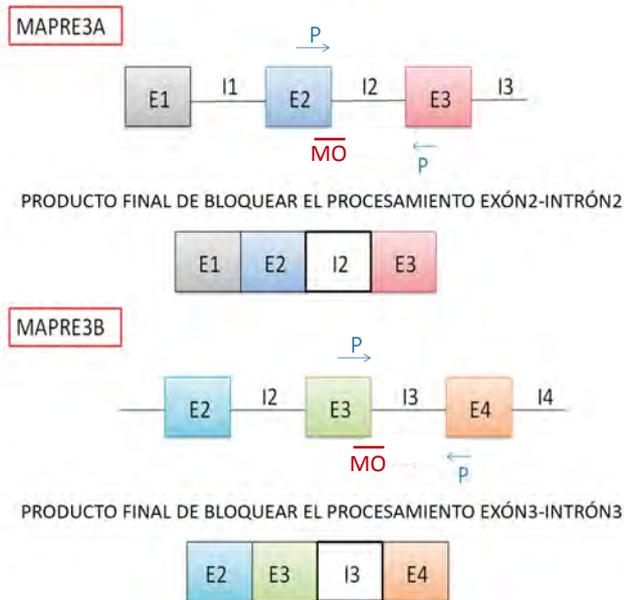
morfolinos que diseñamos para bajar la expresión de *mapre3a* y *mapre3b* fueron morfolinos de tipo splice, cuya unión por complementariedad de bases al ARNm produce la retención de un intrón en su producto final debido a que bloquea un sitio de unión para la maquinaria de procesamiento (Fig.19A). La retención de este intrón produce un cambio en el marco abierto de lectura que resulta en la introducción de un codón de terminación prematuro. De este modo, si se produce la traducción de este mensajero procesado incorrectamente, se genera una proteína truncada, de menor tamaño que la proteína salvaje.

Lo primero que hicimos fue determinar la dosis de MOs con la que íbamos a trabajar. Para esto inyectamos una serie de dosis crecientes, tanto de cada uno de los MO por separado como co-inyectando ambos, y fuimos evaluando el fenotipo de los embriones a las 24, 48 y 72 hpi (horas post-inyección). Para los experimentos siguientes elegimos la dosis que mostró la mayor penetrancia del fenotipo y menor tasa de mortalidad. Tomando estos parámetros en consideración, la co-inyección de 6ng de cada MO nos brindó los mejores resultados.

Dado que nuestros MOs afectan el procesamiento del ARNm de sus genes blanco (splicing), verificamos su eficiencia realizando RT-PCR usando el ADN copia de embriones controles y de embriones inyectados con 6ng del MO *mapre3a* y 6ng del MO *mapre3b*. Los primers fueron diseñados de tal forma que la amplificación a partir de ADN salvaje o “wild type” (WT) resulta en una banda de 274pb y 270pb respectivamente, mientras que la amplificación a partir del ADNc de embriones inyectados con Mo *mapre3a* o MO *mapre3b* resulta en una banda de 602pb en el caso de la inyección con Mo *mapre3a* debido a la retención del intrón 2 y de 785pb en el caso de la inyección con Mo *mapre3b* por la retención del intrón 3. Comprobamos que ambos MO afectan eficientemente el procesamiento del ARNm (Fig.19B).

En la amplificación realizada para *mapre3b* en los embriones inyectados con el MO, aparte de las bandas esperadas, observamos una banda de peso molecular de entre 800-900pb que pensamos debe ser un producto inespecífico y quizás podamos resolverlo aumentando las exigencias de la PCR por ejemplo subiendo la temperatura de alineamiento de los primers.

A.



B.

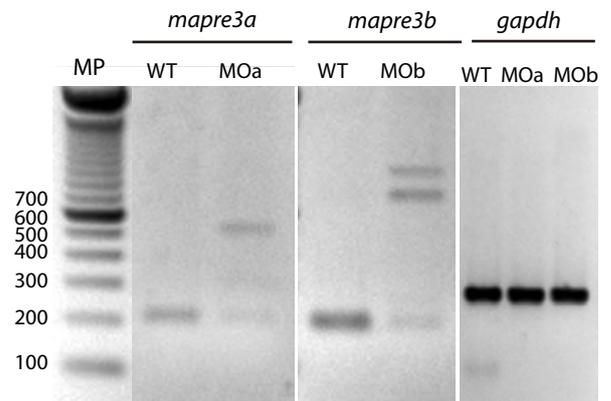


Fig.19. Diseño y validación de los MO de tipo splice para *mapre3a* y *mapre3b*. A. representación esquemática del modo de acción de los morfolinolinos diseñados. El MO *mapre3a* se une a los límites exón2-intrón2 y bloquea el sitio de splice generando la retención del intrón 2. El MO *mapre3b* se une a los límites exón3-intrón3 y bloquea el sitio de splice produciendo la retención del intrón 3. Las flechas representan los primers utilizados en los RT-PCR mostrados en B. B. RT-PCR realizado en embriones wild type (WT) y embriones inyectados con 6ng de MO *mapre3a* (MOa) o MO *mapre3b* (MOb). El MO *mapre3a* eficientemente bloquea el correcto procesamiento del exón2-intrón2 reteniendo el intrón 2 (320pb) y generando un producto de mayor tamaño (602pb) al esperado con un procesamiento correcto (274pb). El MO *mapre3b* eficientemente bloquea el correcto procesamiento reteniendo el intrón 3 (515pb) lo cual genera un producto de mayor tamaño (785pb) al esperado cuando ocurre un procesamiento correcto del ARNm (270pb).

Cuando evaluamos el fenotipo general de los embriones vivos a las 48 y 72 hpi, observamos que solo cuando se reducen los niveles de ambos genes a la vez (MO *mapre3a* y *b*, 6ng de cada uno) se produce un fenotipo diferente a los controles no inyectados. Si bien a las 48 hpi ya observamos fenotipo, el fenotipo más severo se observó a las 72 hpi. La reducción de ambos genes produce que los embriones presenten cuerpo más corto, defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia) y edema pericárdico (Figs. 20 y 21). Es importante resaltar que algunos de estos fenotipos, como la hidrocefalia, el cuerpo más corto y los ojos más pequeños son compartidos con los morfantes de *CCDC28B* (32) así como con otros morfantes de genes ciliares.

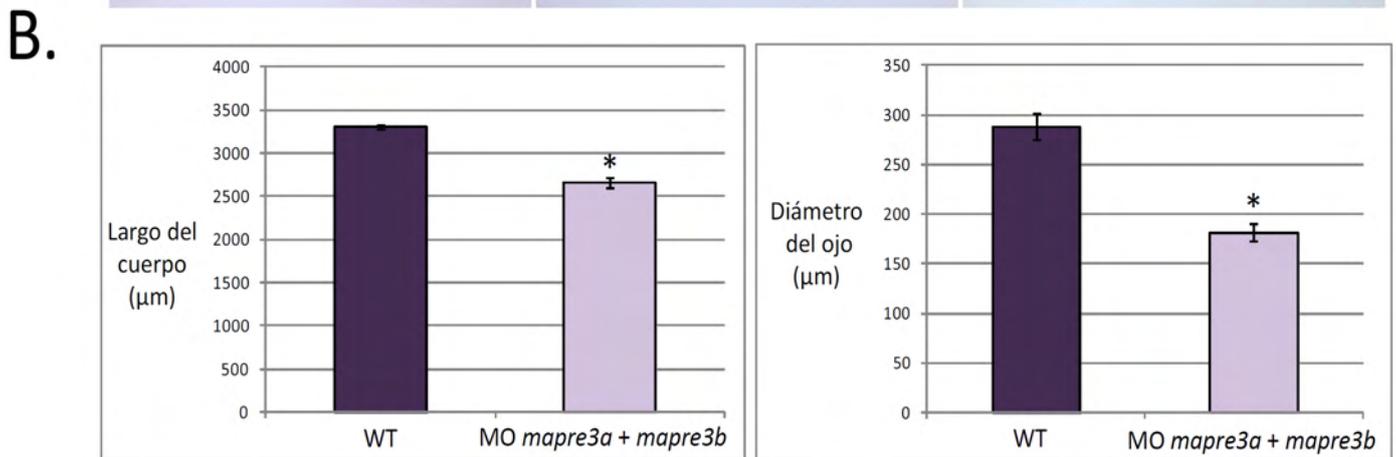
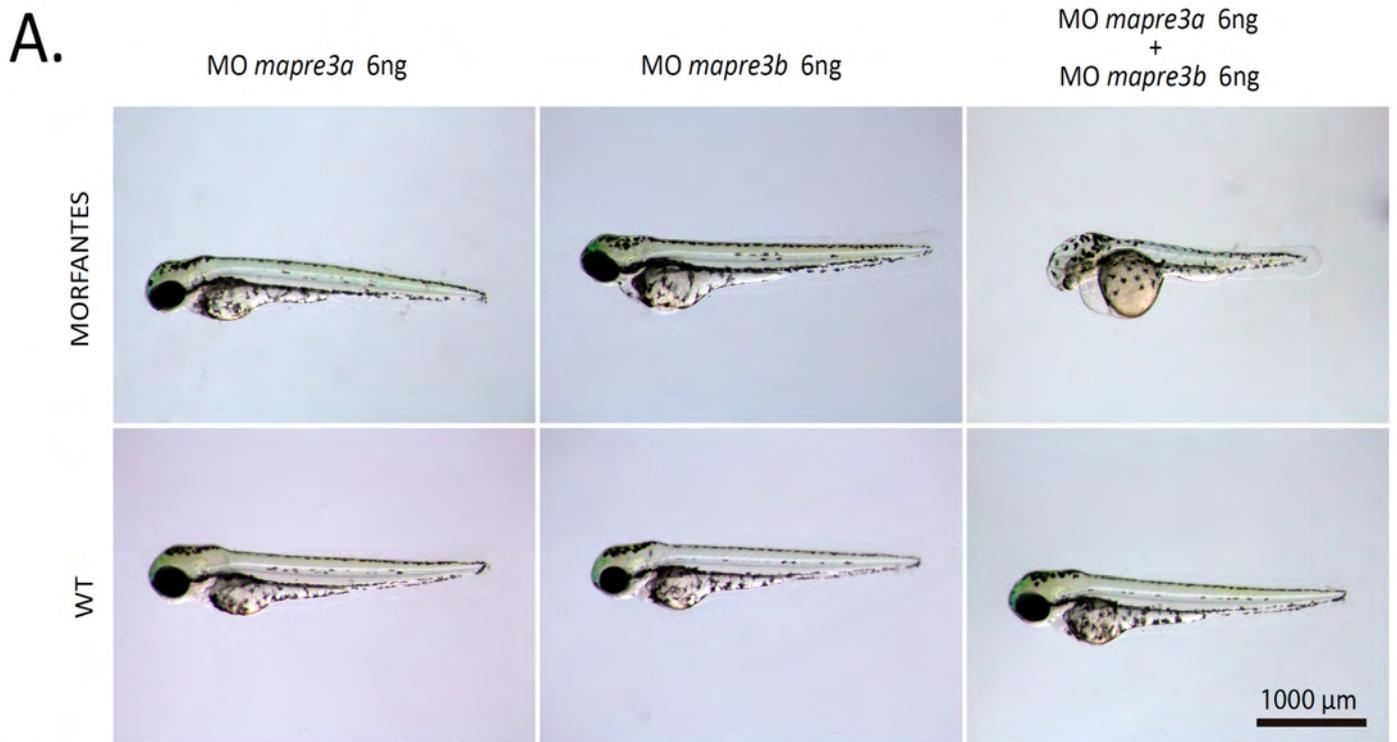
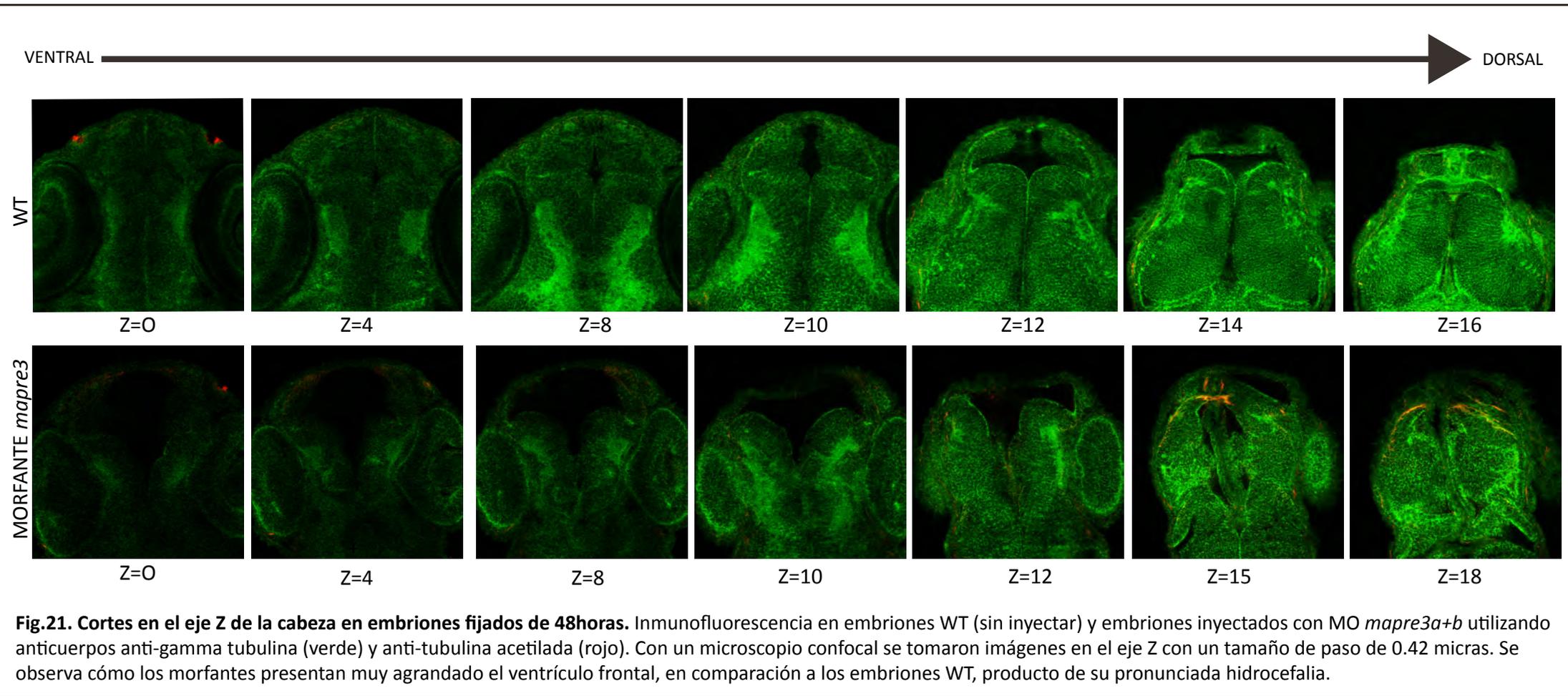
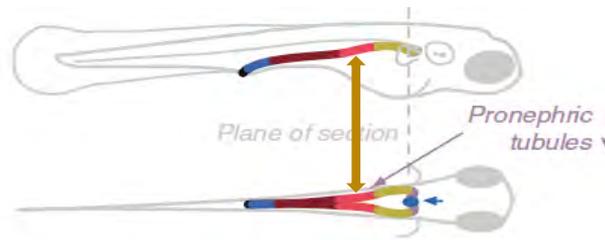


Fig.20. Caracterización del fenotipo de los morfantes de *mapre3*. **A.** Vista lateral de embriones vivos de 72 horas. Morfología general de los embriones WT (sin inyectar) y de los embriones morfantes inyectados con 6ng de MO *mapre3a*, 6ng MO *mapre3b* o 6ng MO *mapre3a* + 6ng MO *mapre3b*. Solo los doble morfantes presentan un fenotipo marcado: defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia), edema pericardico y cuerpos más cortos. **B.** A la izquierda, cuantificación del acortamiento del cuerpo en los embriones morfantes respecto a los embriones WT (3308.2 μm \pm 29.1 μm en embriones WT vs. 2658.1 μm \pm 54.6 μm en embriones morfantes, $p < 0,05$). A la derecha, cuantificación del diámetro de los ojos, siendo en los morfantes más pequeños (287.9 μm \pm 13.3 μm en embriones WT vs. 181.7 μm \pm 8.8 en embriones morfantes).

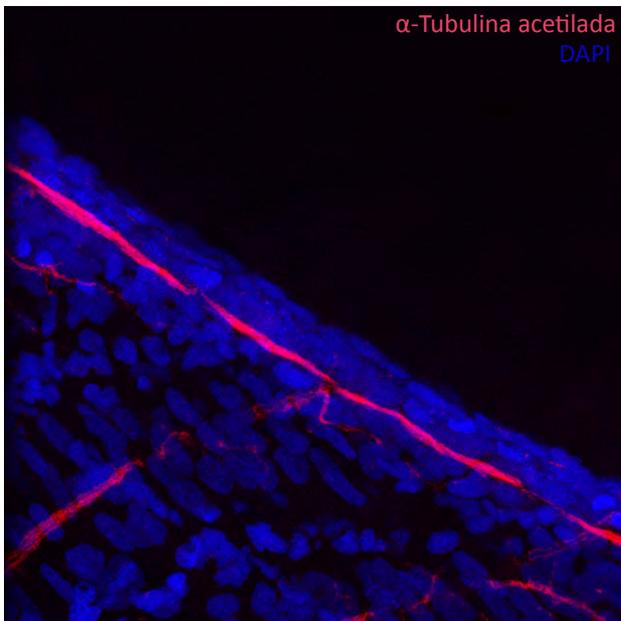


Dado que según lo reportado EB3 afecta ciliogénesis en células en cultivo, que algunos de los fenotipos globales de los morfantes de EB3 son compatibles con defectos en las cilias y que su interactor CCDC28B también afecta ciliogénesis tanto en células en cultivo como *in vivo* en pez cebra, decidimos analizar si las cilias estaban afectadas en diferentes órganos de los morfantes de EB3.

Primero fuimos a mirar el epitelio que recubre los conductos de los pronefros ya que es un tejido altamente ciliado donde nuestro grupo mostró que los morfantes de CCDC28B presentan una desorganización de las cilias. En los embriones controles las cilias se encuentran alineadas sobre el conducto visualizándose como una delgada línea, mientras que los morfantes de *Mapre3* presentan esta organización alterada y el conducto ya no se visualiza como una delgada línea, fenotipo reminiscente de lo observado en morfantes de *ccdc28b* (Fig.22; (32)).



CONTROL



6 ng. MO *mapre3a* + 6 ng. MO *mapre3b*

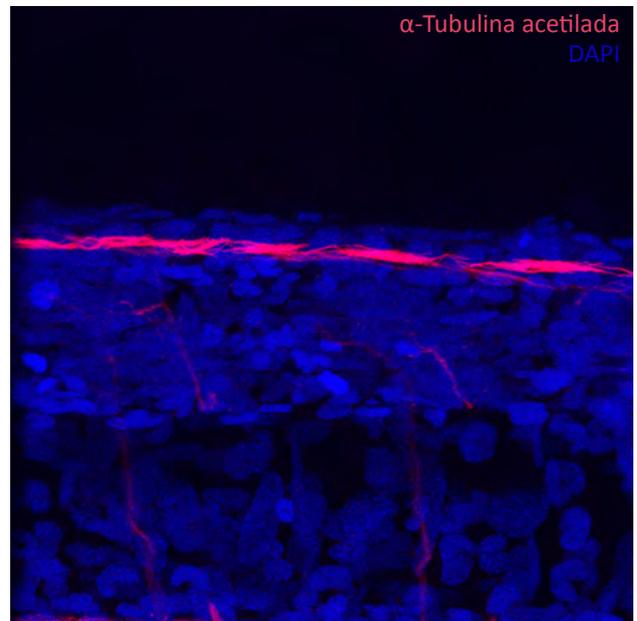
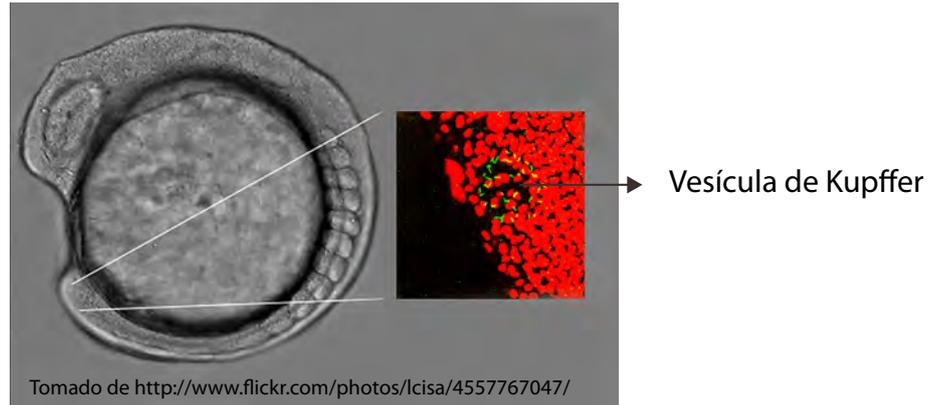


Fig.22. Cilias en el epitelio que recubre el conducto de los pronefros en el pez cebra. Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-tubulina acetilada para marcar la cilia y DAPI para marcar los núcleos celulares en embriones controles (sin inyectar) y embriones inyectados con 6 ng. MO *mapre3a* + 6 ng. MO *mapre3b*. En estos últimos se observa una desorganización de las cilias que ya no se observan como una línea delgada a lo largo del conducto de los pronefros como en los embriones control.

Luego analizamos las cilias en la vesícula de Kupffer (KV), donde previamente nuestro grupo demostró que la disminución en la expresión de *ccdc28b* resulta en cilias más cortas. La vesícula de Kupffer es una estructura esférica y cerrada que está ubicada ventral a la notocorda en el primordio de la cola del embrión. Es una estructura transitoria que se forma en el estadio de 4 somites (a las 11-13 horas post fertilización, hpf, a 28.5°C) y desaparece a las 24 hpf. Entre el estadio de 8-13 somites es cuando mejor se visualiza. Contiene un lumen lleno de líquido, tapizado por células epiteliales con cilias largas y móviles con una estructura "9+2" (Fig.23A)(88). Esta estructura funciona, en forma análoga al nodo embrionario en ratón, como el centro generador de la asimetría derecha-izquierda. En este proceso se ha visto que el movimiento de las cilias en la KV sería necesario para romper la simetría si bien el mecanismo exacto no ha sido dilucidado. En este sentido se ha planteado que el flujo generado por estas cilias sería la señal en si misma o bien podría establecer un gradiente de morfógenos y la consecuente expresión diferencial de genes a ambos lados del embrión (89, 90). Para mirar cilias en la KV, realizamos una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti tubulina acetilada en embriones en estadio de 10 somites aproximadamente, tanto en controles (sin inyectar) como en inyectados con MO *mapre3a+b*. Utilizamos como control embriones sin inyectar debido a que estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que la inyección con MO estándar no afecta el largo de la cilia. Sin embargo, dado que el procedimiento de inyección en si mismo puede atrasar el desarrollo, al realizar los experimentos nos aseguramos de utilizar embriones que habían alcanzado el mismo estadio de desarrollo.

Sacamos fotos con un microscopio confocal y medimos el largo de las cilias utilizando el software Image J. Observamos una reducción leve aunque estadísticamente significativa en el largo de las cilias de los embriones morfantes *mapre3* ($4.98 \pm 0.01 \mu\text{m}$ en embriones control vs $4.52 \pm 0.10 \mu\text{m}$ en embriones morfantes, $p < 0.05$) (Fig.23B).

A.



B.

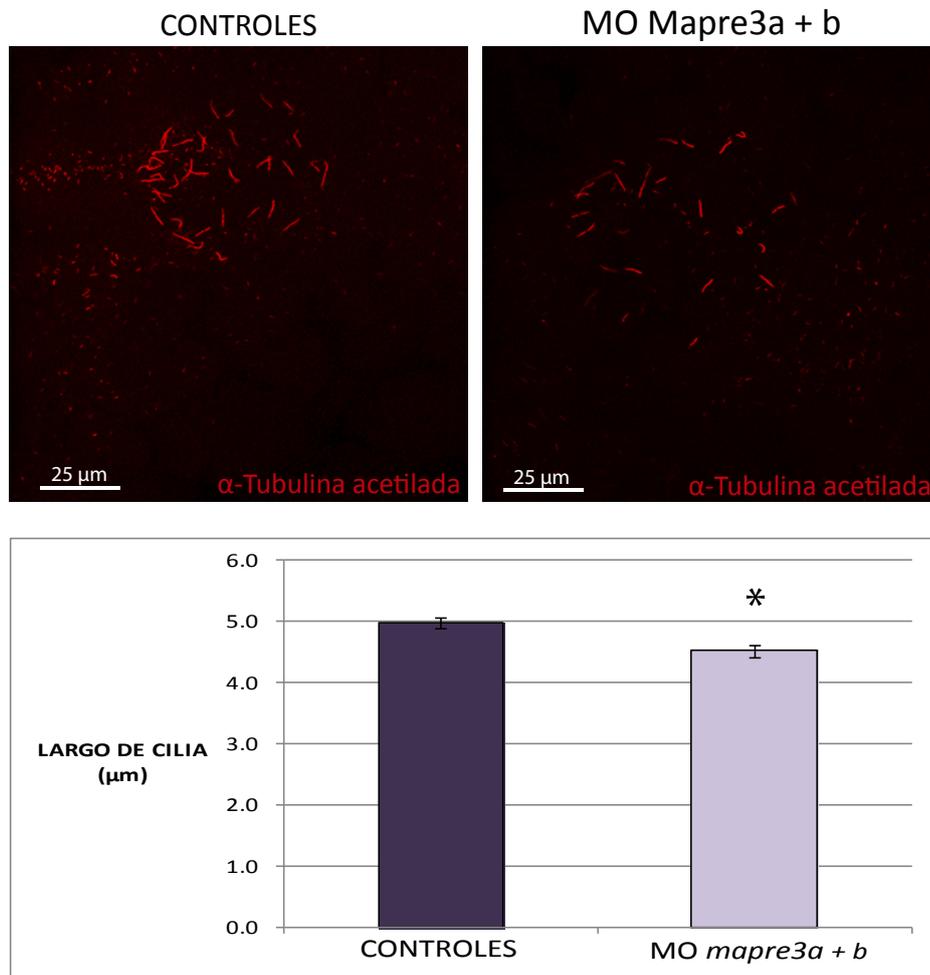


Fig.23. Cilias en la Vesícula de Kupffer (VK). A. Imagen de un embrión de 12 horas de desarrollo adquirida utilizando un microscopio óptico con contraste de fases diferencial. El zoom de la región de la cola, donde se encuentra la VK, fue adquirida por microscopía confocal. Los núcleos están marcadas en rojo con TOPRO-3 y las cilias en verde con anti tubulina acetilada. Imagen tomada de <http://www.flickr.com/photos/lcisa/4557767047/>. B. Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti tubulina acetilada para marcar cilias en embriones control (sin inyectar) y embriones inyectados con 6 ng MO *mapre3a* + 6 ng MO *mapre3b*. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal y medimos el largo de cilias utilizando el software Image J. En la cuantificación se observa una reducción pequeña pero estadísticamente significativa en el largo de las cilias de los embriones morfantes respecto a los controles ($4.52 \pm 0.10 \mu\text{m}$ en embriones morfantes vs. $4.98 \pm 0.01 \mu\text{m}$ en embriones control, $p < 0.05$).

Para evaluar si el fenotipo posiblemente ciliar de EB3 esta relacionado con su interacción con CCDC28B, realizamos primero un ensayo de interacción génica y luego uno de rescate. Para el ensayo de interacción génica trabajamos con dosis sub-óptimas de los morfolininos de *mapre3* y de *ccdc28b*. Éstas son dosis que ya sea no producen fenotipo alguno o el mismo es leve y en pocos embriones. El ensayo se basa en la hipótesis de que interrumpir parcialmente el componente de una vía puede no generar un fenotipo pero sí una sensibilización genética, de manera que si se interrumpe parcialmente más de un componente de la vía si se observará fenotipo producto de la sinergia entre ambos defectos. Si existe una interacción genética entre *mapre3* y *ccdc28b*, co-inyectando ambos morfolininos esperamos que la severidad del fenotipo aumente. Utilizamos dosis sub-óptimas de 4ng para *mapre3a* y *mapre3b* y 2ng para MO *ccdc28b*. Para inyectar en todos los casos la misma cantidad de nanogramos de MO, igualamos el valor máximo de MO inyectando MO estándar. Documentamos embriones vivos a las 48hpi y para poder detectar una posible interacción decidimos cuantificar el largo del cuerpo y el tamaño de los ojos, dos fenotipos que comparten tanto los morfantes de *mapre3* como los de *ccdc28b*. En el caso del largo del cuerpo, observamos que la inyección conjunta de las dosis sub-óptimas de MO *mapre3a*, MO *mapre3b* y MO *ccdc28b* no producen una reducción significativa en el largo del cuerpo de los embriones en comparación con la dosis sub-óptima del MO *Ccdc28b* inyectada de manera individual. Sin embargo, la inyección conjunta de los tres morfolininos si mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) en el diámetro de los ojos en comparación con las dosis sub-óptimas inyectadas por separado, lo cual sugiere que existiría una interacción genética entre *mapre3* y *ccdc28b*, por lo menos para parte de los fenotipos observados (Fig.24).

Si bien las cilias en la KV de los embriones morfantes de *mapre3* presentan una reducción leve pero significativa en su largo, la explicación de que ésta sea tan sutil pensamos que pueda deberse, por un lado al hecho de que EB3 esta reportado que se expresa preferencialmente en la región de la cabeza (Thisse, B., Thisse, C.) y por otro lado podría tener que ver con su redundancia funcional con EB1. A pesar de ser sutil el efecto pensamos que puede ser interesante realizar este ensayo de interacción genética en la KV utilizando quizás dosis completas de *mapre3* (ya que el fenotipo es muy leve) y dosis subóptimas o completas también de *ccdc28b*. Si existe interacción esperamos que la inyección con el MO de *mapre3* exacerbe el fenotipo.



B.

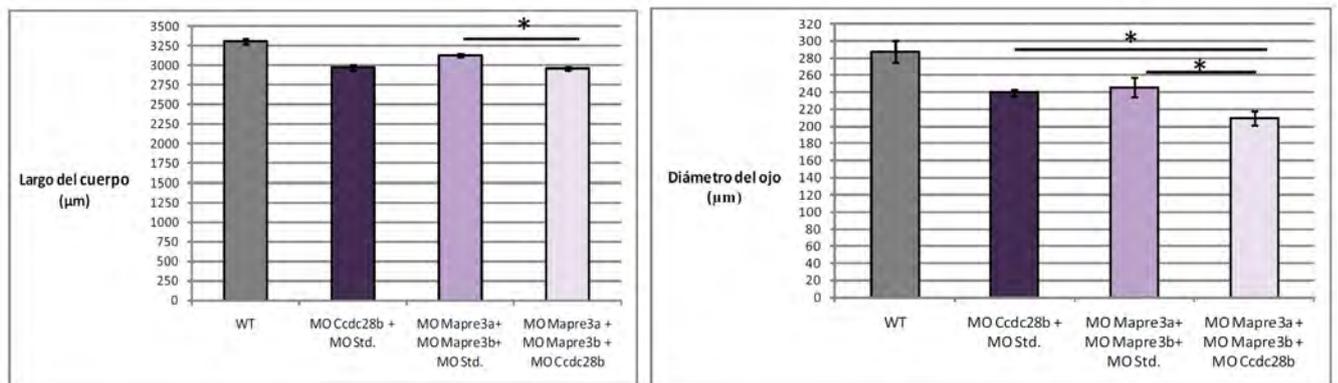


Fig.24. Ensayo de interacción genética. A. Vista lateral de embriones vivos de 48 horas inyectados con dosis sub-óptimas de MO *ccdc28b* (2ng.), MO *mapre3a* (4ng.) y MO *mapre3b* (4ng.). Las dosis sub-óptimas por sí solas no generan fenotipo pero cuando se inyectan los 3 juntos se observa una disminución en el tamaño de los ojos que cuantificamos en B. **B.** A la izquierda, cuantificación del largo del cuerpo donde no se observan indicios de interacción genética ya que las diferencias entre los embriones inyectados con las dosis sub-óptimas del MO *ccdc28b* y los inyectados con los 3 MO juntos no son estadísticamente significativas ($2972.7\mu\text{m} \pm 38.07\mu\text{m}$ en MO *ccdc28b* + MO Std., $3130.91\mu\text{m} \pm 23.94\mu\text{m}$ MO *mapre3a* + MO *mapre3b* + MO Std., $2962.9\mu\text{m} \pm 21.90\mu\text{m}$ en MO *mapre3a* + MO *mapre3b* + MO *ccdc28b*). A la derecha, cuantificación del diámetro de los ojos que sugiere la existencia de interacción genética, ya que se observa una disminución en el diámetro de los ojos en los embriones inyectados con las dosis sub-óptimas de los 3 MO juntos en comparación a los embriones inyectados con las dosis sub-óptimas por separado ($239.72\mu\text{m} \pm 4.12\mu\text{m}$ en MO *ccdc28b* + MO Std, $245.45\mu\text{m} \pm 11.54\mu\text{m}$ MO *mapre3a* + MO *mapre3b* + MO Std., $209.79\mu\text{m} \pm 8.53\mu\text{m}$ en MO *mapre3a* + MO *mapre3b* + MO *ccdc28b*, $p < 0.05$).

Además de los ensayos de interacción, realizamos un experimento en el cual intentamos rescatar el fenotipo general de los morfantes *mapre3* mediante la sobre-expresión de *ccdc28b*. Si efectivamente EB3 y Ccdc28b participan en la misma vía, pensamos que este tipo de experimento nos podría brindar información para entender en mayor profundidad la relación funcional entre estas proteínas. En un modelo simplista, si por ejemplo Ccdc28b actúa “downstream” de Mapre3 en esta vía, esperamos que al sobre-expresarla en los embriones morfantes de *mapre3* sea capaz de rescatar el fenotipo. Para esto inyectamos ARNm de *ccdc28b*, producido *in vitro*, en los doble morfantes de *mapre3*. Cuantificamos y comparamos fenotipo, largo del cuerpo y tamaño de ojos, en embriones vivos de 48hpi inyectados únicamente con ARNm de *ccdc28b*, solo con MO *mapre3a+b* y co-inyectados con ARNm de *ccdc28b* y MO *mapre3a+b*. En ningún caso la sobreexpresión de Ccdc28b rescató el fenotipo (Fig.25). Para completar el estudio habría que realizar el experimento complementario, inyectando ARNm de *mapre3* en morfantes *ccdc28b*.

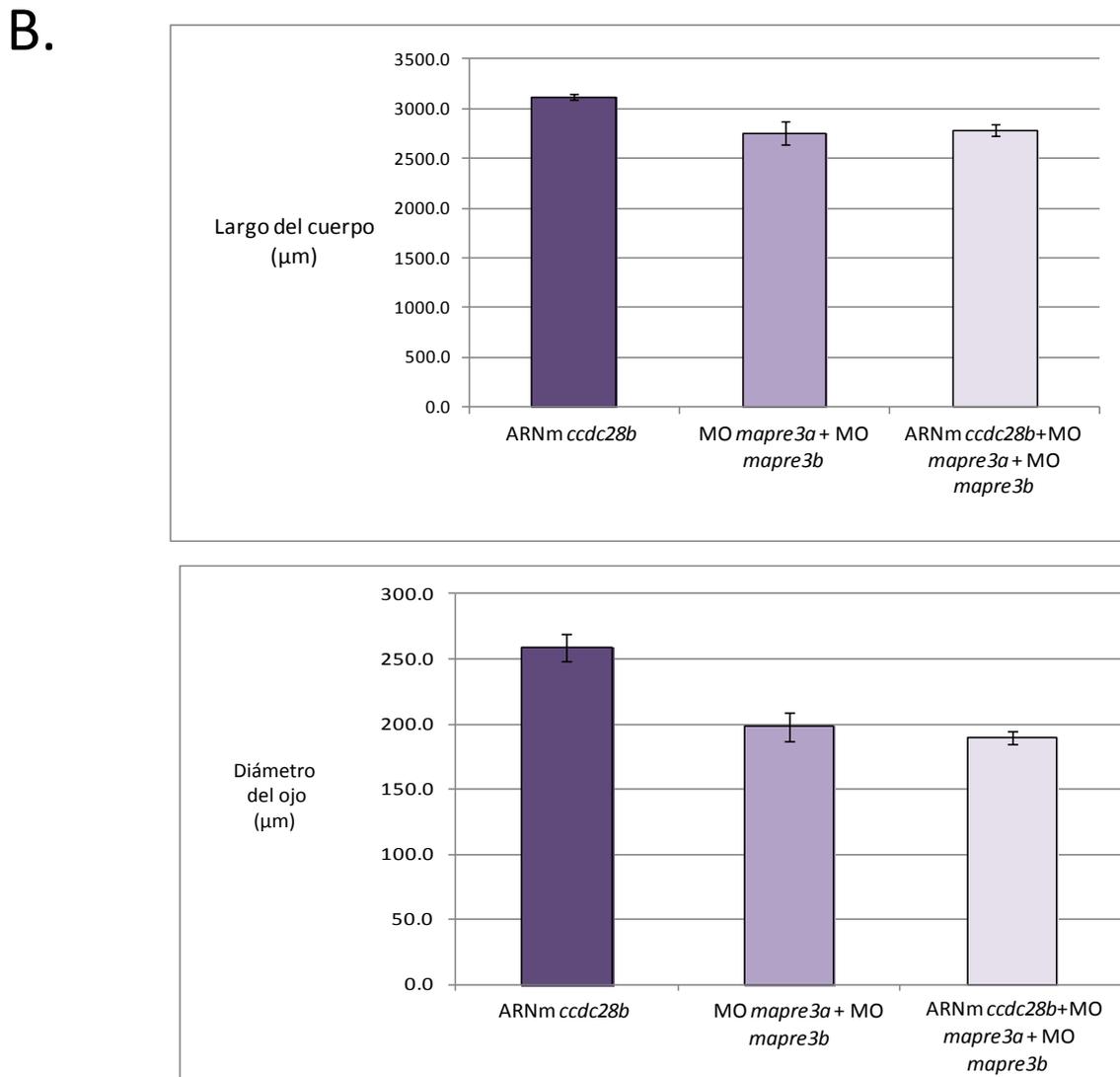


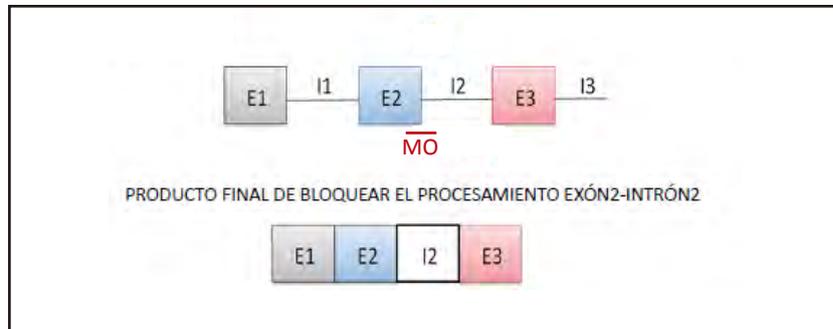
Fig.25. Ensayo de rescate. A. Vista lateral de embriones vivos de 48 horas inyectados con ARNm de *ccdc28b*, con MO *mapre3a*+ MO *mapre3b* y co-inyectados con ARNm de *ccdc28b* y MO *mapre3a* + MO *mapre3b*. **B.** Cuantificación del fenotipo, largo del cuerpo y diámetro del ojo. No se observan diferencias significativas, en el tamaño del cuerpo ni el de los ojos, cuando se inyecta ARNm de *ccdc28b* en los morfantes de *mapre3* respecto a los embriones inyectados únicamente con MO *mapre3a* + MO *mapre3b* (2781.4µm ± 59.4µm vs 2757.4µm ± 115.7µm para el largo del cuerpo respectivamente y 189.5µm ± 5.0 vs 197.8µm ± 10.8µm para el diámetro del ojo respectivamente, $p > 0.05$).

Puesta a punto de morfolino y comienzo de la caracterización de los morfantes de *klc1*

Si bien nuestro mayor esfuerzo se enfocó en la caracterización de la interacción CCDC28B-EB3, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, tanto en lo que respecta a los estudios de localización y la actividad mTORC2, sugieren que KLC1 pudiera ser importante para entender el rol biológico de CCDC28B. Teniendo esto en consideración, decidimos comenzar a evaluar las consecuencias de depletar este gen en pez cebra en el marco de este trabajo de tesis. Comenzamos por buscar el ortólogo de *KLC1* en pez cebra, que en este caso no estaría duplicado, y diseñamos un morfolino tipo splice (reteniendo el intrón2) para bajar su expresión. La retención de este intrón produce un cambio en el marco abierto de lectura que resulta en la introducción de un codón de terminación prematuro en el producto final (Fig.26A).

Hasta el momento hemos determinado la dosis de inyección de MO con la que vamos a trabajar y hemos caracterizado el fenotipo externo de los embriones morfantes. Inyectando 9ng de MO para *klc1*, los embriones a las 48 hpi presentan defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia) y cuerpos más cortos y curvados (Fig. 26B). Nuevamente, estos fenotipos son compartidos con los morfantes de *ccdc28b* y *mapre3* (menos el cuerpo curvado con éstos últimos) así como con otros morfantes de genes ciliares. Para poder confirmar que este fenotipo es debido específicamente a la disminución en la expresión de *klc1* todavía debemos verificar el funcionamiento del MO por RT-PCR. Luego nos proponemos continuar con la caracterización de estos morfantes analizando diferentes estructuras ciliadas como la KV o los pronefros. A su vez para analizar si el fenotipo posiblemente ciliar que observamos está relacionado con CCDC28B realizaremos ensayos de interacción genética y de rescate como los descritos anteriormente para *mapre3*.

A.



B.

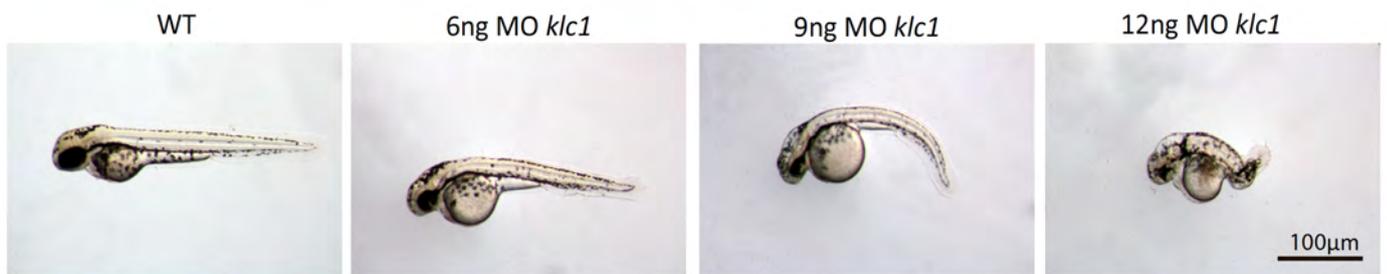


Fig.26. Diseño del MO y caracterización fenotípica del morfante de *klc1*. A. Representación esquemática del modo de acción del morfolino diseñado. El MO *klc1* se une a los límites exón2-intrón2 y bloquea el sitio de splice generando la retención del intrón2. B. Vista lateral de embriones vivos de 48 horas. Morfología general de los embriones WT (sin inyectar) y de los embriones morfantes inyectados con dosis crecientes de MO *klc1*. Con la dosis de 6ng solo algunos embriones presentan fenotipo y éste es muy leve, con la dosis de 9ng todos los embriones presentan un fenotipo marcado: defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia) y cuerpo más corto y curvado. La dosis de 12ng es claramente tóxica con alta tasa de mortalidad y fenotipo muy severo.

4. DISCUSIÓN

Este proyecto apuntó a complementar otros trabajos que se están desarrollando en el laboratorio donde se ha apuntado a entender el rol biológico del modificador secundario de BBS, *CCDC28B*, partiendo de resultados preliminares obtenidos durante mi tesis de grado. En este contexto, el objetivo general de este trabajo fue continuar con la caracterización funcional de *CCDC28B*, para tratar de ganar información acerca del mecanismo por el cual esta proteína regula ciliogénesis y la actividad de la vía mTOR, los dos roles principales que se le han asignado, así como potencialmente identificar otras posibles funciones que pueda tener. Para esto intentamos obtener datos acerca de la regulación de la expresión y localización de *CCDC28B*, analizando diferentes condiciones de cultivo, y continuamos con la confirmación y caracterización de interactores previamente identificados durante mi tesis de grado.

4.1 Análisis de la localización de *CCDC28B*

Determinar el patrón de localización de una proteína en diferentes condiciones aporta datos que resultan fundamentales para entender el rol biológico de una proteína. *CCDC28B* fue originalmente descrita como una proteína centrosómica y de cuerpo basal, presentando un patrón de localización similar al de la mayoría de las proteínas BBS testeadas hasta la fecha (20). Sin embargo, la utilización de un panel de nuevos anticuerpos en el laboratorio que hemos utilizado en ensayos de inmunofluorescencia nos permitió observar señal tanto en el núcleo celular como en el citoplasma donde se ve una señal difusa así como acúmulos próximos a la membrana plasmática. En primer lugar, cabe volver a destacar que no se ha podido determinar completamente la especificidad de nuestros anticuerpos anti-*CCDC28B*, y en el laboratorio continuamos trabajando en este sentido. Una de las dificultades que encontramos al momento de determinar la especificidad del patrón de localización que observamos con nuestros anticuerpos, por ejemplo realizando ensayos de inmunofluorescencia en células tratadas con ARNi para *CCDC28B*, fue la alta heterogeneidad en los patrones de localización entre diferentes células de un mismo cultivo que sugieren que el patrón de localización de *CCDC28B* es dinámico.

Dicho esto sin embargo, nos resultó sumamente interesante la posibilidad de que esta proteína se pudiera localizar tanto en el núcleo como en forma de acúmulos en asociación o proximidad a la membrana plasmática. A su vez, los cambios de expresión de *CCDC28B* observados en cultivos de baja y alta densidad, no solo se correlacionaron con un aumento en los niveles de la proteína, sino también con una relocalización de la misma. Vimos que en cultivos de baja densidad la localización de *CCDC28B* es más difusa, observándose señal por todo el citoplasma, mientras que en cultivos de alta densidad se observa una mayor concentración en el núcleo y acúmulos en proximidad a la membrana plasmática. Dado lo mencionado anteriormente, una posibilidad que será interesante analizar es si estos cambios en la localización de *CCDC28B* se corresponden con una translocación de *SIN1* a la membrana y con cambios en la actividad del complejo mTORC2 medidos por fosforilación de Akt.

SIN1 (interactor directo de *CCDC28B* y miembro del complejo mTORC2) se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo y presenta un dominio PH que media la interacción con lípidos y otras proteínas y que podría servir para dirigir al complejo mTORC2 a la localización de membrana donde principalmente fosforila y activa a AKT. Por lo tanto, esta potencial localización de *CCDC28B* podría brindarnos pistas importantes para entender su relación funcional con *SIN1*. Interesantemente, resultados no publicados de nuestro grupo indican que *CCDC28B* participaría en el mecanismo de translocación de *SIN1* entre el compartimento nuclear y el citoplasma, ya que la ausencia de *CCDC28B* determina una mayor retención de *SIN1* dentro del núcleo (tesis de doctorado de Magdalena Cárdenas-Rodríguez).

El trabajo realizado en esta tesis también apuntó a tratar de entender el mecanismo de translocación de *CCDC28B* hacia sus diferentes destinos subcelulares. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de que el esqueleto de microtúbulos forme parte de este mecanismo. Por un lado observamos que cuando el esqueleto de microtúbulos se encuentra afectado, ya no se observan acúmulos próximos a la membrana, observándose principalmente una tinción citoplasmática homogénea, lo cual sugiere que *CCDC28B* requeriría de los microtúbulos para alcanzar su localización. Por otro lado, dos de los

interactores de CCDC28B confirmados y caracterizados en este trabajo, EB3 y KLC1, son proteínas asociadas a los microtúbulos y al transporte basado en microtúbulos. Interesantemente, al bajar su expresión mediante ARNi y analizar el efecto sobre la localización de CCDC28B, pudimos observar que las células donde se bajó la expresión de *MAPRE3* y *KLC1* mostraron mayor intensidad de señal dentro del núcleo y los acúmulos, que en las células control se encuentran principalmente próximos a la membrana plasmática, aparecen dispersos en el citoplasma, de alguna manera reproduciendo el fenotipo mostrado por el efecto de desestabilizar el esqueleto de microtúbulos. Estos resultados son sumamente interesantes ya que sugieren que tanto EB3 como KLC1 podrían estar participando en regular la localización subcelular de CCDC28B, ya sea en lo que respecta a la localización nuclear como a la llegada de CCDC28B a la membrana plasmática. Para confirmar esta posibilidad sin embargo, será fundamental poder cuantificar los cambios observados. En forma complementaria, y dada las dificultades y la incertidumbre que nos plantea el uso de nuestro anticuerpo en inmunofluorescencia, una alternativa es continuar explorando la posible relación funcional entre los microtúbulos, CCDC28B y los interactores, mediante ensayos *in vitro*. Realizando experimentos de sedimentación *in vitro* de microtúbulos por ejemplo, se podría analizar si CCDC28B co-sedimenta con microtubulos en lisados de células normales y en lisados depletados de EB3 o KLC1 y de esta forma determinar si CCDC28B interactúa, al menos indirectamente, con microtúbulos y si la interacción depende de la presencia de alguno de los interactores.

4.2 Análisis de la expresión de CCDC28B

Al igual que conocer los mecanismos que regulan la localización de una proteína brinda información importante para comprender su función, determinar cómo cambia la expresión de un gen también aporta datos que resultan fundamentales para entender el rol biológico de una proteína.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que CCDC28B, a través de su interacción con SIN1, regula tanto el largo de las cilias así como la actividad del complejo mTORC2. Es importante resaltar que no solo la depleción de CCDC28B resultó en fenotipos observables en ambos procesos sino que también, y en el caso de mTORC2, se observó un aumento en la actividad del complejo al sobre-expresar CCDC28B (36). Teniendo estos datos

en cuenta, resultaba de sumo interés poder comenzar a explorar la posibilidad de que los niveles de CCDC28B endógenos estuvieran regulados, y si fuera así en qué condiciones, ya que nos informaría acerca de la relación fisiológica entre CCDC28B, SIN1, mTORC2 y ciliogénesis. Como punto de partida de nuestros estudios nos centramos en dos condiciones de cultivo, baja y alta densidad, que *a priori* pensamos se relacionarían directamente con un porcentaje bajo y alto de células ciliadas respectivamente. De manera interesante, observamos un aumento significativo en los niveles de *Ccdc28b* en la condición de alta densidad respecto a la de baja, así como cambios significativos en los niveles de proteína entre cultivos metabólicamente diferentes que mostraron un aumento de la expresión en cultivos en fase estacionaria. Sin embargo, nuestro análisis posterior demostró que las células NIH3T3 fueron capaces de ciliar en baja y alta densidad en proporciones comparables. Estos resultados sugieren que efectivamente la expresión de CCDC28B se encuentra regulada, si bien esta regulación no dependería directamente de las ciliadas.

Al momento del comienzo de esta tesis, la posibilidad de que las ciliadas, organelos especializados en transducción de señales, participaran directamente en la regulación de CCDC28B surgía como una hipótesis razonable. Sin embargo, en el transcurso de esta tesis, y como ya fue mencionado, se observó que CCDC28B participa activamente en la biología de las ciliadas dado que su depleción, tanto en células como *in vivo*, resulta en una reducción en el largo de estos organelos. En este contexto, CCDC28B estaría “upstream” de las ciliadas regulando su formación/largo y por tanto su regulación no tendría que depender de estas. Esto último lo corroboramos en forma directa mediante la depleción de proteínas importantes para el mantenimiento de las ciliadas como lo son IFT88 y KIF3A, condiciones en las que no vimos cambios en los niveles de ARNm de *CCDC28B*.

Una posibilidad es que la expresión de CCDC28B aumente en respuesta a señales causadas por la interacción entre las células en el cultivo, por ejemplo respondiendo al contacto célula-célula. Una observación que resultó interesante es que plaqueando las células a diferentes densidades (baja y alta) el día previo a la extracción de ARN y proteína, observamos un aumento significativo en los niveles de ARNm de *CCDC28B* en cultivos confluentes pero estos no se correspondieron con cambios significativos a nivel de proteína. Con este protocolo, plaqueando células a diferentes densidades, logramos alcanzar niveles altos de confluencia en un período corto de tiempo que quizás no fue suficiente para observar a nivel de proteína el aumento que si detectamos en los niveles de ARNm. Por el

contrario, cuando partimos de igual cantidad de células y comparamos cultivos de baja y alta densidad y con perfiles metabólicos claramente diferentes a los 4 y 8 días de cultivo respectivamente, observamos un aumento significativo en los niveles de proteína de *CCDC28B* a los 8 días, cambio que esta vez no fue evidente a nivel de ARNm. Dada la dinámica de estos cultivos, es posible que i) que el aumento en la expresión de *CCDC28B* se haya dado previo a los cuatro días, ii) que la sobre-expresión de *CCDC28B* se de por un período determinado de tiempo o iii) que la propia *CCDC28B* participe en un sistema de retroalimentación negativo que termine regulando su propia expresión. A futuro, será importante discriminar entre estas diferentes posibilidades, por ejemplo, realizando un experimento donde se analice la expresión de *CCDC28B*, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento.

A su vez, evaluamos si los cambios en expresión de *CCDC28B* se correlacionaban con alguna etapa del ciclo celular observando un aumento significativo de su expresión en células en G0/G1 en comparación con células tanto en fase S como en G2. Sin embargo, dada la metodología que utilizamos para sincronizar células y enriquecer cultivos en las diferentes etapas, las células en G0/G1 podrían corresponderse con los cultivos confluentes o de alta densidad, mientras que las muestras enriquecidas en células en fase S y G2 podrían asimilarse con nuestros cultivos de baja densidad. Para determinar si las diferencias en expresión que observamos en los cultivos de baja y alta densidad se pueden explicar por diferencias en el ciclo celular, se deberá evaluar el perfil de ciclo por citometría de flujo en las diferentes condiciones de cultivo que se utilizaron en este trabajo.

Por lo tanto, si bien pudimos determinar que la expresión de *CCDC28B* se encuentra regulada, comprender en mayor profundidad este proceso seguramente será crítico para continuar disecando su rol en el proceso de regulación del largo de las cilias así como su relación con SIN1 y mTORC2. Las fases G0/G1 es donde las células deben sentir y responder a las señales que reciben del entorno para decidir si es un buen momento para dividirse (abundantes nutrientes, hormonas apropiadas) o no lo es. En este proceso a su vez se ha visto que es fundamental la presencia de la cilia y por tanto, que la expresión de *CCDC28B* esté aumentada durante estas etapas podría correlacionarse con su rol en el proceso de formación y mantenimiento de este organelo. Por otro lado durante G0/G1 las células tienen que crecer y almacenar nutrientes para las etapas más “activas” del ciclo y para esto su citoesqueleto sufre grandes rearrreglos. El aumento de expresión de *CCDC28B* durante

esta etapa, podría implicar un aumento de la actividad de mTORC2 y a través de este complejo participar en la reorganización del citoesqueleto de actina (39).

Por último, el hecho de que la expresión de CCDC28B se vea aumentada en cultivos confluentes y células en G0/G1 plantea la posibilidad de que esta proteína juegue un rol en la regulación de la progresión del ciclo celular, posibilidad que será muy interesante evaluar por ejemplo combinando ensayos de ARNi y citometría de flujo.

En suma, nuestros datos indican que la expresión de CCDC28B cambia en diferentes condiciones de cultivo y etapas del ciclo celular independientemente de la presencia-ausencia de cilia. Su expresión dinámica parecería estar finamente regulada en el tiempo y esto posiblemente tenga relación con su función tanto en ciliogénesis como en el contexto de mTORC2.

4.3 Caracterización de los interactores

Para continuar evaluando la relación funcional entre CCDC28B y sus interactores decidimos enfocarnos en las actividades conocidas y reportadas para CCDC28B tanto en ciliogénesis como en el contexto de mTORC2.

Fue reportado por nuestro grupo que CCDC28B actúa como un regulador positivo de la vía de mTORC2 facilitando el ensamblado o promoviendo la estabilidad del complejo. Se demostró que una reducción de los niveles de CCDC28B, tanto en células en cultivo como *in vivo* en el pez cebra, resulta en una reducción significativa en los niveles de fosfo-AKT(S473) (reportero de la actividad de mTORC2). En este trabajo observamos una disminución en los niveles de fosfo-AKT (S473) cuando bajamos la expresión de *Mapre3* y *Klc1*. Dado que EB3 y KLC1 afectan la actividad de mTORC2 en el mismo sentido que CCDC28B, es posible que lo estén haciendo a través de modificar la funcionalidad de CCDC28B. KLC1 y EB3 podrían ser las responsables de que CCDC28B, a través de su interacción con SIN1, facilite la relocalización o ensamblaje del complejo mTORC2 en el sitio de fosforilación de AKT. Para probar esta posibilidad será necesario realizar por ejemplo ensayos de interacción génica donde se disminuyan los niveles de CCDC28B junto con EB3 o KLC1 y se observe si la actividad del complejo se encuentra más afectada. Otra posibilidad podría ser sobre-

expresar CCDC28B en un background donde EB3 y/o KLC1 hayan sido depletadas comparando estas condiciones con la sobre-expresión de CCDC28B en condiciones control donde sabemos resulta en un aumento de la actividad de mTORC2.

Es interesante que los resultados obtenidos con la depleción de EB3 y KLC1 en relación a los niveles de fosfo AKT van en el mismo sentido, y parecen apoyar, lo sugerido anteriormente respecto a la potencial importancia de la interacción entre CCDC28B con KLC1 y CCDC28B con EB3 para alcanzar su localización de membrana. En el contexto de su función en la vía de mTORC2, KLC1 podría mediar la unión de CCDC28B a la KINESINA1, facilitando así el transporte de CCDC28B hacia el extremo positivo de los microtúbulos donde podría interactuar con EB3 y ubicarse próxima a la membrana plasmática, principal sitio de fosforilación de AKT. Una posibilidad es que KLC1 transporte solo a CCDC28B y esta, una vez próxima a la membrana, reclute mTORC2 al sitio de activación de AKT a través de su interacción con SIN1. Otra posibilidad es que KLC1 transporte a CCDC28B unido al complejo mTORC2 a través de su interacción con SIN1 y de esta forma acerque el complejo a la membrana plasmática. El homólogo de EB3 en levaduras, Mal3, forma parte de un complejo junto con otras +TIP (plus-end- tracking proteins) en el extremo positivo de los microtúbulos, que estabiliza los microtúbulos y es crucial para depositar Tea1 (Tip elongation aberrant protein1) y Tip1 (Tip elongation protein 1) en la membrana donde inician el remodelado de actina para el crecimiento polarizado de la levadura (91). Dado esto, quizás la interacción de EB3 con CCDC28B en el extremo positivo de los microtúbulos, sea importante para retener CCDC28B próxima a la membrana o para depositarla en ella.

Además de modular la actividad de mTORC2, nuestro grupo reportó que inhibir la expresión de *CCDC28B* afecta ciliogénesis (32). Es interesante que recientemente también se mostró que EB3 juega un rol en ciliogénesis, ya que su depleción en células en cultivo disminuye la cantidad de células ciliadas (47). Nuestros resultados en células en cultivo bajando la expresión de EB3 y KLC1 sin embargo no mostraron efectos importantes en el número y largo de las ciliadas. Dada la discrepancia con lo reportado, al menos para EB3, no podemos descartar la posibilidad de que se deba a un problema técnico. Por este motivo, para continuar estudiando la posible relevancia fisiológica de la interacción de CCDC28B con EB3 y KLC1 en el contexto de su función ciliar, decidimos enfocarnos en un modelo *in vivo*, el pez cebra (*Danio rerio*). Evaluando el fenotipo general de los embriones morfantos de *mapre3*

observamos que los embriones presentan cuerpo más corto, defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia) y edema pericárdico. Resultó interesante, que algunos de estos fenotipos, como la hidrocefalia, el cuerpo más corto y los ojos más pequeños son compartidos con los morfantes de *ccdc28b* así como con otros morfantes de genes ciliares (17, 28, 32, 92-95). El acortamiento del largo del cuerpo del embrión se ha demostrado que es consecuencia de defectos en los movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación que son mediados por la vía PCP, una de las vías de señalización que está relacionada con la función de las cilias primarias (28, 96, 97). La hidrocefalia es causada típicamente por un defecto en la motilidad de las cilias móviles del epitelio que recubre los ventrículos cerebrales (98) 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 (99). El fenotipo externo observado en los morfantes de *mapre3* podría deberse a defectos ciliares ya que analizando el epitelio que recubre los conductos de los pronefros encontramos que los morfantes de *mapre3* presentan el mismo tipo de desorganización de sus cilias reportado para los morfantes de *ccdc28b* (32) y analizando las cilias en la vesícula de Kupffer (KV) observamos una reducción leve, aunque estadísticamente significativa, en el largo de las cilias. Será interesante continuar estudiando posibles defectos en las cilias de estos morfantes analizando otros órganos ciliados como ser el bulbo olfatorio, el oído o las cilias del tubo neural.

Para intentar determinar si el fenotipo posiblemente ciliar de EB3 estaba relacionado con su interacción con CCDC28B realizamos un ensayo de interacción génica y luego uno de rescate. Los ensayos de interacción génica sugieren que existiría una interacción genética entre *mapre3* y *ccdc28b*, en la etiología de por lo menos algunos de los fenotipos observados. La sobre-expresión de *ccdc28b* sin embargo no rescató el fenotipo general de los morfantes *mapre3*, por lo cual una posibilidad es que *Ccdc28b* no actúe downstream de *Eb3*. Formalmente, y sin tener en cuenta la globalidad de nuestros resultados, otra alternativa podría ser que *Eb3* actúe downstream de *Ccdc28b*, posibilidad que se podría testear realizando el experimento contrario: sobreexpresar *mapre3* en morfantes de *ccdc28b*. Una tercera posibilidad, la cual sería compatible con nuestros otros resultados, e inclusive los apoyaría, es que la relación entre estas proteínas no sea lineal y por ejemplo *Ccdc28b* sea de alguna manera la proteína efectora pero que requiera de la presencia de

Eb3 para llevar adelante su función. En este contexto, el ensayo de rescate podría haber fallado porque si bien existía un aumento en los niveles de *Ccdc28b*, la cantidad de Eb3 disponible resultó ser limitante. En suma, nuestros resultados *in vivo* sugieren que la interacción entre CCDC28B con EB3 podría ser fisiológicamente importante.

La interacción de CCDC28B con EB3 también podría brindar información acerca del mecanismo por el cual CCDC28B regula el largo de las cilias. En el trabajo donde se reporta el rol de EB3 en ciliogenesis, muestran que EB3 se localiza también en el extremo negativo de los microtubulos anclados al centrosoma, donde cumple una función que es independiente a su función en el extremo positivo de los microtúbulos (47). Dado que CCDC28B fue originalmente reportada como una proteína centrosómica (20), podría interactuar también allí con EB3 y esta interacción ser importante para cumplir su rol en ciliogénesis. En el trabajo mencionado anteriormente, muestran que en células depletadas de EB3 las cilias son más cortas, el arreglo de microtubulos que rodea el cuerpo basal se encuentra desorganizado y se observa acumulación de vesículas alrededor o dentro de la cilia. También se mostró que EB3 interactúa con varias proteínas de función ciliar o centrosómica conocida, entre ellas PCM1 (Pericentriolar matrix 1 protein). PCM1 interactúa con BBS4, un interactor de CCDC28B, para promover el transporte mediado por dineína de vesículas conteniendo proteínas ciliares a la base de la cilia (25, 82, 100, 101). Proponen entonces, que depletar EB3 podría afectar ciliogénesis porque desestabiliza el anclaje de los microtúbulos al centrosoma lo cual afectaría el transporte de precursores ciliares a la base de la cilia. En este contexto, CCDC28B podría mediar interacciones entre las proteínas BBS, PCM1 y EB3.

La capacidad de CCDC28B de regular el largo de la cilia depende, al menos en parte, de su interacción con SIN1 (36). Sin embargo, CCDC28B es una proteína que fue identificada como modificador secundario de BBS por su interacción con BBS4 y otras proteínas BBS que conforman el BBSoma. El BBSoma es un complejo involucrado en el transporte de vesículas a la cilia (102). Por tanto, es posible que la interacción de CCDC28B con EB3 pueda cumplir un rol en el transporte mediado por el BBSoma. Para probar la hipótesis de que CCDC28B esté involucrada en el tráfico vesicular de proteínas a la cilia sería interesante bajar su expresión y observar por microscopía electrónica si esto produce una alteración en la abundancia de vesículas alrededor o en la base de la cilia.

En el marco de esta tesis elegimos enfocarnos en la caracterización de la interacción CCDC28B-EB3 debido al rol directo en ciliogénesis reportado para EB3 y debido a que, aparte del muy bien caracterizado complejo motor de la Kinesina2 (responsable del movimiento anterógrado de proteínas ciliares hacia la punta de la cilia) poco se conoce del rol en ciliogénesis de otros miembros de la superfamilia de las Kinesinas. Sin embargo se ha reportado que cadenas livianas de la KINESINA1, entre ellas KLC1, interactúan con una estructura fibrosa en forma de red asociada al cuerpo basal denominada “ciliary rootlet”, que juega un rol en el transporte intracelular brindando un esqueleto para el transporte intracelular de proteínas ciliares (67, 68). Por este motivo pensamos que caracterizar en profundidad la interacción CCDC28B-KLC1 será importante para entender el rol biológico de CCDC28B tanto en ciliogénesis como en lo que respecta a mTORC2, y los resultados obtenidos en esta tesis apoyan esta posibilidad. En este trabajo comenzamos a evaluar las consecuencias de depletar *KLC1* en pez cebra, donde los embriones morfantes *klc1* presentaron defectos en la cabeza (ojos más pequeños y prominente hidrocefalia) y cuerpos más cortos y curvados. Nuevamente, estos fenotipos son compartidos con los morfantes de *ccdc28b* y *mapre3*. Será importante continuar con la caracterización de estos morfantes analizando diferentes estructuras ciliadas y para evaluar si el fenotipo general posiblemente ciliar que observamos está relacionado con CCDC28B se podrán realizar ensayos de interacción genética y de rescate como los descritos anteriormente para *mapre3*. Dado lo reportado y nuestros resultados preliminares, KLC1 podría estar participando en el rol ciliar de CCDC28B y lo podría estar haciendo al mediar, a través de la KINESINA1, el transporte de CCDC28B (o del complejo al que este unido).

Estudios adicionales, sumado a la caracterización en células que pueda brindar datos mecanísticos, serán necesarios para entender completamente el vínculo de CCDC28B con EB3 y de CCDC28B con KLC1. A pesar de esto, los resultados obtenidos en este trabajo, junto con lo reportado respecto a la función de CCDC28B y sus interactores, nos permite hipotetizar un escenario en el cual CCDC28B requeriría de EB3 y KLC1 tanto para realizar su función como activador de la vía de mTOR, así como para cumplir su rol ciliar que en parte podría cumplir participando en el transporte de proteínas hacia la cilia.

5. REFERENCIAS

1. Christensen, S.T., Pedersen, L.B., Schneider, L. and Satir, P. **Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease.** *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8, 97-109,(2007).
2. Gerdes, J.M. and Katsanis, N. **Ciliary function and Wnt signal modulation.** *Current topics in developmental biology*, 85, 175-95,(2008).
3. Cardenas-Rodriguez, M. and Badano, J.L. **Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies.** *American journal of medical genetics*, 151C, 263-80,(2009).
4. Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y. and Hamada, H. **Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow.** *Nature*, 418, 96-9,(2002).
5. Basu, B. and Brueckner, M. **Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right asymmetry.** *Current topics in developmental biology*, 85, 151-74,(2008).
6. Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L. and Katsanis, N. **The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders.** *Annual review of genomics and human genetics*, 7, 125-48,(2006).
7. Szymanska, K. and Johnson, C.A. **The transition zone: an essential functional compartment of cilia.** *Cilia*, 1, 10
8. Hildebrandt, F., Benzing, T. and Katsanis, N. **Ciliopathies.** *The New England journal of medicine*, 364, 1533-43
9. Pedersen, L.B. and Rosenbaum, J.L. **Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling.** *Current topics in developmental biology*, 85, 23-61,(2008).
10. Badano, J.L. and Katsanis, N. **Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission.** *Nature reviews*, 3, 779-89,(2002).
11. Zaghoul, N.A. and Katsanis, N. **Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy.** *The Journal of clinical investigation*, 119, 428-37,(2009).
12. Forsythe, E. and Beales, P.L. **Bardet-Biedl syndrome.** *Eur J Hum Genet*, 21, 8-13
13. Katsanis, N., Ansley, S.J., Badano, J.L., Eichers, E.R., Lewis, R.A., Hoskins, B.E., Scambler, P.J., Davidson, W.S., Beales, P.L. and Lupski, J.R. **Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a mendelian recessive disorder.** *Science*, 293, 2256-2259,(2001).
14. Badano, J.L., Kim, J.C., Hoskins, B.E., Lewis, R.A., Ansley, S.J., Cutler, D.J., Castellan, C., Beales, P.L., Leroux, M.R. and Katsanis, N. **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,(2003).
15. Beales, P.L., Badano, J.L., Ross, A.J., Ansley, S.J., Hoskins, B.E., Kirsten, B., Mein, C.A., Froguel, P., Scambler, P.J., Lewis, R.A. *et al.* **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,(2003).
16. Kim, J., Lee, J.E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P. and Gleeson, J.G. **Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length.** *Nature*, 464, 1048-51,(2010).
17. Leitch, C.C., Zaghoul, N.A., Davis, E.E., Stoetzel, C., Diaz-Font, A., Rix, S., Al-Fadhel, M., Lewis, R.A., Eyaid, W., Banin, E. *et al.* **Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome.** *Nat Genet*, 40, 443-448,(2008).
18. Marion, V., Stutzmann, F., Gérard, M., De Melo, C., Schaefer, E., Claussmann, A., Hellé, S., Delague, V., Souied, E., Barrey, C. *et al.* **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,(2012).

19. Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M. *et al.* **Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome.** *Nature*, 425, 628-633,(2003).
20. Badano, J.L., Leitch, C.C., Ansley, S.J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R.A., Beales, P.L., Dietz, H.C., Fisher, S. and Katsanis, N. **Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome.** *Nature*, 439, 326-330,(2006).
21. Fan, Y., Esmail, M.A., Ansley, S.J., Blacque, O.E., Boroevich, K., Ross, A.J., Moore, S.J., Badano, J.L., May-Simera, H., Compton, D.S. *et al.* **Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome.** *Nat Genet*, 36, 989-993,(2004).
22. Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J. *et al.* **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,(2004).
23. Kim, J.C., Ou, Y.Y., Badano, J.L., Esmail, M.A., Leitch, C.C., Fiedrich, E., Beales, P.L., Archibald, J.M., Katsanis, N., Rattner, J.B. *et al.* **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,(2005).
24. Loktev, A.V., Zhang, Q., Beck, J.S., Searby, C.C., Scheetz, T.E., Bazan, J.F., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., Jackson, P.K. and Nachury, M.V. **A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation.** *Dev Cell*, 15, 854-865,(2008).
25. 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. *et al.* **A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis.** *Cell*, 129, 1201-1213,(2007).
26. Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E.M. and Sheffield, V.C. **BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes.** *Hum Mol Genet*, 21, 1945-1953,(2012).
27. Gerdes, J.M. and Katsanis, N. **Ciliary function and Wnt signal modulation.** *Curr Top Dev Biol*, 85, 175-195,(2008).
28. Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S. *et al.* **Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates.** *Nat Genet*, 37, 1135-1140,(2005).
29. Gascue, C., Tan, P.L., Cardenas-Rodriguez, M., Libisch, G., Fernandez-Calero, T., Liu, Y.P., Astrada, S., Robello, C., Naya, H., Katsanis, N. *et al.* **Direct role of Bardet-Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation.** *J Cell Sci*, 125, 362-375,(2012).
30. Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C. *et al.* **Comparative genomic identification of conserved flagellar and basal body proteins that includes a novel gene for Bardet-Biedl syndrome.** *Cell*, 117, 541-552,(2004).
31. Gherman, A., Davis, E.E. and Katsanis, N. **The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia.** *Nat Genet*, 38, 961-962,(2006).
32. Cardenas-Rodriguez, M., Osborn, D.P., Irigoín, F., Graña, M., Beales, P.L. and Badano, J.L. **Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome.** *Hum Genet*, 132, 91-105,(2012).
33. Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S.V. **Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.** *Trends Cell Biol*, 11, 82-88,(2001).
34. Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F. and Jones, D.T. **Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life.** *J Mol Biol*, 337, 635-645,(2004).

35. Dinkel, H., Michael, S., Weatheritt, R.J., Davey, N.E., Van Roey, K., Altenberg, B., Toedt, G., Uyar, B., Seiler, M., Budd, A. *et al.* **ELM--the database of eukaryotic linear motifs.** *Nucleic Acid Res*, 40, D242-251,(2012).
36. Cardenas-Rodriguez, M., Irigoien, F., Osborn, D.P., Gascue, C., Katsanis, N., Beales, P.L. and Badano, J.L. **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*
37. Laplante, M. and Sabatini, D.M. **mTOR signaling at a glance.** *J Cell Sci*, 122, 3589-3594,(2009).
38. Laplante, M. and Sabatini, D.M. **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell*, 149, 274-93,(2012).
39. Oh, W.J. and Jacinto, E. **mTOR complex 2 signaling and functions.** *Cell Cycle*, 10, 2305-2316,(2011).
40. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** *Science*, 307, 1098-1101,(2005).
41. 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. *et al.* **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,(2006).
42. DiBella, L.M., Park, A. and Sun, Z. **Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway.** *Hum Mol Genet*, 18, 595-606,(2009).
43. Yuan, S., Li, J., Diener, D.R., Choma, M.A., Rosenbaum, J.L. and Sun, Z. **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,(2012).
44. Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M. *et al.* **Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1.** *Nat Cell Biol*, 12, 1115-1122,(2010).
45. Kesavan, K., Lobel-Rice, K., Sun, W., Lapadat, R., Webb, S., Johnson, G.L. and Garrington, T.P. **MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts.** *J Cell Physiol*, 199, 140-148,(2004).
46. Cheng, J., Zhang, D., Kim, K., Zhao, Y., Zhao, Y. and Su, B. **Mip1, an MEKK2-interacting protein, controls MEKK2 dimerization and activation.** *Mol Cell Biol*, 25, 5955-5964,(2005).
47. Schroder, J.M., Larsen, J., Komarova, Y., Akhmanova, A., Thorsteinsson, R.I., Grigoriev, I., Manguso, R., Christensen, S.T., Pedersen, S.F., Geimer, S. *et al.* **EB1 and EB3 promote cilia biogenesis by several centrosome-related mechanisms.** *J Cell Sci*, 124, 2539-51
48. Lansbergen, G. and Akhmanova, A. **Microtubule plus end: a hub of cellular activities.** *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7, 499-507,(2006).
49. Juwana, J.P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J.W., Hoogenboom, H., Pfreundschuh, M. and Renner, C. **EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins.** *International journal of cancer*, 81, 275-84,(1999).
50. De Groot, C.O., Jelesarov, I., Damberger, F.F., Bjelic, S., Scharer, M.A., Bhavesh, N.S., Grigoriev, I., Buey, R.M., Wuthrich, K., Capitani, G. *et al.* **Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization.** *The Journal of biological chemistry*, 285, 5802-14
51. Sen, I., Veprintsev, D., Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. **End binding proteins are obligatory dimers.** *PLoS one*, 8, e74448
52. Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. **Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 309-22,(2008).
53. Nakagawa, H., Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T. and Nakamura, Y. **EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue.** *Oncogene*, 19, 210-6,(2000).

54. Duellberg, C., Fourniol, F.J., Maurer, S.P., Roostalu, J. and Surrey, T. **End-binding proteins and Ase1/PRC1 define local functionality of structurally distinct parts of the microtubule cytoskeleton.** *Trends Cell Biol*, 23, 54-63
55. Busch, K.E. and Brunner, D. **The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules.** *Curr Biol*, 14, 548-59,(2004).
56. Komarova, Y., De Groot, C.O., Grigoriev, I., Gouveia, S.M., Munteanu, E.L., Schober, J.M., Honnappa, S., Buey, R.M., Hoogenraad, C.C., Dogterom, M. *et al.* **Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth.** *The Journal of cell biology*, 184, 691-706,(2009).
57. Tirnauer, J.S., Grego, S., Salmon, E.D. and Mitchison, T.J. **EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules.** *Molecular biology of the cell*, 13, 3614-26,(2002).
58. Dixit, R., Barnett, B., Lazarus, J.E., Tokito, M., Goldman, Y.E. and Holzbaur, E.L. **Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 492-7,(2009).
59. Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D. and Surrey, T. **Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro.** *Nature*, 450, 1100-5,(2007).
60. Bieling, P., Kandels-Lewis, S., Telley, I.A., van Dijk, J., Janke, C. and Surrey, T. **CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites.** *The Journal of cell biology*, 183, 1223-33,(2008).
61. Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chretien, D. and Arnal, I. **EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro.** *Nat Cell Biol*, 10, 415-21,(2008).
62. Manna, T., Honnappa, S., Steinmetz, M.O. and Wilson, L. **Suppression of microtubule dynamic instability by the +TIP protein EB1 and its modulation by the CAP-Gly domain of p150glued.** *Biochemistry*, 47, 779-86,(2008).
63. Vale, R.D., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. **Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility.** *Cell*, 42, 39-50,(1985).
64. Hirokawa, N. and Noda, Y. **Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics.** *Physiological reviews*, 88, 1089-118,(2008).
65. Wozniak, M.J. and Allan, V.J. **Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms.** *The EMBO journal*, 25, 5457-68,(2006).
66. Gyoeva, F.K., Bybikova, E.M. and Minin, A.A. **An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex.** *J Cell Sci*, 113 (Pt 11), 2047-54,(2000).
67. Basten, S.G. and Giles, R.H. **Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis.** *Cilia*, 2, 6
68. Yang, J. and Li, T. **The ciliary rootlet interacts with kinesin light chains and may provide a scaffold for kinesin-1 vesicular cargos.** *Experimental cell research*, 309, 379-89,(2005).
69. Ausubel (1994) *Currents Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
70. Campisi, J., Morreo, G. and Pardee, A.B. **Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors.** *Experimental cell research*, 152, 459-66,(1984).
71. Pardee, A.B. **A restriction point for control of normal animal cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1286-90,(1974).
72. Pardee, A.B. **G1 events and regulation of cell proliferation.** *Science*, 246, 603-8,(1989).
73. Kim, J.C., Ou, Y.Y., Badano, J.L., Esmail, M.A., Leitch, C.C., Fiedrich, E., Beales, P.L., Archibald, J.M., Katsanis, N., Rattner, J.B. *et al.* **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, 1007-20,(2005).
74. Jackman, J. and O'Connor, P.M. **Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle.** *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al]*, Chapter 8, Unit 8 3,(2001).

75. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Analytical biochemistry*, 150, 76-85,(1985).
76. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. **Real time quantitative PCR.** *Genome research*, 6, 986-94,(1996).
77. Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. **A novel method for real time quantitative RT-PCR.** *Genome research*, 6, 995-1001,(1996).
78. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. and Wittwer, C.T. **Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.** *Analytical biochemistry*, 245, 154-60,(1997).
79. Pfaffl, M.W. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research*, 29, e45,(2001).
80. Grunwald, D.J. and Eisen, J.S. **Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate.** *Nature reviews*, 3, 717-24,(2002).
81. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. **Stages of embryonic development of the zebrafish.** *Dev Dyn*, 203, 253-310,(1995).
82. Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J. *et al.* **The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression.** *Nat Genet*, 36, 462-70,(2004).
83. Irigoín, F. and Badano, J.L. **Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium.** *Curr Genomics*, 12, 285-297,(2011).
84. Hresko, R.C. and Mueckler, M. **mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes.** *J Biol Chem*, 280, 40406-40416,(2005).
85. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B. **SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity.** *Cell*, 127, 125-137,(2006).
86. Meyer, A. and Schartl, M. **Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions.** *Current opinion in cell biology*, 11, 699-704,(1999).
87. Taylor, J.S., Van de Peer, Y., Braasch, I. and Meyer, A. **Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 356, 1661-79,(2001).
88. Feistel, K. and Blum, M. **Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo.** *Dev Dyn*, 235, 3348-58,(2006).
89. Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B. and Yost, H.J. **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 (Cambridge, England)*, 132, 1247-60,(2005).
90. Kreiling, J.A., Williams, G. and Creton, R. **Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment.** *Dev Dyn*, 236, 1963-9,(2007).
91. Hayles, J. and Nurse, P. **A journey into space.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 647-56,(2001).
92. Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S. *et al.* **BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus.** *Nat Genet*, 38, 521-524,(2006).
93. Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghoul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., Demartino, G.N., Fisher, S. *et al.* **Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response.** *Nat Genet*, 39, 1350-1360,(2007).
94. Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E.E., Zaghoul, N.A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C.C., Sarda, P. *et al.* **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,(2007).
95. Zaghoul, N.A., Liu, Y., Gerdes, J.M., Gascue, C., Oh, E.C., Leitch, C.C., Bromberg, Y., Binkley, J., Leibel, R.L., Sidow, A. *et al.* **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,(2010).
 96. Wallingford, J.B. **Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects.** *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R227-34,(2006).
 97. McNeill, H. and Woodgett, J.R. **When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 404-13,(2010).
 98. Ibanez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., Olbrich, H., Kispert, A., Ketelsen, U.P., North, A., Heintz, N. and Omran, H. **Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation.** *Hum Mol Genet*, 13, 2133-2141,(2004).
 99. 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. *et al.* **Abnormal development of NG2+PDGFR-alpha+ neural progenitor cells leads to neonatal hydrocephalus in a ciliopathy mouse model.** *Nature medicine*, 18, 1797-804,(2012).
 100. Dammermann, A. and Merdes, A. **Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1.** *The Journal of cell biology*, 159, 255-66,(2002).
 101. Kim, J., Krishnaswami, S.R. and Gleeson, J.G. **CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium.** *Hum Mol Genet*, 17, 3796-805,(2008).
 102. Jin, H., White, S.R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Bazan, J.F. and Nachury, M.V. **The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia.** *Cell*, 141, 1208-1219,(2010).

