

**Análisis funcional de proteínas del síndrome de Bardet-Biedl:
Vinculando proteínas ciliares con la regulación de la expresión génica**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mag. Cecilia Gascue

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA

Orientador: Dr. José Badano

Tribunal:

Dr. Gustavo Folle

Dra. Cristina Arruti

Dra. Patricia Cassina

2013

RESUMEN	1
Capítulo 1: Introducción	3
1.1 Síndrome de Bardet-Biedl	4
1.2 Organización centrosoma/cuerpo basal/cilia	6
1.3 Cilias y flagelos	9
<i>1.3.1 Estructura</i>	9
<i>1.3.2 Ciliación</i>	13
<i>1.3.3 Función</i>	14
1.4 Las cilias primarias	15
1.5 Ciliopatías	18
1.6 Proteínas BBS	25
1.7 Objetivos	27
Capítulo 2: Metodología	28
2.1 Cultivo de bacterias	29
<i>2.1.1 Cepa</i>	29
<i>2.1.2 Medios de cultivo</i>	29
<i>2.1.3 Antibióticos</i>	29
<i>2.1.4 Preparación de células competentes</i>	29
<i>2.1.5 Transformación de ADN plasmídico</i>	30
2.2 Cultivo de levaduras	31
<i>2.2.1 Cepa</i>	31
<i>2.2.2 Medios de cultivo</i>	31
<i>2.2.3 Transformación de levaduras</i>	32

2.3 Cultivo de células de mamífero.....	33
2.3.1 <i>Líneas celulares.....</i>	33
2.3.2 <i>Medios de cultivo.....</i>	34
2.3.3 <i>Condiciones de crecimiento y mantenimiento.....</i>	34
2.3.4 <i>Transfección transitoria.....</i>	35
2.4 Vectores.....	36
2.4.1 <i>Vectores de expresión en levaduras.....</i>	36
2.4.2 <i>Vectores de expresión en células de mamífero.....</i>	37
2.4.3 <i>Vectores para generar ARN de interferencia.....</i>	38
2.4.4 <i>Vectores para la producción de lentivirus.....</i>	39
2.5 Oligonucleótidos.....	41
2.5.1 <i>Para el clonado de genes.....</i>	41
2.5.2 <i>Para ARN de interferencia.....</i>	41
2.5.3 <i>Para RT-PCR.....</i>	42
2.6 Anticuerpos.....	43
2.6.1 <i>Anticuerpos primarios.....</i>	43
2.6.2 <i>Anticuerpos secundarios para inmunocitoquímica.....</i>	44
2.6.3 <i>Anticuerpos secundarios para western blot.....</i>	44
2.7 Extracción de ADN bacteriano.....	44
2.7.1 <i>A pequeña escala (miniprep).....</i>	44
2.7.2 <i>A mediana escala (midiprep).....</i>	45
2.8 Extracción de ADN plasmídico de levaduras.....	46
2.9 Extracción de ARN celular.....	46
2.10 Preparación de ADN complementario (ADNc).....	47
2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	47

2.12 PCR	48
2.12.1 <i>Amplificación de genes</i>	48
2.12.2 <i>Amplificación para cuantificación relativa de ARN</i>	48
2.13 Microarreglos	50
2.13.1 <i>Preparación de las muestras</i>	50
2.13.2 <i>Marcado e hibridación</i>	50
2.13.3 <i>Análisis</i>	50
2.14 Estudios <i>in silico</i>	51
2.15 Mutagénesis sitio-dirigida	51
2.16 Inhibición de la exportación nuclear	52
2.17 Extracción de proteínas	52
2.17.1 <i>De levaduras</i>	52
2.17.2 <i>De células de mamífero</i>	53
2.18 Cuantificación de proteínas	53
2.19 Electroforesis	54
2.19.1 <i>De ácidos nucleicos en geles de agarosa</i>	54
2.19.2 <i>De proteínas en geles de poliacrilamida</i>	54
2.20 Transferencia	55
2.21 Western blot	55
2.22 Ensayo de levaduras	56
2.23 Co-inmunoprecipitación	57
2.23.1 <i>De proteínas sobre-expresadas</i>	57
2.23.2 <i>De proteínas endógenas</i>	58
2.24 Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia	58
2.25 Fraccionamiento celular	59
2.26 Inmunoprecipitación de cromatina	59

2.27 Producción de lentivirus.....	61
2.28 Transducción de células de mamífero.....	61
2.29 Análisis <i>in vivo</i> utilizando el pez cebra.....	62
Resultados.....	63
Capítulo 3: Búsqueda de interactores de las proteínas BBS.....	64
3.1 Estrategia experimental.....	65
3.2 Ensayo doble híbrido.....	65
3.3 Co-inmunoprecipitación en células de mamífero.....	68
3.4 Co-inmunoprecipitaciones RNF2 otras BBSs.....	70
Capítulo 4: Localización de las proteínas BBS salvajes y mutantes.....	72
4.1 Estrategia experimental.....	73
4.2 Localización endógena de BBS7.....	75
4.3 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas BBS.....	76
4.4 Mutagénesis dirigida hacia el sitio NES de BBS7.....	79
4.5 Localización nuclear de BBS7 endógena.....	82
4.6 Análisis de las mutantes naturales de BBS7.....	85
4.7 Análisis de localización de otras proteínas BBS.....	88
Capítulo 5: Caracterización de la interacción BBSs-RNF2.....	93
5.1 Estrategia experimental.....	94
5.2 BBS7 y otras BBSs regulan los niveles proteicos de RNF2.....	94
5.3 BBS7 altera la expresión de los genes blanco de RNF2.....	99
5.4 La desregulación de genes blanco de RNF2 también <i>in vivo</i>	101
5.5 BBS7 regula la expresión génica más allá de RNF2.....	106
Capítulo 6: Discusión.....	115
6.1 Aportes al entendimiento de la base celular de BBS.....	116
6.2 Mecanismo por el cual BBS7 regula RNF2 y otras PcG.....	117

6.3 Relevancia fisiológica de la entrada de las BBSs al núcleo.....	120
6.4 Regulación de la entrada al núcleo de las proteínas BBS.....	122
6.5 Perspectivas.....	124
Bibliografía.....	126
Anexos.....	137
Anexo 1: Diseño de oligonucleótidos.....	138
Anexo 2: Ensayo doble híbrido en levaduras CDC25.....	144
Anexo 3: SDS-PAGE.....	146
Anexo 4: Análisis <i>in silico</i> BBS2-BBS16.....	147
Anexo 5: Análisis <i>in silico</i> BBS7 wt y T211I.....	150
Anexo 6: Artículos publicados.....	151

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Herencia trialélica.....	5
Figura 2: Inmunocitoquímica mostrando localización de centriolos.....	8
Figura 3: La cilia.....	10
Figura 4: Transporte intraflagelar.....	12
Figura 5: Las cilias primarias.....	15
Figura 6: Mapa del vector pSOS.....	36
Figura 7: Mapa del vector pMyr.....	37
Figura 8: Mapa de los vectores pCMV-Myc y pCMV-HA.....	38
Figura 9: Mapa del vector pSUPER.....	39
Figura 10: Mapa del vector pLKO.1-puro.....	40
Figura 11: Generación de ARN de interferencia.....	42
Figura 12: Esquema del sistema doble-híbrido.....	56
Figura 13: Resultado del ensayo doble-híbrido.....	67
Figura 14: Co-inmunoprecipitación BBS7-RNF2.....	69
Figura 15: Co-inmunoprecipitación BBSs-RNF2.....	70
Figura 16: Inmunocitoquímica mostrando localización de BBS7.....	75
Figura 17: Análisis <i>in silico</i> de la proteína BBS1.....	78
Figura 18: Análisis <i>in silico</i> de la proteína BBS7 wt y NES.....	79
Figura 19: Inmunocitoquímica mostrando BBS7 wt y NES.....	80
Figura 20: Fraccionamiento mostrando localización de BBS7 wt y NES.....	82
Figura 21: Inmunocitoquímica ensayo con LMB.....	83
Figura 22: Inmunocitoquímica ensayo con NEM.....	84
Figura 23: Fraccionamiento mostrando localización de BBS7.....	85
Figura 24: Gráfico de localización BBS7 wt y mutantes.....	86
Figura 25: Co-inmunoprecipitación RNF2-BBS7 mutantes.....	87

Figura 26: Imágenes de embriones de pez cebra con BBS4 inhibido.....	89
Figura 27: Gráfico mostrando el efecto de las mutaciones en genes <i>BBS</i>.....	90
Figura 28: Inmunocitoquímica proteínas BBS wt y mutantes.....	91
Figura 29: Western blot mostrando inhibición de BBS7.....	95
Figura 30: Western blot mostrando efecto de BBS7 sobre RNF2.....	96
Figura 31: Gráfico mostrando inhibición de BBS1, 2 y 4.....	97
Figura 32: Gráfico mostrando efecto de las BBSs sobre RNF2.....	98
Figura 33: Inmunocitoquímica mostrando localización de BBS2.....	99
Figura 34: Expresión diferencial de los genes blanco de RNF2.....	100
Figura 35: Hibridaciones in situ de embriones de pez cebra prueba de MOs..	102
Figura 36: Hibridaciones in situ de embriones de pez cebra blancos Rnf2.....	105
Figura 37: Vulcano plot resultado del ensayo de microarreglos.....	108
Figura 38: Boxplot ensayo de microarreglos vs blancos de RNF2.....	111
Figura 39: Boxplot ensayo de microarreglos vs proteoma ciliar.....	112
Figura 40: Boxplot ensayo de microarreglos análisis de ontología.....	113
Figura 41: Gráfico mostrando efecto ciliar sobre blancos de RNF2.....	123
Figura 42: Inmunocitoquímica a BBS7 y los microtúbulos.....	125
Tabla 1: Las ciliopatías.....	21
Tabla 2: Genes involucrados en más de una ciliopatía.....	23
Tabla 3: Fenotipos principales de las ciliopatías.....	24
Tabla 4: Análisis ensayo de microarreglos con blancos de proteínas PcG.....	109

ABREVIATURAS

AA	-	Aminoácido
ADN	-	Ácido desoxirribonucleico
ADNss	-	ADN simple hebra
ADPKD	-	Poliquistosis Renal Autosómica Dominante
ARN	-	Ácido Ribonucleico
ARNi	-	ARN de interferencia
ARNm	-	ARN mensajero
ARPKD	-	Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva
BBS	-	Síndrome de Bardet-Biedl
BCA	-	Ácido bicinconinico
BSA	-	Sero Albúmina Bovina
CoIP	-	Co-inmunoprecipitación
CRM1	-	Exportina
dNTPs	-	mezcla de los desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP
DAPI	-	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	-	Centríolo hijo (por "Daughter Centriole)
DE	-	Diferencialmente Expresado
Df	-	"Degrees of freedom", grados de libertad
DMEM	-	Medio Esencial Dulbecco Modificado
DMSO	-	Dimetil Sulfoxido
EV	-	Empty vector (vector vacío)

FBS	-	Suero Fetal Bovino
FGF	-	Factor de crecimiento de fibroblastos
GSK3	-	Quinasa glicógeno sintasa 3
HBS	-	Buffer Hepes Salino
HDAC6	-	Desacetilasa de histona 6
His	-	Histidina
IFT	-	Transporte Intraflagelar
Inv	-	Inversina
LB	-	Medio de cultivo Luria y Bertani
Leu	-	Leucina
LMB	-	Leptomycin B
MC	-	Centríolo Materno (por "Mother Centriole")
MOs	-	Morfolinos
MT	-	Microtúbulos
MTOC	-	Centro Organizador de Microtúbulos
MTS	-	Molar Tooth Sign
NEA	-	Aminoácidos No Esenciales
NEM	-	<i>N</i> -etilmaleimida
NES	-	Señal de exportación nuclear
NLS	-	Señal de localización nuclear
OD	-	Densidad óptica
PBS	-	Buffer Fosfato Salino

PCD	-	Disquinesia Ciliar Primaria
PcG	-	Polycomb Group
PCM	-	Material Pericentriolar
PCP	-	Polaridad Plana Celular
PCR	-	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGFR α	-	“Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha”
PEG	-	Polietilenglicol
PKD	-	Poliquistosis renal
PMSF	-	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PREs	-	Elementos de Respuesta a Polycombs
Ptc1	-	Receptor Patched 1
RT-PCR	-	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
SC	-	Medio sintético definido
Shh	-	Sonic Hedgehog
shRNA	-	horquillas cortas de ARN
siRNA	-	ARN de interferencia corto
SLS	-	Síndrome de Senior-Løken
Smo	-	Proteína “smoothened”
SOC	-	Medio de cultivo Super Óptimo conrepresión de Catabolitos
TA	-	Temperatura Ambiente
TCA	-	Ácido tricloracético
Trp	-	Triptófano

UPD	-	“Ubiquitin Proteasome Degradation”
Ura	-	Uracilo
UV	-	Radiación ultravioleta
WT	-	Wild type (salvaje)
YPAD	-	Extracto de levadura/Peptona/Dextrosa/Adenina

Resumen

Las cilia primarias son organelos conservados evolutivamente que juegan roles cruciales como mecano- y quimiosensores, así como en la transducción de cascadas de señales. En consecuencia, la disfunción ciliar resulta en un amplio rango de fenotipos, que caracterizan un grupo de enfermedades humanas que se han denominado ciliopatías. El Síndrome de Bardet-Biedl (BBS) es un modelo de ciliopatía para el cual se han identificado 17 genes causales. A pesar de que las proteínas BBS caracterizadas hasta el momento se localizan en centrosomas, cuerpos basales y cilia, sus funciones bioquímicas dentro de estos organelos o fuera de ellos no se han dilucidado completamente. En este contexto, este trabajo se centró en obtener información funcional para algunas proteínas BBS. Aquí se muestra que las proteínas BBS probablemente cumplan roles extraciliares, específicamente en el núcleo celular. A través de un análisis *in silico* se demostró que las proteínas BBS presentan señales de exportación nuclear (NES), que para BBS7, su funcionalidad fue confirmada biológicamente. Consistente con esta observación, se muestra que BBS7 interactúa físicamente con un miembro del grupo de proteínas Polycomb (PcG), la proteína nuclear RNF2, que posee funciones relacionadas al remodelado de cromatina y regulación de la expresión génica. Esta interacción no es exclusiva de BBS7, sino que se pudo comprobar para otras BBS, y en todos los casos analizados, se trata de una interacción biológicamente relevante dado que estas proteínas estarían regulando los niveles proteicos de RNF2. Se destaca que este efecto de las BBS sobre RNF2 altera su función, dado que la pérdida de las proteínas BBS lleva a una expresión aberrante de los genes blanco de RNF2 tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo varios genes cruciales para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, datos que podrían ser relevantes a futuro para continuar disecando la base celular de fenotipos característicos de las ciliopatías.

A su vez, se logró demostrar que la capacidad de ingresar al núcleo celular de BBS7 se encuentra aumentada cuando está presente alguna de las mutaciones de BBS7 encontradas en pacientes BBS (H323R y T211I). Esta observación desencadenó un estudio profundo de las diferentes mutaciones halladas en los pacientes BBS, donde

análisis *in vitro* e *in vivo* llevaron a comprender mejor los mecanismos de acción de las mutaciones y por tanto el modo de herencia del síndrome.

En conclusión, los datos aquí mostrados indican un rol directo de las proteínas BBS en la regulación transcripcional, un efecto no apreciado hasta ahora, que potencialmente expande el espectro de mecanismos que subyace al desarrollo de fenotipos ciliares en pacientes.

Capítulo 1:

Introducción

Parte de este capítulo fue publicado en “Cystic diseases of the kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms” Gascue C, Katsanis N, Badano JL. *Pediatric Nephrology*, 26(8):1181-95, 2010 (Ver anexo 6).

1.1 Síndrome de Bardet-Biedl

El Síndrome de Bardet-Biedl es una enfermedad hereditaria con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Los fenotipos principales que presentan los pacientes con esta enfermedad son degeneración de retina, obesidad, retardo mental, polidactilia, hipogonadismo y disfunción renal. A su vez, los pacientes con este síndrome también pueden presentar manifestaciones secundarias como fibrosis hepática, diabetes, anomalías reproductivas, problemas endócrinos, baja estatura, atraso en el desarrollo, mala audición y problemas en el habla. Dada esta heterogeneidad clínica, se han propuesto distintos criterios para el diagnóstico, que al día de hoy, se realiza cuando el paciente presenta 4 de las manifestaciones principales o tres de las principales junto con dos de las manifestaciones secundarias [1, 2]. Si bien BBS es un síndrome poco frecuente con una prevalencia estimada entre 1/100000 y 1/150000 en poblaciones caucásicas [3], un gran número de los fenotipos que lo caracterizan constituyen un problema significativo a nivel de salud pública, por lo que BBS se ha convertido en un modelo cada vez más estudiado por sus potenciales aplicaciones más allá de la enfermedad en sí misma.

Este síndrome tiene una clara base genética que involucra, hasta la fecha, a 17 genes que se han ido identificando por diferentes técnicas a lo largo de los años, siendo el mapeo familiar por mutaciones en homocigosis el más utilizado aunque también se identificaron genes por similitud de secuencia con otros conocidos [4-21]. Si bien históricamente BBS ha sido considerada una enfermedad autosómica recesiva, el análisis del espectro de mutaciones en distintos genes de BBS ha demostrado que en algunas familias este síndrome se comporta como un rasgo oligogénico, donde mutaciones en más de un gen co-segregan con la enfermedad [22]. En este aspecto, se ha determinado que la interacción genética entre distintos loci de BBS puede modular tanto la penetrancia como la expresividad del síndrome. Originalmente se observó que en algunas familias dos mutaciones en un gen BBS interactuaban con una tercer mutación en un segundo locus de BBS determinando en algunos casos la presencia de la patología, o en otros casos, determinando una presentación clínica más severa en el paciente con tres alelos mutantes que en el que tiene solo dos mutaciones, un

fenómeno que se denominó “herencia trialélica” o “herencia digénica trialélica” (Fig. 1) [23-25].

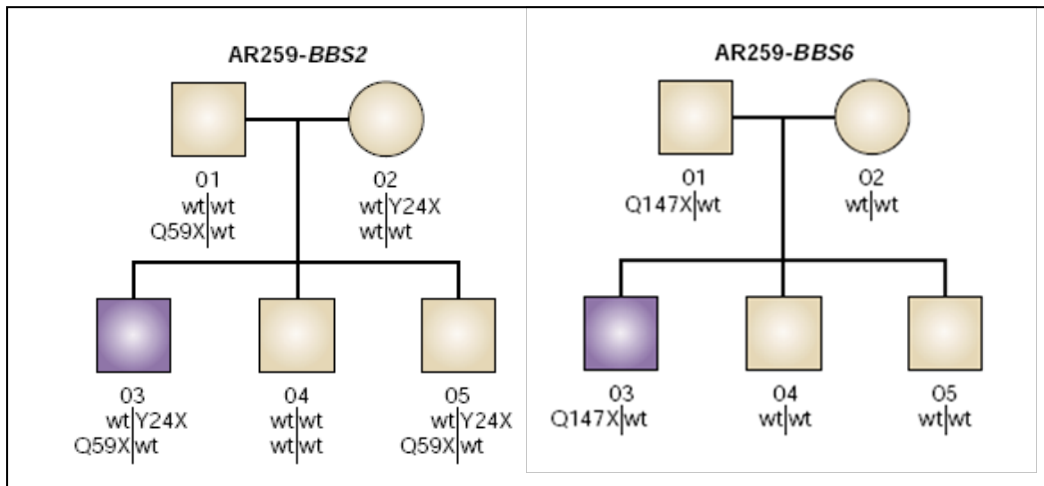


Fig. 1: Herencia trialélica, análisis de la familia AR259. En la genealogía izquierda se muestra como dos hermanos con el mismo genotipo para el gen BBS2 (heterocigotas compuestas) presentan un fenotipo diferente, individuo 03 (violeta) enfermo, individuo 05 sano. Al observar la misma genealogía con respecto a los alelos del gen BBS6 (derecha), se ve que el individuo enfermo (03), posee además una mutación en este gen, Q147X [Adaptado de Ref. 22].

Se han planteado varios modelos moleculares para explicar este tipo de herencia en donde un número relativamente reducido de genes interactúa para modular la presentación clínica de una determinada enfermedad. El principio general en todos ellos es la redundancia del sistema, muchas veces basada en la interacción entre varias proteínas y la complementación de funciones entre ellas. Por ejemplo, puede ser que las proteínas formen parte de un complejo o de una misma vía de señalización, de manera que si una no es funcional, otra puede ocupar su lugar, pero cuando fallan más de una, ya no se puede complementar la actividad y aparece el fenotipo [22]. En este tipo de herencia se encontraron involucrados gran parte de los genes BBS, como por ejemplo BBS1 y BBS7 [11, 14, 17, 25-27]. A pesar de que existen estudios donde no hallan este tipo particular de herencia y continúan describiendo un tipo de herencia recesiva [28-31], estudios recientes mostraron a seis proteínas BBS formando parte de

un complejo llamado BBSoma [32], hecho que podría explicar su interacción génica (ver sección 1.6).

Además de permitir el estudio de la base genética de esta enfermedad, la identificación de los distintos genes responsables de BBS y la caracterización de las proteínas codificadas por los mismos permitieron comenzar a dilucidar la base celular de esta patología. Distintas evidencias obtenidas tanto en estudios humanos como en diferentes modelos animales y celulares han mostrado que las proteínas BBS se encuentran en el centrosoma, el cuerpo basal y las cilias primarias, teniendo funciones tanto a nivel de estructura como de función en estos organelos (sección 1.6) [7, 9, 12, 33-36]. Esto llevó a la inclusión de BBS en la categoría de enfermedades humanas causadas por defectos en las cilias, las ciliopatías (sección 1.5).

1.2 Organización centrosoma/cuerpo basal/cilia

El primero de estos organelos en ser descrito fue el centrosoma en 1896, el cual presentó una dificultad al analizarlo y definirlo dada la ausencia de membrana que lo delimite. En células animales sus principales funciones consisten en ser el Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC) de la célula participando en procesos como la polaridad celular y el tráfico intracelular durante la interfase, dirigir la formación del huso mitótico durante la mitosis y generar el cuerpo basal a partir del cual emana la cilia o flagelo al finalizar la mitosis [37, 38]. A su vez, el centrosoma participa en otros procesos celulares como ser la organización espacial de organelos como el aparato de Golgi, la degradación de proteínas por ubiquitinación a través de la vía del proteasoma (UPD, por “Ubiquitin Proteasome Degradation”), como por ejemplo la degradación de ciclinas en estrecha vinculación con el ciclo celular, migración celular (claramente descrito en neuronas) y transporte vesicular [39]. Durante la interfase, el centrosoma se localiza de forma adyacente al núcleo celular y está compuesto por dos centríolos rodeados de una matriz proteínica sin forma definida llamada Material Pericentriolar (PCM) [39, 40]. Se cree que las proteínas que componen esta matriz forman una malla que ancla las proteínas que nuclean los microtúbulos (MT), entre las que se

encuentran la γ -tubulina que forma complejos circulares, la pericentrina y la nineína; a su vez, los centríolos poseen proteínas específicas como la centrina, la cenexina y subunidades de α - y β -tubulina modificadas por una alta poliglutaminación [41-47]. Datos obtenidos a partir de una primera aproximación proteómica indican que el centrosoma estaría compuesto por cerca de 100 proteínas [48]. Más adelante se extendió esta lista para incluir proteínas reguladoras y otras integrantes transitorias, construyéndose una base de datos muy completa que comprende más de 1000 proteínas potencialmente involucradas en la biología de este organelo [49].

Cada uno de los centríolos que forman el centrosoma es un cilindro compuesto de nueve tripletes de microtúbulos de 0.4 μ m de largo y 0.2 μ m de ancho que dentro del centrosoma se disponen de manera perpendicular uno con otro [50]. Sin embargo, su estructura varía a lo largo del centríolo presentando una organización próximo-distal en la cual sus extremos distales están conformados por dobletes en vez de tripletes [51]. A través de las fases G1 y S, los centríolos pierden su orientación perpendicular y se duplican, o sea que el centrosoma se duplica y crece de manera autónoma durante G2 para luego, durante la división celular, segregarse una sola copia a cada célula hija a través de su asociación con el huso mitótico [43, 52]. Durante la replicación de los centríolos, cada par resultante consiste en un centríolo materno (MC por “mother centriole”) y uno hijo (DC por “daughter centriole”) donde los MC se mantienen unidos entre sí por conexiones fibrosas que son luego desensambladas de manera dependiente del ciclo por la acción de la quinasa NEK2 al entrar en mitosis [53].

Otra de las funciones importantes del centrosoma, y en particular del MC, es la formación de cilias y flagelos. Para su formación, el MC migra a una posición cercana a la membrana celular para conformar el cuerpo basal a partir del cual va a emerger la cilia o el flagelo mientras que el otro centríolo se mantiene unido a él por un paquete fibroso llamado “conector estriado” y continúan organizando a los microtúbulos [38, 40, 54, 55]. Dado que la formación de cilias y flagelos depende de uno de los centríolos del centrosoma, claramente su ciclo de ensamblado y desensamblado se encuentra altamente coordinado con el ciclo celular, siendo éstos organelos post-mitóticos [56]. Además de sus conocidas funciones en la motilidad, ya sea de células o de material extracelular, en los últimos años estos organelos se han encontrado cumpliendo roles

fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis celular, el desarrollo embrionario y el mantenimiento de órganos y tejidos, tema que se desarrolla en más detalle en la siguiente sección [43].

En suma, a través del ciclo celular, la organización centrosoma/cuerpo basal/cilia va variando de modo que el centrosoma se encarga de la nucleación de los microtúbulos de manera radial durante la interfase celular, los centriolos se duplican y separan para formar el huso mitótico durante la división celular y el MC se convierte en cuerpo basal para la formación de cilias y flagelos cuando finaliza la división celular (Fig. 2).

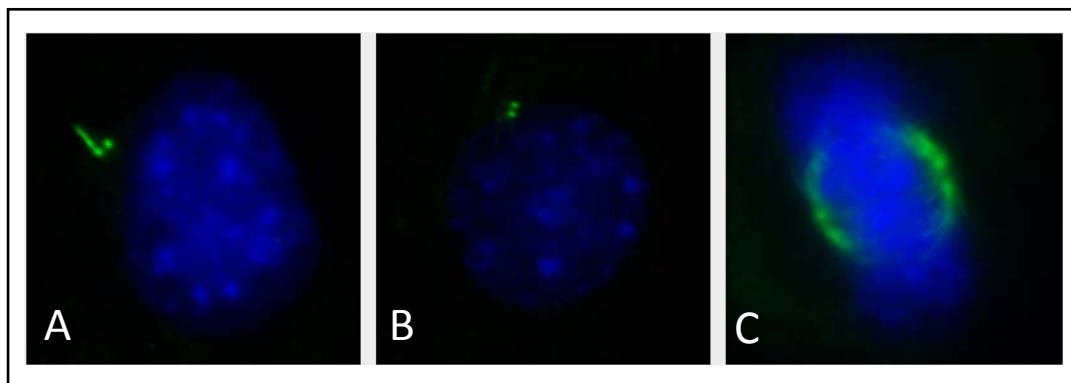


Fig. 2: Inmunocitoquímica donde se muestran las diferentes disposiciones de los centriolos a lo largo del ciclo celular. En verde se muestran las tubulinas y acetilada marcando los centriolos y la cilia, respectivamente. En azul se muestra el núcleo celular teñido con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). **A:** célula ciliada, **B:** célula sin ciliar, **C:** célula en mitosis mostrando la organización de los MT (que también son teñidos con el anticuerpo anti-tubulina acetilada) por parte de los centriolos.

1.3 Cilias y flagelos

1.3.1 Estructura

Tanto las cilias como los flagelos, son organelos evolutivamente conservados que a pesar de tener diferentes nombres, muchas veces se utilizan indistintamente por su alta similitud estructural [57]. Su organización fundamental está definida por un esqueleto de microtúbulos llamado axonema, que surge del cuerpo basal y que se encuentra recubierto por la membrana plasmática de forma continua con el resto de la célula. A pesar de no estar compartimentados por una membrana, se pueden considerar organelos donde el cuerpo basal y el material proteico que lo rodea funcionarían de interfase entre la cilia y el citoplasma [58]. El cuerpo basal le brinda a la cilia un molde simétrico del cual emerger, posee una zona de transición en la cual los dos MT centrales de cada triplete del centríolo se continúan en el axonema ciliar, por lo que este está compuesto por dobletes de MT. Esta zona de transición es importante tanto para la nucleación de los microtúbulos ciliares como para el acoplamiento de proteínas que requieren ser transportadas hacia las cilias, así como para organizar el ensamblaje y desensamblaje de la cilia [38]. A su vez, en esta zona se encuentran las fibras de transición, que sirven para anclar el cuerpo basal a la membrana celular funcionando también como una barrera para el transporte de moléculas hacia la cilia dado que las vesículas que llegan con ese destino no pueden traspasar la zona de transición y es ahí donde liberan su “carga”. De esta forma, la zona de transición funcionaría como una compuerta selectiva regulando tanto la entrada como la salida de proteínas de membrana ciliares. De todas maneras, poco se sabe acerca de la regulación de estos procesos, sobre todo para el caso de las proteínas solubles [59]. Sin embargo se han encontrado grandes similitudes entre el transporte ciliar y el transporte nuclear, donde parte de la maquinaria que actúa en los poros nucleares se ha encontrado en la base de la cilia como la GTPasa Ran, nucleoporinas y algunas importinas. De hecho se llegó a hipotetizar que en la base de la cilia habría un complejo de poro de estructura similar al poro nuclear dado que al tratar células en cultivo con bloqueadores químicos de las nucleoporinas, también se vio bloqueado el transporte hacia la cilia de proteínas motoras ciliares [60]. Incluso recientemente se reportó que la quinesina-2 kif17, proteína clave para el transporte de proteínas hacia

la cilia, interacciona directamente con la importina Imp beta2 a través de una señal de importación nuclear (NLS), sugiriendo un mecanismo similar de entrada al núcleo y a la cilia [61].

Las cilia se pueden clasificar en "móviles" e "inmóviles", estas últimas también llamadas primarias o sensoriales. La diferencia en su capacidad para moverse está dada por la presencia de un par central de MT en el axonema y la presencia de brazos de dineína que son los motores moleculares que caracterizan a la típica cilia móvil (estructura "9+2") de la inmóvil (estructura "9+0") (Fig. 3). También los flagelos poseen una estructura 9+2 pero suelen ser de mayor tamaño que las cilia y presentan un movimiento diferente al de éstas; mientras que las cilia móviles tienden a hacer un movimiento sincronizado hacia un lado y al otro, la movilidad del flagelo suele consistir en ondas sucesivas que se propagan a través de su extensión. En cambio, la cilia primaria simplemente tiene sus dobletes de microtúbulos unidos por conexiones de nexina que mantienen la estructura del axonema [50, 62].

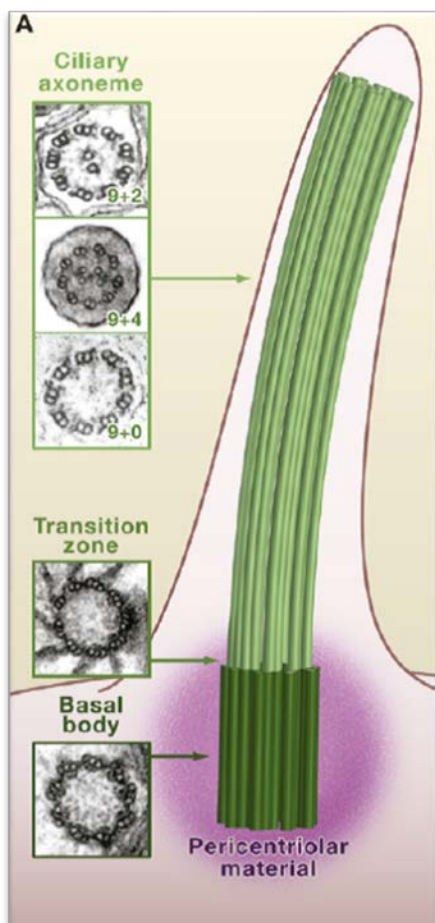


Fig. 3: Esquema básico de una cilia. A la izquierda se muestran micrografías electrónicas de las diferentes estructuras que componen la cilia. Con respecto al axonema ciliar, se muestran las tres diferentes variaciones que se han observado en vertebrados y algunos invertebrados [Adaptado de Ref. 62].

Sin embargo, como normalmente ocurre en la naturaleza, existen múltiples excepciones a las características típicas de cada organelo. Una de ellas comprende a la distinción entre cilias móviles e inmóviles, dado que se han descrito cilias primarias móviles, que logran un movimiento de rotación cónica que es diferente al de las cilias 9+2. Este tipo de cilias se han observado en las primeras etapas del desarrollo embrionario murino en la superficie ventral de las células del nodo, de la placa precordial y de la placa notocordal [63]. Luego se demostró que el movimiento de estas cilias es fundamental para la determinación de la asimetría derecha-izquierda en los mamíferos debido al movimiento de fluido extraembrionario que genera en el área del nodo [64]. También se encontraron cilias “9+2” inmóviles, como por ejemplo las quinocilias de las células ciliadas del oído [65]. Por último, también se encontró que las células del nodo en embriones de conejo presentan un tipo de cilia móvil que tiene una estructura “9+4” que se intercala con las otras cilias [66] (Fig. 3).

Tanto las cilias como los flagelos se generan y mantienen a partir del agregado de subunidades de tubulina en el extremo distal de la misma [67]. Dado que estos organelos carecen de la maquinaria necesaria para la síntesis proteica, poseen un mecanismo especializado de transporte de proteínas desde y hacia su extremo distal llamado transporte intraflagelar (IFT) [68]. El transporte intraflagelar se describió por primera vez en 1993 en el alga biflagelada *Chlamydomonas reinhardtii* donde se observó un rápido movimiento de partículas a lo largo del flagelo por microscopía y se obtuvieron fotos de microscopía electrónica que muestran los grupos proteicos ubicados entre el doblete de microtúbulos y la membrana flagelar (Fig. 4) [69].

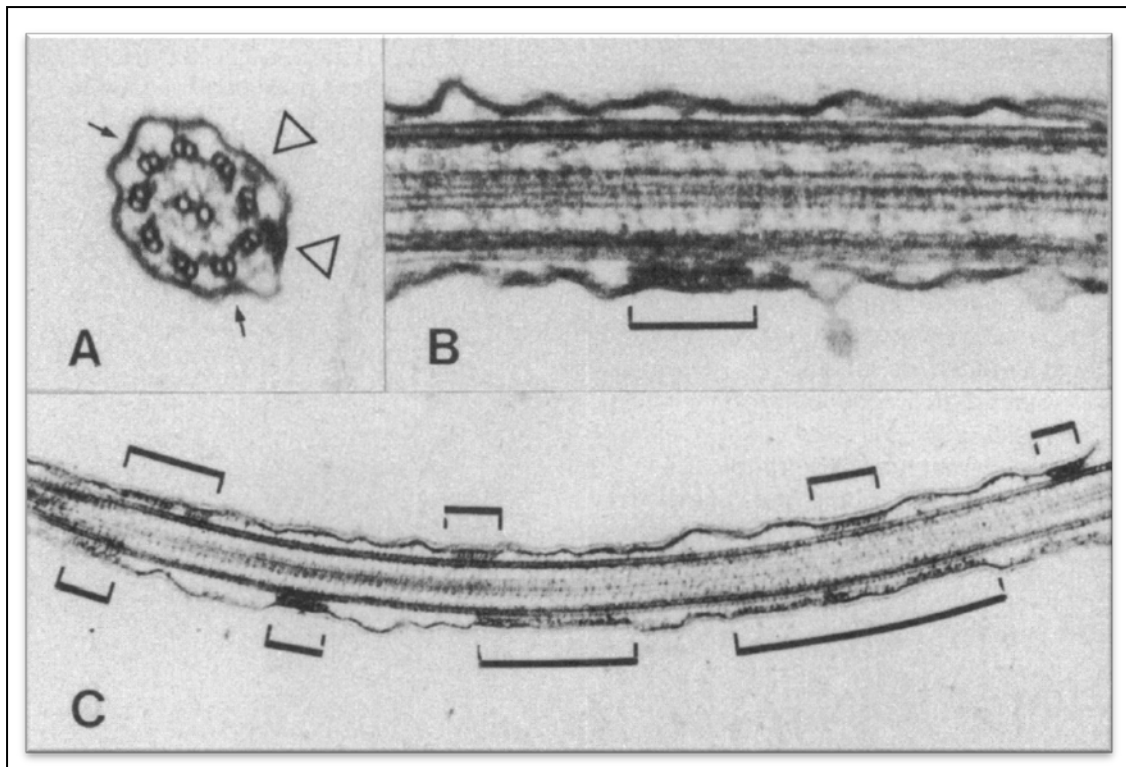


Fig. 4: Transporte intraflagelar. El panel A muestra un corte transversal del flagelo donde se observan los nueve pares de microtúbulos periféricos y el par central; con triángulos se muestra un grupo de proteínas que están siendo transportadas. Lo mismo se muestra en los cortes longitudinales mostrados en B y C marcados con paréntesis [Adaptado de Ref. 69].

El transporte intraflagelar comienza con el ensamblado de partículas IFT en las fibras de transición que unen el cuerpo basal y la cilia [59]. Entonces las partículas son transportadas hacia su extremo distal conformando lo que se conoce como transporte anterógrado que es mediado por proteínas motoras kinesinas. A su vez, también existe el transporte de proteínas desde el extremo distal de la cilia hacia el interior celular denominado transporte retrógrado y que es llevado a cabo por mecanismos dependientes de dineína [68].

1.3.2 Ciliación

Como ya se mencionó, existe un vínculo estrecho entre la ciliación y el ciclo celular que depende no sólo del hecho de que ambos procesos comparten el centríolo materno, sino que también comparten la actividad específica de un amplio número de proteínas como por ejemplo CP110, asociada a la duplicación del centrosoma, citocinesis e inhibición de la ciliación, y Aurora A (AurA), proteína centrosómica involucrada en la entrada a la fase mitótica y al desensamblaje de la cilia [56]. De hecho, se observó que el ingreso de la célula al ciclo celular está precedido por la absorción de la cilia, función mediada por la quinasa AurA presente en el cuerpo basal. Esta proteína activa a la desacetilasa de histona 6 (HDAC6), la cual desacetila la tubulina desestabilizando el axonema ciliar y por ende desensamblando a la cilia. De esta manera, el cuerpo basal/centríolo queda libre para participar en la formación del huso mitótico [70, 71]. A su vez, la salida de la mitosis se acompaña con el ensamblado de la cilia, para lo cual el centríolo materno migra a la superficie celular en un mecanismo dependiente de varias proteínas incluida la actina del citoesqueleto [50]. Entonces los microtúbulos se estabilizan mediante la acetilación y tirosinación de α -tubulina así como la poliglicilación y poliglutaminación de α - y β -tubulina, armando una cilia estable [72, 73].

La primera indicación de que va a aparecer una cilia la da la aparición de una vesícula derivada del aparato de Golgi en el extremo basal del centríolo materno en transformación a cuerpo basal. De ahí brota el axonema de la cilia teniendo a esa vesícula como vaina temporal; cuando el axonema ha crecido lo suficiente para alcanzar la membrana plasmática, la vaina se fusiona con ésta y la cilia comienza a protruir hacia el ambiente extracelular [40].

1.3.3 Función

Las ciliias y flagelos son estructuras evolutivamente conservadas que se encuentran en un amplio rango de organismos, desde algas unicelulares hasta protozoarios y animales ejerciendo una amplia diversidad de funciones. En los diferentes organismos las ciliias presentan diferentes disposiciones, por ejemplo, mientras que los modelos invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* presentan ciliias sólo en algunos tipos celulares, prácticamente todas las células de los vertebrados son capaces de emanar ciliias [62, 66]. Históricamente las ciliias y flagelos han sido funcionalmente asociados al movimiento, ya sea para el transporte de células en organismos unicelulares, como del medio extracelular. Dentro de los ejemplos más conocidos se encuentran las células multiciliadas del epitelio pulmonar, en donde cada célula consta de entre 200 y 300 ciliias móviles que, de forma sincronizada, van moviendo el mucus sobre la superficie del tejido. Otro ejemplo es el flagelo del espermatozoide o de los protozoarios que mueve a la célula a través de medio líquido. Sin embargo existen también las ciliias primarias, que se diferencian de las anteriores no sólo por su falta de movilidad sino también por el hecho de que suele haber una sola por célula. Si bien la función de este tipo de ciliias resultó desconocida durante muchos años, hoy sabemos que cumplen un rol fundamental en la interacción de las células con el medio que las rodea, actuando como una “antena” detectando e integrando señales extracelulares [38, 66].

1.4 Las ciliias primarias

Las ciliias primarias (Fig. 5) están presentes en prácticamente todas las células del organismo en animales vertebrados, con la excepción de las células de origen mieloide y linfoide [74], mientras que en los invertebrados se restringen sólo a las neuronas sensoriales [75].

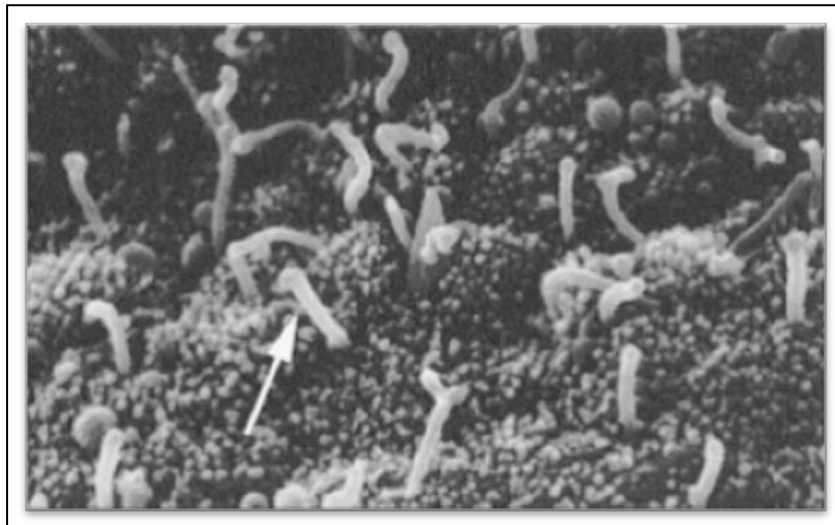


Fig. 5: La cilia primaria. Micrografía de barrido de células embrionarias de ratón donde se señala una cilia con una flecha blanca [Adaptado de Ref. 76].

Debido a que las ciliias primarias no se mueven, y dado que históricamente la motilidad fue una de las principales características asociadas a las ciliias y flagelos, estos organelos fueron considerados por mucho tiempo como estructuras vestigiales. Sin embargo, hoy en día se sabe que las ciliias primarias son esenciales para una transducción de señales eficiente siendo asociadas al desarrollo embrionario, el establecimiento de la polaridad y la diferenciación, así como al mantenimiento de la homeostasis de los tejidos participando en importantes procesos como la proliferación y la migración [52, 64, 77-79].

Hoy sabemos que las ciliias primarias cumplen un rol importante en el sensado del ambiente extracelular por lo que se las define como organelos sensoriales [57]. Su función se encuentra claramente descrita en diferentes tejidos y tipos celulares. Por

ejemplo para **el olfato**, la cilia posee un gran número de receptores en su membrana que activan vías específicas de señalización. Se trata de proteínas con varios dominios transmembrana que se asocian a segundos mensajeros a través de proteínas G [80]. Otra función ciliar es **la fotorrecepción**, donde el segmento externo de los fotorreceptores es considerado una cilia altamente modificada que se conecta con el segmento interno a través de una fracción de la misma llamada “cilio conector”, que cuenta con el transporte intraflagelar necesario para la formación y mantenimiento del segmento externo así como para la transducción de señales generada por las variaciones luz/oscuridad [81-83]. Una tercer función conocida es **la mecanosensación**, tanto de vibraciones sonoras, como fue demostrado en experimentos de audición en *Drosophila* para la cual las cilias de las neuronas sensoriales son esenciales [84], como de fluidos, como es el caso de las células del epitelio renal, donde el movimiento de fluidos genera un movimiento ciliar que es transducido en señales que alteran la expresión génica. Por ejemplo, se observó que el factor de transcripción STAT6, que se localiza normalmente en la cilia, es translocado al núcleo celular cuando se detiene el flujo de fluido en los túbulos renales [85]. Otra función claramente asociada a las cilias primarias es la **transducción de vías de señalización** [86-88]. Se ha observado que la cilia primaria cumple sus funciones sensoriales al actuar como una antena celular que posee un gran número de receptores para diferentes vías de señalización, y que además de captar las señales, es capaz de transducirlas hacia el interior celular utilizando el transporte intraflagelar (IFT). Entre estas vías se destacan cascadas relacionadas con el desarrollo como ser la vía de Sonic Hedgehog (Shh) [89] y las vías de Wnt [90]. Por ejemplo, cuando la vía canónica de Wnt se encuentra activa, la quinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) es inactivada a través de la fosforilación y por lo tanto no es capaz de fosforilar a β -catenina. Esto lleva a la translocación de β -catenina al núcleo reprimiendo la expresión de genes necesarios para la diferenciación. Por otro lado, la vía no canónica de Wnt o de Polaridad Plana Celular (PCP) tiene el efecto opuesto, llevando a la célula a la diferenciación [91]. La activación de una u otra de estas vías está determinada por la proteína ciliar inversina (inv), que por ejemplo en las células renales es sobre-expresada con el movimiento ciliar que genera el pasaje de fluido por los túbulos, inhibiendo la vía canónica de Wnt, lo cual es necesario para el correcto desarrollo renal [90, 92]. También la vía de Shh se ha demostrado que tiene

un vínculo fuerte con la cilia dado que en ella se localizan diferentes elementos de la cascada a través de los cuales se regulan importantes procesos durante la morfogénesis y el crecimiento de diferentes tejidos y órganos. En ausencia de la proteína de señalización Shh, el receptor patched 1 (Ptc1) se localiza en la cilia impidiendo la acumulación de smoothened (Smo) en este organelo y favoreciendo así el procesamiento del factor de transcripción Gli3 en su forma represora: Gli3R. Tras la unión de Shh al receptor Ptc1, éste es inactivado y translocado fuera del compartimiento ciliar permitiendo la entrada de Smo, proceso dependiente del transporte intraflagelar anterógrado. Esta acumulación de Smo lleva a un procesamiento de Gli3 a su forma activa que dirige la expresión de sus genes blanco [89, 93, 94]. Existen numerosos estudios que vinculan defectos en la vía de Shh con varios de los fenotipos que caracterizan las ciliopatías como ser la polidactilia [86, 95]. También se han encontrado otras vías que operan a través de la cilia como la de PDGFR α (por “platelet derived growth factor receptor alpha”), donde su estimulación lleva a la activación de cascadas de señalización mediadas por la quinasa AKT, entre otras, finalizando en una regulación de la progresión del ciclo, sobrevivencia y migración celular [87]. A su vez, se ha encontrado que importantes vías de señalización regulan la ciliogénesis, como por ejemplo la vía de FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos), donde esta regulación tiene consecuencias en procesos del desarrollo como ser la determinación de la lateralidad [96], otro de los fenotipos que suelen presentar las ciliopatías.

Dado su importante rol en la captación y transmisión de señales extracelulares, tanto el ensamblaje y el desensamblaje, así como el acortamiento o elongación de la cilia pueden jugar un rol importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular [70].

1.5 Ciliopatías

Hace ya muchos años que se conocen las consecuencias fenotípicas/clínicas de la afección de las ciliias móviles. Por ejemplo, cuando faltan los brazos de dineína necesarios para la movilidad ciliar y flagelar se generan síndromes como la Disquinesia Ciliar Primaria (PCD), cuyas manifestaciones típicas son infecciones respiratorias por el mal movimiento del mucus, hidrocefalia por fallas en la generación del flujo ependimal que resulta en el cierre del acueducto cerebral e infertilidad masculina debida a la inmotilidad de los espermatozoides [97-101]. A su vez, el Síndrome de Kartagener presenta estas características sumado a defectos en el establecimiento del eje de simetría derecho-izquierdo (*situs inversus*). Este fenotipo particular es causado por un defecto en las ciliias 9+0 móviles que se encuentran en el nodo embrionario [64, 76, 102, 103].

En el caso de las ciliias primarias sensoriales, la asociación con la enfermedad comenzó a ser descrita hace relativamente pocos años, a medida que se comenzaba a comprender su función biológica. Como ya se ha dicho, actualmente son conocidos los roles clave de las ciliias primarias durante el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de tejidos adultos, esto junto con su amplia distribución en los diferentes tipos celulares del organismo, explica porqué el malfuncionamiento de estos organelos puede resultar en un amplio rango de patologías humanas colectivamente llamadas “ciliopatías” [104, 105].

Las ciliopatías comprenden entonces un grupo de patologías con una base celular común: el mal funcionamiento de las ciliias, y comprenden desde fallas embrionarias letales hasta patologías multisistémicas [104]. Por lo tanto forman un grupo de enfermedades genéticas cuya etiología no se asocia con una disfunción particular sino con un aspecto integrado de la fisiología celular [106]. Uno de los aspectos comprendidos dentro del concepto de ciliopatía es la existencia de un grupo de fenotipos o manifestaciones clínicas que son características de la disfunción ciliar. Por lo tanto, las diferentes ciliopatías comparten estos fenotipos que incluyen entre otros la formación de quistes renales, degeneración de retina, obesidad, diabetes y defectos del tubo neural.

Las ciliopatías incluyen un espectro de enfermedades y defectos que van desde patologías restringidas mayoritariamente a un órgano específico como la poliquistosis renal (PKD), hasta síndromes altamente pleiotrópicos como el Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Esto se debe a que la disfunción ciliar se presenta en diferentes grados dependiendo del defecto celular específico, el patrón de expresión del gen alterado y la dependencia funcional del tejido hacia la proteína ciliar específica. Por otro lado, se han encontrado varias proteínas ciliares que a su vez presentan roles extraciliares, agregando más complejidad [86]. En líneas generales, cuanto más globalmente se afecte la función de las cilias primarias, la patología será más pleiotrópica. La disrupción total de la cilia es incompatible con la vida mientras que fallas ciliares puntuales suelen restringir el fenotipo, por ejemplo a ciertos tejidos [105]. Estos estudios están tomando cada vez más relevancia dado que tanto la cilia como el cuerpo basal se han visto implicados en las enfermedades típicas del siglo XXI como fallas cardíacas, obesidad, diabetes e hipertensión [50].

Quizás el primer vínculo claro entre las cilias primarias y la patogénesis de una enfermedad humana surgió del estudio de la poliquistosis renal (PKD), una de las manifestaciones más frecuentes en las ciliopatías, y en particular de la caracterización del modelo murino de poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD), *orpk* (por "Oak Ridge Polycystic kidney"). Los ratones *orpk* poseen una mutación hipomórfica en el gen *Tg737* que codifica para el ortólogo de la proteína IFT88 de *Chlamydomonas*, una proteína que se localiza en el cuerpo basal y las cilias y que participa en el proceso de IFT, y por lo tanto presentan cilias defectuosas y cortas [77, 107, 108]. A su vez, la caracterización de las proteínas alteradas en la forma dominante de poliquistosis renal (ADPKD), PC1 y PC2, reforzó el rol central de las cilias en la patogénesis de esta enfermedad ya que PC1 es una proteína transmembrana que interactúa con PC2 para formar un canal de Ca^{2+} que se localiza en las cilias primarias [109]. En estas enfermedades, la falla de la cilia primaria produce un desbalance entre la proliferación y la diferenciación celular a nivel renal llevando a la formación de quistes [110]. Posteriormente se ha visto que la gran mayoría de las proteínas involucradas en enfermedades quísticas de riñón están de alguna manera vinculadas con las cilias primarias por lo que en el gran número de ciliopatías que se conocen actualmente,

junto con otros fenotipos, la formación de quistes renales suele ser un factor común (Tabla 1) [105, 111].

Aspectos clínicos

Ciliopatía	Abrev.	Herencia	Frecuencia	Severidad	Fenotipo
Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva	ARPKD	Autosóm. Recesiva	1/10.000 - 1/20.000	50% muere en pocas semanas, el resto en la primer década	Riñones agrandados y con quistes, fibrosis hepática, hipoplasia pulmonar
Poliquistosis Renal Autosómica Dominante	ADPKD	Autosóm. Dominante	1/500	Los síntomas aparecen en la juventud	Quistes renales, hepáticos, pancreáticos y cerebrales, anomalías cardíacas, aneurisma cerebral y aórtico
Nefronoftisis	NPHP1 -11	Autosóm. Recesiva	1/50.000 – 1/100.000	Falla renal antes de los 30 años	Riñones con quistes, fibrosos y atrofiados
Síndrome de Bardet-Biedl	BBS	Autosóm. Recesiva/ Oligogénica	1/100.000 – 1/150.000	Alcanzan la adultez	Distrofia de retina, quistes renales, obesidad, polidactilia, retardo mental, situs inversus,
Síndrome de Meckel-Gruber	MKS	Autosóm. Recesiva	1/10.000	Pocos nacen, mayoría muere <i>in utero</i>	Meningoencefalocele occipital, fibrosis hepática, polidactilia, quistes renales
Síndrome de Joubert	JS	Autosóm. Recesiva	1/80.000 – 1/100.000	Altamente variable	Hipotonía, ataxia, MTS, distrofia de retina, NPHP, polidactilia, fibrosis hepática

Aspectos celulares y moleculares

Genes invol.	Proteína codif.	Localización	Función	Falla	Citas
<i>PKHD1</i>	FPC: fibrocistina o poliductina	Ciliar y secretada	Respuesta al calcio, probablemente a través de PC2	Insensibilidad a las señales de Ca, defectos en división y diferenciación	[112-115]
<i>PKD1/</i> <i>PKD2</i>	PC1: policistina 1/ PC2: policistina 2	Ciliar, Golgi, adhesiones focales	Ambas forman parte de un canal de calcio en la membrana ciliar	Insensibilidad a las señales de Ca, defectos en división y diferenciación	[109, 116-118]
<i>NPHP1-11</i>	NPHP1-11	Ciliar, c. basal, centrosoma, adhesiones focales	Adhesión cél-cél y cél-matriz, citoesq. de actina, división, señaliz. por Wnt y Shh	Defectos en diferenciación y mantenimiento tisular	[20, 90, 119-138]
<i>BBS1-17</i>	BBS1-17	Ciliar, cuerpo basal, centrosoma	Organiz. pericentriolar, ciliogénesis, IFT, señaliz. por Wnt	Defectos en ciliogénesis y transmisión de señales	[4-21]
<i>MKS1-6</i>	MKS1-6	Ciliar, c. basal, centrosoma, memb. plasm.	Ciliogénesis, fomración del epitelio, señaliz. por Shh y Wnt	Defectos en el citoesqu. y posición de los organelos	[139-148]
<i>JBTS1-7</i>	JBTS1-7	Ciliar, c. basal, centrosoma, uniones celulares	Ciliogénesis, señaliz. por Shh	Defectos en ciliogénesis y transmisión de señales	[129, 149-157]

Tabla 1: Características de las ciliopatías, se muestran los datos de ARPKD (Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva), ADPKD (Poliquistosis Renal Autosómica Dominante), NPHP (Nefronoftisis), BBS (Síndrome de Bardet-Biedl), MKS (Síndrome de Meckel-Gruber) y JS (Síndrome de Jubert). MTS por "Molar Tooth Sign".

Dado el amplio solapamiento que se observa en las características de las diferentes ciliopatías, no es de extrañar que exista a su vez un importante solapamiento en los genes involucrados en el desarrollo de las mismas. Muchas veces estos genes compartidos entre las diferentes ciliopatías poseen más de un nombre, cada uno correspondiente a la ciliopatía donde fue descrito inicialmente (Tabla 2). Los diferentes fenotipos observados podrían deberse al tipo de mutación que se presenta en cada uno, que puede ser más o menos severa, así como a la combinación de mutaciones en más de un gen.

Gen	NPHP	JS	MKS	SNLS	BBS
<i>CC2D2A</i>		<i>JBTS2</i>	<i>MKS6</i>		
	<i>NPHP1</i>	<i>JBTS4</i>		<i>SNLS1</i>	
<i>CEP290</i>	<i>NPHP6</i>	<i>JBTS5</i>	<i>MKS4</i>	<i>SNLS6</i>	<i>BBS14</i>
<i>RPGRIP1L</i>	<i>NPHP8</i>	<i>JBTS7</i>	<i>MKS5</i>		
<i>FLI20345</i>			<i>MKS1</i>		<i>BBS13</i>
<i>TMEM67</i>	<i>NPHP11</i>	<i>JBTS6</i>	<i>MKS3</i>		

Tabla 2: Genes involucrados en más de una ciliopatía a los cuales se les han adjudicado diferentes nombres que aparecen indistintamente en la bibliografía consultada.

Agregando más complejidad aún, es importante destacar que varias proteínas ciliares interactúan y pueden converger en la misma vía de señalización, y por ende mutaciones en una u otra pueden originar el mismo fenotipo, explicando por qué muchas veces mutaciones en diferentes genes generan un efecto similar [158]. Con respecto a esto, si comparamos los fenotipos que comparten las diferentes ciliopatías, observamos que son una cantidad significativa (Tabla 3) [86].

	PKD	NPHP	MKKS	SLSN	EVC	JATD	OFD	ALMS	JS	BBS	MKS
Malformaciones del SNC					•	•	•	•	•	•	•
Quistes renales	•	•		•		•	•	•	•	•	•
Diabetes								•		•	
Malformaciones gonadales			•		•					•	•
Fallas cardíacas			•		•			•		•	
Disfunción hepática	•	•		•		•	•	•	•	•	•
Retardo mental					•	•	•		•	•	•
Obesidad								•		•	
Polidactilia			•		•	•	•		•	•	•
Disfunción pulmonar								•			
Degeneración de retina				•		•		•	•	•	
Defectos en el eje de simetría		•		•		•			•	•	•
Defectos en el esqueleto					•	•	•				

Tabla 3: Fenotipos principales observados en las ciliopatías. PKD, Poliquistosis renal; NPHP, Nefronoftisis; MKKS, Síndrome de McKusick-Kaufman; SLSN, Síndrome de Senior-Løken; EVC, Ellis-van Creveld; JATD, Distrofia torácica asfixiante de Jeune; OFD, Síndrome orofaciodigital, ALMS, Síndrome de Alström; JS, Síndrome de Joubert; BBS, Síndrome de Bardet-Biedl; MKS, Síndrome de Meckel-Gruber; SNC, Sistema nervioso central [Adaptada de Ref. 86].

Una de las primeras ciliopatías en ser descritas fue el Síndrome de Bardet-Biedl (BBS), y como se observa en la Tabla 3, muestra prácticamente todas las características comunes a las ciliopatías, aunque la presentación sea variable entre los diferentes pacientes [106]. Entonces el estudio de las mutaciones que se presentan en BBS llevó al conocimiento de las proteínas vinculadas a la enfermedad que han ido revelando características básicas de la función ciliar.

1.6 Proteínas BBS

Si bien alteraciones en los diferentes genes de BBS resultan en fenotipos prácticamente indistinguibles, las proteínas que éstos codifican representan un grupo heterogéneo en donde es difícil identificar similitudes en cuanto a secuencia y/o dominios funcionales comunes a todas ellas. Sin embargo aparecen subgrupos de proteínas dentro de las BBSs que pueden ser agrupadas por similitud de secuencia o función. Por ejemplo BBS6, BBS10 y BBS12, conformarían una subfamilia de proteínas relacionadas a chaperoninas específica de mamíferos [159]. También BBS4 y BBS8, y por otro lado BBS1, BBS2 y BBS7, compartirían similitudes a nivel de sus secuencias de amino ácidos, las últimas tres compartiendo un motivo de unión a proteínas, los repetidos β -propeller. De hecho, BBS8 y BBS7 fueron clonados a través del análisis de las secuencias de BBS4 y BBS2 respectivamente [160, 161].

Con respecto a la función de las proteínas BBS, hasta el momento sólo se ha logrado caracterizar la función de algunas de ellas. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de BBS4 genera la deslocalización de la proteína centrosómica PCM1, proteína perteneciente al Material Pericentriolar (PCM) (específicamente a los satélites centriolares) que organiza a otras proteínas centrosómicas y que participa en el anclaje de los microtúbulos [162, 163]. Esta deslocalización de PCM1 genera dificultades en el anclaje de los microtúbulos en el centrosoma y un arresto en la división celular. BBS4, que se localiza en los satélites centriolares y en los cuerpos basales, funcionaría como un adaptador de la subunidad p150-glued de la maquinaria de transporte de dineínas, y sería necesaria para reclutar a PCM1 hacia el centrosoma [33]. Por otro lado, se ha visto que en el nematodo *C. elegans*, la pérdida de *bbs-7* y *bbs-8* resulta en cilias cortas y funcionalmente defectuosas con problemas en el transporte intraflagelar debido a que estas proteínas se mueven a lo largo de la cilia y median el transporte y localización de otras proteínas del ITF como ser Polaris y CHE-11 [164]. Más recientemente se ha visto que BBS1, BBS2, BBS5, BBS7, BBS8 y BBS9 forman un complejo asociado a la membrana ciliar y necesario para la formación y correcta función del organelo, el BBSoma. Este complejo funcionaría de manera dependiente de Rab8 en el transporte vesicular de proteínas de membrana desde el aparato de Golgi [32, 165]. Por otra parte, BBS6 ha sido descrita como una proteína chaperona de tipo II

que durante la interfase se localiza en la región centrosómica y durante la división celular, en el puente intercelular, con un importante rol en la citocinesis [34]. A su vez, recientemente se ha determinado que la ausencia de proteínas BBS resulta en un desbalance en la activación de las diferentes vías de Wnt, suprimiendo la vía de PCP, y favoreciendo la vía canónica y por ende reprimiendo la diferenciación [166].

Con respecto a la convergencia funcional de las proteínas BBS, es interesante notar que PCM1 es un interactor común a varias proteínas de ellas [160]. En forma similar, un gen modificador de BBS, *CCDC28B* (también llamado *MGC1203*), codifica para una proteína recientemente vinculada a la ciliogénesis [167] que es capaz de interactuar con varias de las proteínas de BBS [168]. Estos datos están sugiriendo un grado de redundancia en el sistema que podría explicar, al menos en parte, los patrones de herencia complejos que se observan en este síndrome descritos en la sección 1.1 [169].

Como ya se mencionó, BBS es causada por mutaciones en al menos 17 genes que en muchos casos son capaces de interactuar genéticamente para modular la penetrancia y expresividad del síndrome. Mientras que las consecuencias de mutaciones tales como la introducción de codones de terminación prematuros o cambios en el patrón de splicing son relativamente fáciles de determinar, los efectos de mutaciones de cambio de sentido, que en definitiva alteran la secuencia de aminoácidos, son muchas veces difíciles de evaluar, en especial en ausencia de un ensayo funcional. Para realizar este tipo de ensayo se suelen utilizar estudios *in vitro* e *in vivo*, como por ejemplo en el pez cebra como los que se muestran en los capítulos 4 y 5, donde se evaluó el efecto de varias mutaciones de cambio de sentido de las proteínas BBS.

Sin embargo, y a pesar de los avances antes mencionados, es relativamente poco lo que se conoce acerca del rol biológico de este grupo heterogéneo de proteínas. Por lo tanto BBS representa un modelo interesante para estudiar la biología básica de las ciliias e intentar entender como su disfunción resulta en los distintos fenotipos que caracterizan la enfermedad.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

En este trabajo se plantea caracterizar un subgrupo de proteínas BBS de manera de obtener información que permita entender como su ausencia o su mal funcionamiento podría vincularse con las características clínicas del síndrome.

1.7.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar nuevos interactores de las proteínas BBS, lo que no sólo permitirá ampliar el interactoma de BBS sino que potencialmente también proveerá información acerca de la función de este grupo de proteínas.
- 2) Caracterizar las proteínas BBS y sus nuevos interactores para determinar patrones de localización celular y valorar el efecto a nivel celular y molecular de la inhibición y sobre-expresión de los mismos.
- 3) Estudiar la posible funcionalidad y localización de las interacciones encontradas.
- 4) Determinar diferencias entre las proteínas salvajes y mutantes que puedan ayudar a explicar algunos de los fenotipos que caracterizan el síndrome.

Capítulo 2:

Metodología

2.1 Cultivo de bacterias

2.1.1 Cepa

- *E. coli*K-12 cepa DH5 α (F⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA*supE44 λ ⁻*thi-1 gyrA96 relA1*).

2.1.2 Medios de cultivo

- Luria y Bertani (LB): 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl. Esterilizado por autoclave.
- LB agar: Agregar 1.5% de agar al medio LB. Esterilizado por autoclave y puesto a gelificar sobre placas de Petri.
- Super Óptimo con Represión de Catabolitos (SOC): 0.5% de extracto de levadura, 2% de triptona, 10mM de NaCl, 2.5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM de MgSO₄, 20mM de glucosa. Esterilizado por autoclave.

2.1.3 Antibióticos (soluciones 1000X)

- Ampicilina (Amp): 10% en agua
- Cloranfenicol (Cam): 2.5% en etanol 100%
- Kanamicina (Kan): 5% en agua

2.1.4 Preparación de Células competentes

Electrocompetentes: Se partió de un cultivo overnight de bacterias en 3ml de LB a 37°C con agitación que se pasó a 200ml de LB y se cultivó hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600nm de 0.6. En adelante se mantuvo la cadena de frío. El cultivo se centrifugó a 3500rpm por 10min a 4°C en un tubo falcon de 50ml. Se descartó el sobrenadante, se completó con otra porción del cultivo y se repitió el procedimiento hasta juntar todas las células. A continuación las células se resuspendieron en 40ml de agua estéril fría con vórtex y se centrifugó a 3500rpm por 10min a 4°C. Se repitió el lavado y el centrifugado

dos veces más. Las células fueron resuspendidas en 1.5ml de agua estéril fría y se pasaron a un tubo eppendorf, se centrifugaron a 4000rpm por 10min a 4°C, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 450µl de glicerol 10% estéril. Por último se alicuotaron de a 40µl por tubo eppendorf de 1.5ml y se guardaron a -80°C.

Quimiocompetentes: Las bacterias quimiocompetentes fueron obtenidas comercialmente (*E. coli* MAX efficiency y subcloning efficiency, Invitrogen) o se prepararon en el laboratorio. Para esto se partió de un stock de glicerol de células *E. coli* DH5α que se pre-incubaron en 40ml de medio SOC a 37°C por 1 hora sin agitación. Luego se incubaron por 2-3 horas a 37°C con agitación a 250rpm. El cultivo se centrifugó a 3000rpm por 8min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 20ml (medio volumen) de cloruro de calcio (CaCl₂) 50mM estéril y frío, se incubaron en hielo por 20min y se volvieron a centrifugar. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron cuidadosamente en 4ml (1/10 volumen) de CaCl₂ 50mM estéril y frío. Se agregaron 400µl (10%) de glicerol, se alicuotaron de a 100µl en tubos eppendorf y se guardaron a -80°C.

2.1.5 Transformación con ADN plasmídico

Por electroporación: Antes de empezar, las cubas de electroporación se esterilizaron mediante un lavado con etanol y 15min de radiación ultravioleta (UV) y se pusieron en hielo. A continuación se pusieron a descongelar en hielo las células electrocompetentes. Una vez descongeladas se les agregó 1µl (1-10ng) de plásmido a los 40µl de células y se incubaron 5min en hielo. Luego se pusieron en la cuba y se les dio 1 pulso de 500V por 8ms. En seguida se les agregó 560µl de SOC precalentado a 37°C y se pasaron a un tubo eppendorf de 1.5ml con pipeta. Se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación y se plaquearon en LB agar con el antibiótico correspondiente. Por último se incubaron a 37°C por 16h.

Por choque térmico: Se descongelaron en hielo 100µl de células quimio-competentes hechas en el laboratorio o 30-40µl de las comerciales, y se les agregó 1µl (1-10ng) de plásmido. Se incubaron por 30min en hielo, luego a 42°C por 45s para realizar el choque térmico, y se volvieron los tubos al hielo por 2min. Se les agregó 900µl de SOC y se incubaron con agitación a 200rpm por 1h a 37°C. Se plaquearon en LB agar con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C por 16h.

La transformación por choque térmico se utilizó tanto para las bacterias competentes generadas en el laboratorio como para las comerciales (MAX y Subcloning efficiency, Invitrogen), para las cuales hubo pequeñas variaciones en el protocolo descrito según las indicaciones de los fabricantes.

2.2 Cultivo de levaduras

2.2.1 Cepa

- cdc25H: Mata_ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901/eu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺ (Stratagene).

2.2.2 Medios de cultivo

- Extracto de levadura/Peptona/Dextrosa/Adenina (YPAD):

1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de dextrosa, 40mg/L de sulfato de adenina. Esterilizado por autoclave.

- YPAD agar:

Se le agregó 2% de agar al medio YPAD, se autoclavó y se puso en placas de Petri.

- Medio sintético definido -Leu, -Trp, -His, -Ura(SC-4) 2X:

0.26% de aminoácidos (AA) definidos -4, 0.34% de bases nitrogenadas de levadura sin AA, 1% de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄. Se disolvieron en agua ultrapura y se esterilizaron por autoclave.

- Soluciones de AA:

Triptófano (Trp): 4.8mg/ml (mantenido en la oscuridad); Uracilo (Ura): 2.4mg/ml; Leucina (Leu): 7.2mg/ml; Histidina (His): 2.4mg/ml. Se disolvieron en agua ultrapura y se esterilizaron por filtrado.

Para preparar el medio SC pronto para su uso, se le agregó al SC-4 2X, igual volumen de agua ultrapura estéril (para medio líquido) o igual volumen de solución 4% de agar estéril y disuelto. A continuación se le agregó 0.83% de las soluciones de AA necesarias. Por último se le agregó la fuente de carbono deseada: 2% de glucosa o 2% de galactosa y 1% de rafinosa.

2.2.3 Transformación de levaduras

Método rápido: A partir de una placa en crecimiento, se tomaron ~25µl de células y se resuspendieron en 1ml de H₂O estéril. Se centrifugaron a máx. velocidad por 5s y las células se resuspendieron suavemente en 1ml de Acetato de Litio (LiAc) 100mM a pH=8.7 y estéril. Se incubaron por 5min a 25°C, se centrifugaron a máx. velocidad por 5s y se quitó el sobrenadante con pipeta. Se les agregó en el siguiente orden: 240µl de polietilenglicol (PEG) 50%, 36µl de LiAc 1M pH=8.7, 10µl de ADN simple hebra (ADNss) 10mg/ml hervido 7min, 5µl de ADN plasmídico (100ng a 5µg), 60µl de H₂O. Se mezclaron con vórtex por al menos 1min y se incubaron a 42°C por 20min. Se centrifugaron a máx. velocidad por 10s, se quitó el sobrenadante con pipeta y se resuspendieron suavemente en 200-400µl de H₂O estéril. Se plaquearon en medio selectivo y se incubaron a 25°C.

En todos los casos se realizó en paralelo un control de transformación sin ADN.

Método de alta eficiencia: Se cultivó una colonia de levaduras (crecida en placa) en 5ml a 25°C con agitación de un día al otro. A partir de ese cultivo, se realizaron 3 cultivos de 25ml c/u inoculados con 0.5ml, 1ml y 1.5ml del cultivo del día previo. Se incubaron hasta el día siguiente a 25°C con agitación, se les midió la OD a 600nm y se utilizó el cultivo que estaba en crecimiento exponencial (OD entre 0.6 y 0.8). Se centrifugó por 10min a 1000rpm y se descartó el sobrenadante. A las células se les agregó 10ml de Acetato de Litio (LiAc) 100mM (pH=7.5, estéril) y se resuspendieron suavemente (ni pipeta ni vórtex). Se repitió el centrifugado y lavado con LiAc 100mM. Luego se resuspendieron en x ml de LiAc 100mM para llegar a una suspensión final de 2×10^9 células/ml:

$$x = \frac{\text{ml de cultivo} \times \text{OD}_{600} \times 3 \times 10^7 \text{cél./ml}}{2 \times 10^9 \text{cél./ml}}$$

La resuspensión se realizó en el volumen exacto, se midió el vol. del precipitado y se le restó a x .

Para cada transformación se prepararon 2 tubos utilizando uno como control sin ADN. Por tubo se agregaron 50 μ l de células, 10 μ l de ADNss 10mg/ml hervido 7min, ADN plasmídico (100ng a 5 μ g) y la mezcla de transformación: 240 μ l de PEG, 36 μ l de LiAc 1M pH=8.7 y 24 μ l de H₂O. Se resuspendió pipeteando suavemente y se incubó por 1 hora a 25°C sin agitación. Se le agregó 1/10 volumen de DMSO (~37 μ l) y se realizó un choque térmico a 42°C por 25min. Se centrifugó a máx. velocidad por 5s, se quitó el sobrenadante con pipeta y las células se resuspendieron en 400 μ l de H₂O muy suavemente. Se plaquearon en medio selectivo y se incubaron a 25°C.

2.3 Cultivo de células de mamífero

2.3.1 Líneas celulares

HeLa	- Células humanas derivadas de adenocarcinoma cervical (ATCC N° CCL-2)
HEK293	- Células humanas derivadas de riñón, transformadas con adenovirus (ATCC N° CRL-1573)
HEK293FT	- Células HEK293 transformadas con el antígeno T de AV40. Son células altamente transfectables y capaces de producir un alto título de lentivirus. Donadas por la Dra. Arlinet Kierbel
NIH3T3	- Células murinas derivadas de fibroblastos (ATCC N° CRL-1658)
hTERT-RPE	- Células humanas derivadas del epitelio pigmentado de la retina que fueron inmortalizadas con hTERT. Donadas por la Dra. Norann Zaghoul

2.3.2 Medios de cultivo

Medio de crecimiento para células HeLa, HEK293 y NIH/3T3: Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM, Invitrogen) con alta concentración de glucosa suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Invitrogen) y 1% de antibióticos penicilina/streptomina (50µg/ml).

Medio de crecimiento para células HEK293FT: DMEM con alta concentración de glucosa suplementado con 10% FBS, 6mM de glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 0.1mM de aminoácidos no esenciales (NEA), 1% de antibióticos penicilina/streptomina (50µg/ml) y 500µg/ml de geneticina (G418).

Medio de crecimiento para células hTERT-RPE: DMEM F12 suplementado con 10% FBS, 1% de antibióticos penicilina/streptomina (50µg/ml) y 0.01mg/ml de higromicina.

Medio de congelamiento: 70% de DMEM, 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

2.3.3 Condiciones de crecimiento y mantenimiento

Las células se mantuvieron en estufas a 37°C y 5% de CO₂ y se efectuaron pasajes al alcanzar el 90-95% de confluencia mediante tripsinización. Para esto, las células en cultivo se lavaron con PBS 1X estéril (8% de NaCl, 0.2% de KCl, 1.44% de Na₂HPO₄, 0.24% KH₂PO₄, pH=7.4) dentro de cámaras de cultivo, se les agregó 1ml de tripsina por placa de 10cm y se incubó a 37°C de 1-5min (según el tipo celular). A continuación se inactivó la tripsina mediante el agregado de medio de cultivo fresco suplementado con FBS y las células se dividieron en nuevas placas de cultivo.

Para congelar células, luego de tripsinizarlas, se resuspendieron en medio fresco, se centrifugaron a 400g por 5min, se eliminó el sobrenadante por aspiración y las células se resuspendieron en medio de congelamiento frío en

criotubos. Se colocaron inmediatamente en hielo y a continuación a -80°C. Al día siguiente se transfirieron a nitrógeno líquido.

2.3.4 *Transfección transitoria*

Mediante fosfato de calcio: para placas de cultivo de 35mm con medio de cultivo fresco y con células al 40-50% de confluencia, se preparó la mezcla de transfección con 5µg de ADN plasmídico, 9µl de cloruro de calcio (CaCl₂) 2M y 75µl de H₂O ultrapura estéril. A esta mezcla se le agregaron 75µl de buffer hepes salino (HBS) 2X mediante goteo mientras se aireaba la mezcla con pipeta Pasteur de manera de facilitar la formación de precipitados finos de fosfato de calcio y ADN que luego puedan entrar a las células por endocitosis. Luego se incubó por 30min a temperatura ambiente (TA) y se vertió sobre las células también por goteo.

Mediante lipofectamina: para placas de cultivo de 35mm con medio de cultivo fresco sin antibiótico y con células al 80-90% de confluencia, se preparó un tubo con 5µg de ADN plasmídico diluido en 250µl de medio Opti-MEM (Invitrogen) reducido en suero, y otro tubo con 2.5µl de lipofectamina (Invitrogen) también diluida en medio Opti-MEM reducido en suero. Se incubaron 5min a TA y se mezclaron los contenidos de ambos tubos. Se incubó a TA por 20min más y se agregó la preparación a la placa de cultivo cuidadosamente.

2.4 Vectores

2.4.1 Vectores de expresión en levaduras:

Para realizar el ensayo de levaduras, se utilizaron los vectores pSOS y pMyr (Stratagene).

pSos Vector

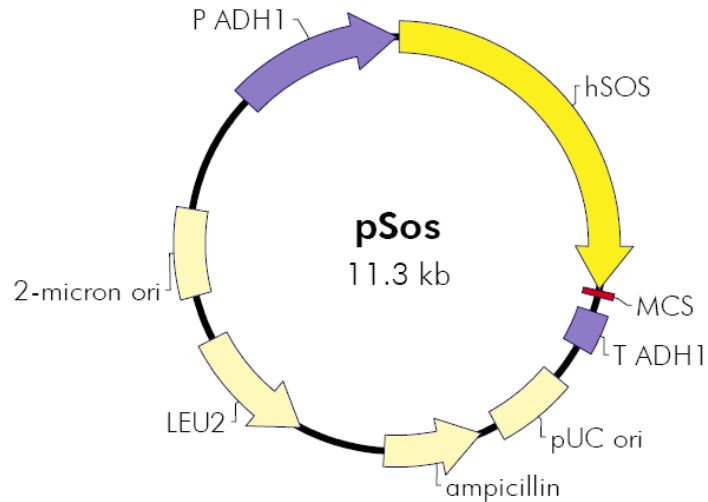


Fig. 6: mapa del vector pSOS

El vector pSOS (Fig. 6) tiene como promotor para la expresión de genes heterólogos, al promotor ADH1 que es constitutivamente activo y la proteína de interés se expresa como proteína de fusión junto con hSOS. Este vector posee el gen LEU2 para poder seleccionar las levaduras transformadas en base a requerimientos nutricionales.

pMyr Vector

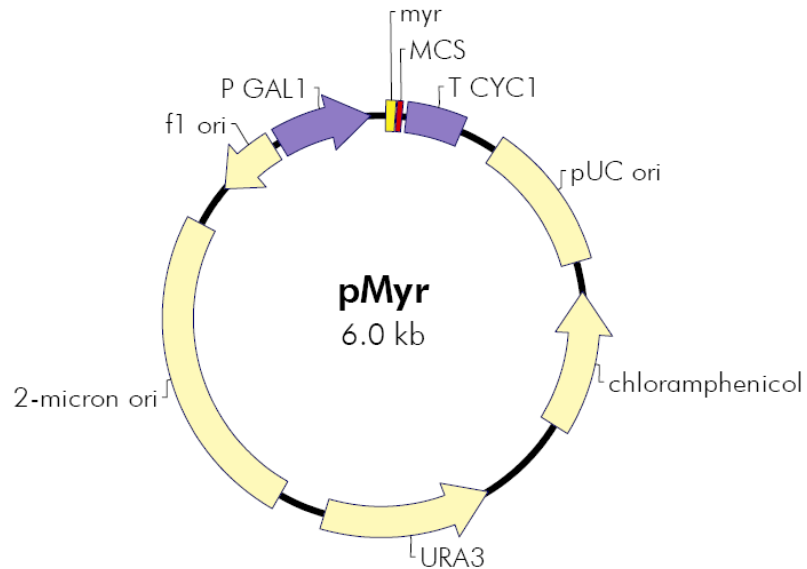


Fig. 7: Mapa del vector pMyr

El vector pMyr (Fig. 7) posee el promotor GAL1 que es inducido mediante la adición de galactosa en el medio de cultivo. La secuencia clonada en este vector se expresa como proteína de fusión con una secuencia de mistirilación: Myr. Este vector posee el gen URA3 para poder también seleccionar las levaduras transformadas en base a requerimientos nutricionales.

Ambos vectores contienen los orígenes de replicación pUC (*E. Coli*) y 2 μ (levadura). El vector pSos contiene un gen de resistencia a la ampicilina y el pMyr contiene un gen de resistencia al cloranfenicol posibilitando distinguir rápidamente entre los dos vectores al recuperar plásmidos de *E. coli*.

2.4.2 Vectores de expresión en células de mamífero:

Para transfectar y expresar proteínas en células de mamífero de forma transitoria, se utilizaron los vectores pCMV-Myc y pCMV-HA (Clontech) (Fig. 8). Estos vectores producen la proteína de interés fusionada a epítopes, c-Myc y hemaglutinina (HA) respectivamente, que son altamente inmunoreactivos, facilitando así el trabajo con la proteína mediante el uso de anticuerpos comercialmente disponibles (ideal para co-inmunoprecipitación, western blot,

etc.). Por otro lado, estos epítopes son pequeños, reduciendo así la posibilidad de afectar la función o localización proteica.

Ambos vectores utilizan el promotor CMV que asegura una expresión constitutiva y de alto nivel en un amplio rango de células de mamífero.

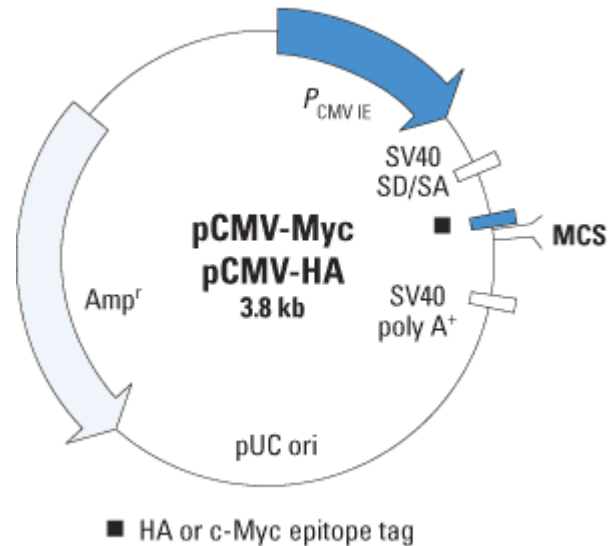


Fig. 8: mapa genérico de los vectores pCMV-Myc y pCMV-HA

2.4.3 Vectores para generar ARN de interferencia

Para inhibir la expresión de genes de forma transitoria en cultivos celulares se utilizó el sistema de ARN de interferencia (ARNi) pSUPER (Oligo Engine), el cual consiste en un vector (Fig. 9) que dirige la síntesis de transcritos cortos de ARN de interferencia (siRNA) que pueden mediar la reducción eficiente y específica de un gen determinado. El vector tiene el promotor polimerasa-III HI-RNA ya que produce pequeños ARNs que carecen de cola poliA y poseen sitios de inicio y de terminación de la transcripción bien definidos.



pSUPER RNAi System™

VECTOR: pSUPER.basic
CATALOG#: VEC-PBS-0001/0002

Length: 3176 bp

Key Sites

BglII: 928
HindIII: 934
EcoRI: 707
Sall: 949
XhoI: 955

Vector Features

f1(+) origin: 441-135
H1 promoter: 708 - 934
pUC origin: 1373-2040
Ampicillin resistance ORF: 3048-2191

T7 primer (AATACGACTCACTATAG): 627-643
M13 (-20) primer (GTAAAACGACGGCCAGT): 800-816
M13 reverse primer (AACAGCTATGACCATG): 1038-1023

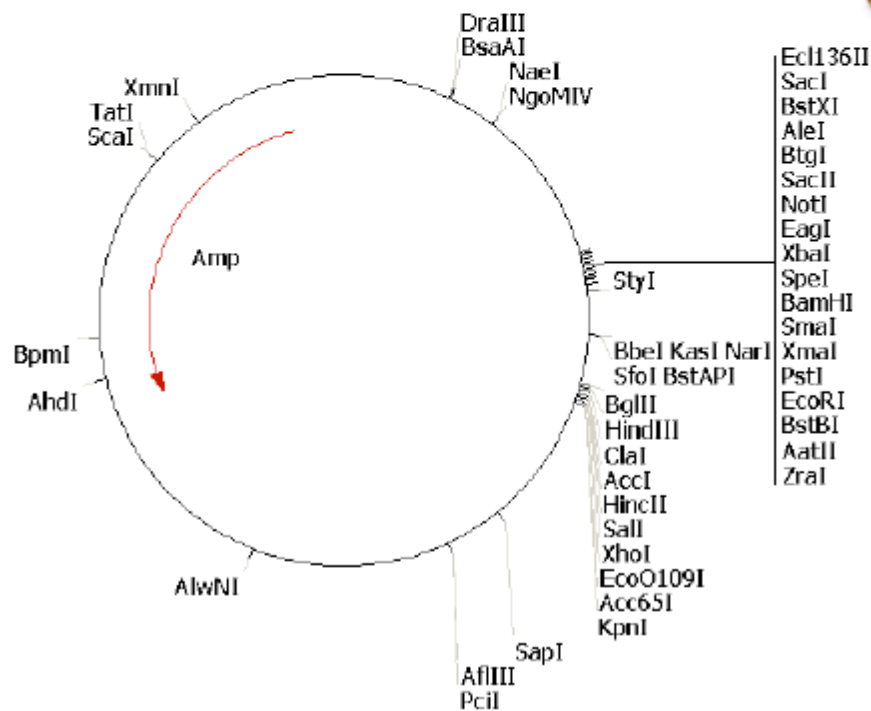


Fig. 9: mapa del vector pSUPER

2.4.4 Vectores para producción de lentivirus

Para inhibir la expresión de genes de forma transitoria o estable, se construyeron lentivirus específicos utilizando el sistema pLKO.1 de Open biosystems. Se adquirieron y testearon 5 vectores con insertos diferentes que dirigen la síntesis de horquillas cortas de ARN (shARN) que inhiben al ARNm de BBS7 en diferentes puntos (Fig. 10).

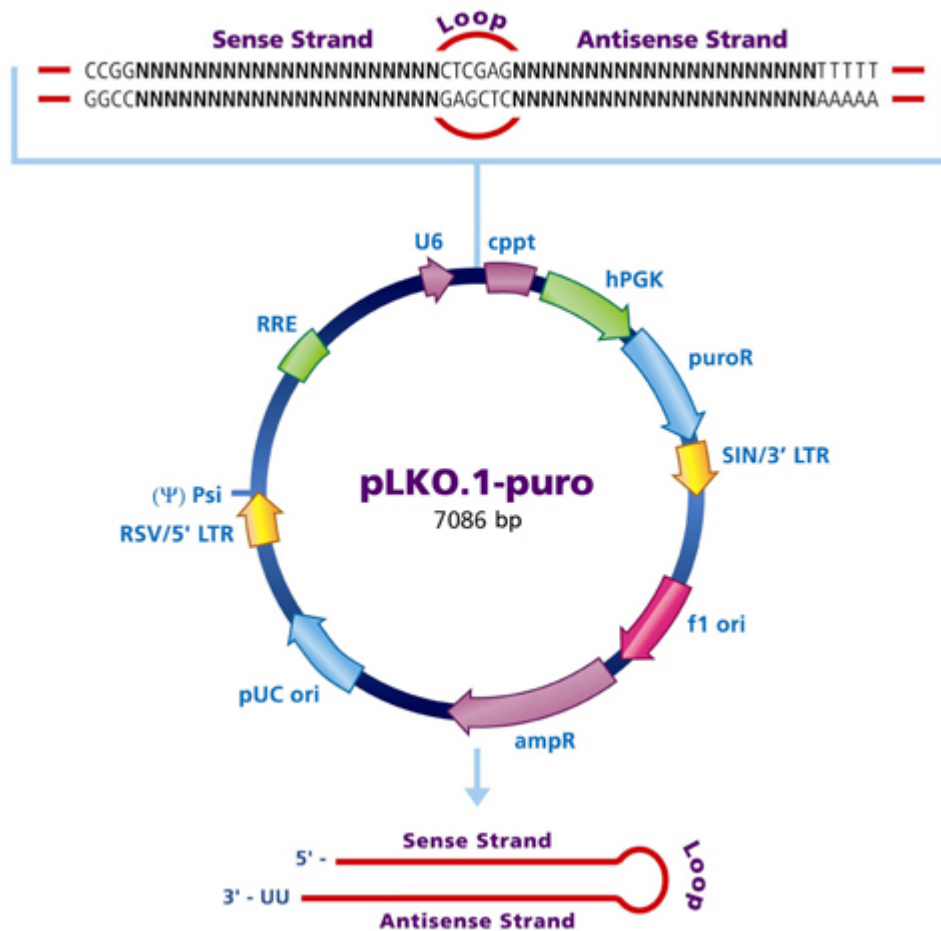


Fig. 10: Mapa del vector pLKO.1-puro mostrando la región de inserción de la secuencia codificante para las horquillas así como su producto de transcripción.

Para lograr el empaquetamiento de los vectores pLKO.1 dentro de las cápsides virales, se utilizó el sistema de lentivirus de segunda generación de Addgene que incluye dos vectores más, uno llamado plásmido de empaquetamiento, el plásmido pCMV-dr8.2, que tiene los genes que codifican para las proteínas que van dentro de las cápsides, y el plásmido de la envoltura que dirige la síntesis de las proteínas de las cápsides, el vector pCMV-VSVG. Estos vectores fueron donados por la Dra. Celia Quijano.

2.5 Oligonucleótidos

2.5.1 Para el clonado de genes

Para el clonado de genes, los oligonucleótidos se diseñaron a través del software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) agregando los sitios de restricción apropiados. Las amplificaciones correspondientes se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad (*Pfu* de Agilent o *Phusion* de Finnzymes) a partir de ADN copia (ADNc) generado sobre ARNm de células humanas y/o de ratón. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa y se purificaron utilizando un kit comercial (Invitrogen). Luego, junto con los vectores seleccionados para el clonado (2-3µg), los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción previstas en el diseño de los oligonucleótidos. Los productos de digestión se purificaron mediante columnas de sílice (Qiagen) y se ligaron los insertos con los vectores linearizados mediante la incubación en proporciones 2:1 y 4:1 junto con la enzima T4 ligasa y su buffer correspondiente e incubando la mezcla a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Con las ligaciones se transformaron bacterias competentes de *E. coli* y se analizaron los clones positivos por secuenciación para verificar la ausencia de mutaciones durante el proceso de amplificación.

2.5.2 Para ARN de interferencia

Para los ensayos de ARN de interferencia se seleccionaron targets de 19 nucleótidos derivados de la secuencia del ARN mensajero (ARNm) del gen a silenciar utilizando el programa de predicción siDESIGN de Dharmacon*, se diseñaron los oligos correspondientes según las indicaciones de los fabricantes (Fig. 11C) y se clonaron los mismos en el vector de expresión pSuper (Oligo Engine).

Los oligos se alinearon y clonaron en el vector entre los sitios de corte de las enzimas de restricción BglII y HindIII de manera de posicionarlos correctamente a continuación de la caja TATA del promotor para generar el dúplex de siRNA deseado. El transcripto resultante se pliega sobre si mismo formando una

horquilla (Fig. 11B) que luego es clivada dentro de la célula produciendo el siRNA funcional (Fig. 11A).

*<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>

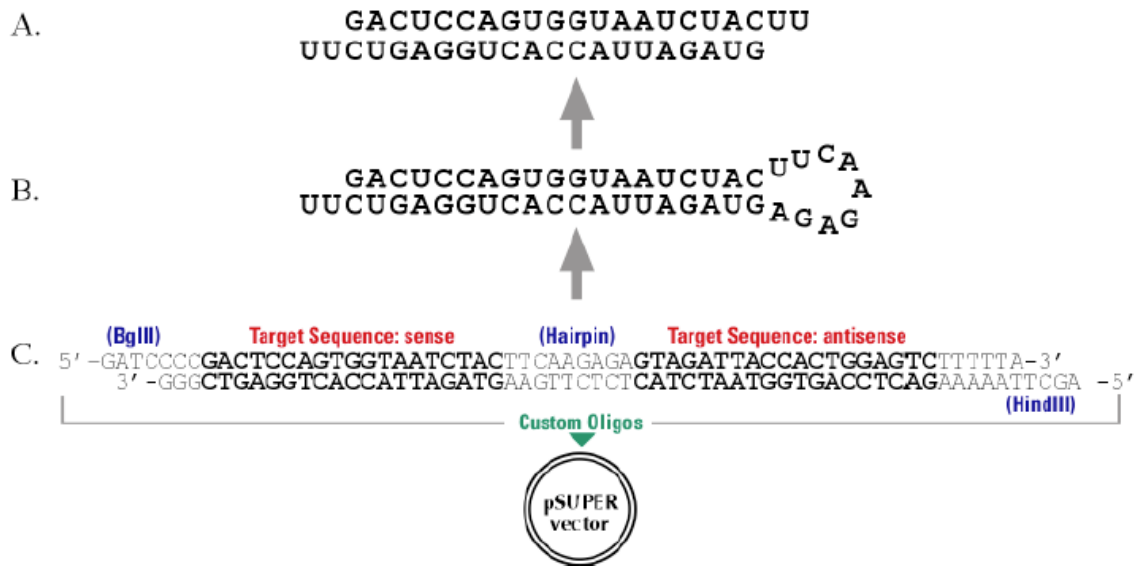


Fig. 11: Se muestra el producto de transcripción de 60 nucleótidos que forma una horquilla de ARN y luego un siRNA funcional.

Para cada gen blanco, se diseñaron entre 3 y 5 pares de oligonucleótidos diferentes para elegir el más eficiente o la combinación más eficiente.

2.5.3 Para RT-PCR

Para evaluar perfiles transcripcionales en células en cultivo, tanto controles como células tratadas, se procedió a extraer ARN (ver sección 2.9), realizar ADNc (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) (ver sección 2.10), y amplificar por PCR las secuencias de interés.

Los oligonucleótidos generados fueron de 20nt y se diseñaron a través del software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>).

En el anexo 1 se detallan los oligonucleótidos utilizados.

2.6 Anticuerpos

2.6.1 Anticuerpos primarios

- Anticuerpos policlonales de conejo generados con péptidos sintéticos contra BBS2 y BBS7 donados por el laboratorio del Dr. Katsanis, utilizados en inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.
- Anticuerpos policlonales de cabra anti-BBS7, clones C-16 y L-19 (Santa Cruz Biotechnology, sc-49802 y sc-49804), utilizados para inmunocitoquímica y western blot, respectivamente.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra RNF2, clon 6C2 (Abnova, H00006045-M01), utilizado tanto para inmunocitoquímica como para western blot.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra GAPDH (Abcam, ab36840), utilizado en western blot.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra β -catenina (Santa Cruz Biotechnology, sc-7199), utilizado para western blot.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra el epítotope HA (Sigma-Aldrich, H6908), utilizado tanto en inmunocitoquímica como en western blot y co-inmunoprecipitación.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra el epítotope HA (Sigma-Aldrich, H3663), utilizado tanto en inmunocitoquímica como en western blot y co-inmunoprecipitación.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra c-Myc (Sigma-Aldrich, H4439), utilizado tanto en inmunocitoquímica como en western blot y co-inmunoprecipitación.
- Anticuerpos monoclonal de ratón y policlonal de conejo contra γ -tubulina, (Sigma, T6557 y T5192), utilizados tanto en inmunocitoquímica como en western blot e inmunoprecipitación de cromatina.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra tubulina acetilada (Sigma, T7451), utilizado para inmunocitoquímica.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra histona H3 (Cell signaling, 2650), utilizado para western blot.

2.6.2 *Anticuerpos secundarios para inmunocitoquímica*

- Alexa fluor 488: contra IgG (H+L) de conejo, de ratón y de cabra (Invitrogen).
- Tetrametilrodamina: contra IgG (H+L) de conejo y de ratón (Invitrogen).

2.6.3 *Anticuerpos secundarios para western blot*

- Anticuerpo contra IgG-HRP de conejo, de ratón y de cabra (Santa Cruz Technology).

2.7 Extracción de ADN bacteriano (mini, midi, maxiprep)

2.7.1 *Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala, ≤30µg (Miniprep)*

Se partió de 1.5ml de cultivo bacteriano que se centrifugó por 30s y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100µl de buffer GTE (glucosa 50mM, Tris/HCl pH=8.0 25mM, 10mM EDTA) con vórtex o pipeta y se mantuvieron en hielo por 5min. Para la lisis bacteriana se agregaron 200µl de solución NS (SDS al 1%, NaOH 0.2N) preparada en el momento, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5min. Para precipitar el ADN genómico, se agregó 150µl de solución de acetato (KOAc pH=5.5 3M), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 7min. Se agregaron 500µl de LiCl 5M y se mantuvo en hielo por 5min más. Se centrifugó a 14.000g y TA por 10min para separar el ADN plasmídico de los restos celulares. A continuación se transfirieron 850µl del sobrenadante a un tubo limpio y se le agregaron 600µl de isopropanol para quitar impurezas. Se centrifugó a 14.000 y RT por 6min y se aspiró el sobrenadante. El precipitado se lavó con 200µl de etanol al 70% enfriado en hielo. Después se centrifugó a 14.000 y RT por 3min, se aspiró el etanol y se dejó secar el precipitado a TA por 5min. Por último se disolvió en 20µl de H₂O estéril con RNAsa A para eliminar el ARN de la preparación y se cuantificó por espectrofotómetro o nanodrop. Las muestras de ARN se conservaron a -20°C.

2.7.2 *Extracción de ADN plasmídico a mediana escala, 100-350µg (Midiprep), y a gran escala, 500-850µg (Maxiprep)*

Para realizar estas preparaciones de ADN plasmídico se utilizaron kits de Invitrogen (Pure Link HiPure Plasmid DNA Purification Kits) que utilizan una resina de intercambio aniónico para purificar el ADN. Se partió de cultivos bacterianos de 20ml y 100ml, respectivamente, que se trataron según las indicaciones del fabricante. Se centrifugaron los cultivos, las células se resuspendieron en un buffer de resuspensión (50mM Tris-HCl pH=8, 10mM EDTA, 20mg/ml RNasa A) y luego fueron sometidas a una lisis alcalina con una solución 0.2M NaOH y 1% SDS. A continuación se les agregó el buffer de precipitación salino (acetato de potasio 3.1M pH=5.5) que hace precipitar las proteínas, el ADN cromosómico, los restos celulares, la sal y el SDS. Entonces el lisado, conteniendo a los plásmidos, se limpió del precipitado mediante centrifugación y se colocó en la resina de intercambio aniónico, a la cual el ADN se une bajo condiciones de baja salinidad dado que el esqueleto con grupos fosfato cargados negativamente del ADN interacciona con las cargas positivas de la superficie de la resina. En condiciones de baja salinidad el ADN plasmídico se mantiene unido a la resina mientras que el ARN, las proteínas, los carbohidratos y otras impurezas son eliminadas haciendo pasar por la columna un buffer de lavado (acetato de sodio 0.1M pH=5, NaCl 825mM). Para eluir el ADN plasmídico, se utilizó un buffer de elución con alta concentración de sal (Tris-HCl 100mM pH=8.5, NaCl 1.25M). Para retirar la sal y concentrar al ADN eluido, éste se precipitó con isopropanol. Luego, el precipitado se lavó con alcohol 70%, se dejó secar y se resuspendió en H₂O estéril. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotómetro o nanodrop y se conservó a -20°C.

2.8 Extracción de ADN plasmídico de levaduras

Para recuperar el ADN plasmídico de células de levadura se partió de un cultivo de 25ml con una OD_{600} de 1.4 incubado desde el día anterior. Se centrifugó por 10min a 4000g para quitar el medio de cultivo y las levaduras se resuspendieron en buffer de lisis con liticasa para poder romper la pared celular (Sorbitol 1.2M, Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM, β -mercaptoetanol 10mM, liticasa 80U/ml) y se mezcló con vórtex. A continuación se incubó al menos 1h con agitación fuerte a 37°C para que proceda la lisis y luego se centrifugó por 10min a 1000rpm para separar las células de los restos de la pared. Las células fueron sometidas a una extracción de ADN plasmídico a pequeña escala, miniprep (sección 2.7.1). Dado que la concentración de plásmido obtenida suele ser muy baja, se concentró por evaporación y se transformaron bacterias por choque térmico (sección 2.2.5), las cuales se cultivaron y luego se obtuvieron los plásmidos por miniprep.

2.9 Extracción de ARN celular (a partir de placas de 35mm)

A células en crecimiento en placa de cultivo, se les quitó el medio de cultivo, se lavaron con PBS 1X y se les agregaron 300 μ l de TRIZOL (una mezcla de tiocianato de ácido de guanidina, fenol y cloroformo, Invitrogen) levantándolas con pipeta y pasándolas a un tubo de 1.5ml. Se incubaron 5min a temperatura ambiente y se les agregaron 80 μ l de cloroformo. Los tubos se agitaron fuerte durante 15s y se incubaron por 3min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron 15min a 12000g y 4°C separando una fase acuosa (ARN) de una fase orgánica y se transfirió el ARN a un nuevo tubo, donde se precipitó con 150 μ l de isopropanol y se mezcló por inversión. Se incubó 10min a temperatura ambiente y se centrifugó 10min a 12000g y 4°C, descartando el sobrenadante. Luego se lavó el ARN agregando 300 μ l de etanol 75%, y se resuspendió con vórtex. Se volvió a centrifugar por 5min a 7500g y 4°C, se quitó el sobrenadante con pipeta y el precipitado de ARN se dejó secar a temperatura ambiente por 10min. Para disolverlo, se resuspendió en 30 μ l de H₂O libre de ARNsas y se incubó por 10min en un baño a 56°C. Por último se cuantificó con nanodrop y se conservó a -80°C.

2.10 Preparación de ADN complementario (ADNc)

Para la realización de esta técnica se utilizó el kit comercial “Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR” de Invitrogen. En todos los casos que fue posible se partió de 5µg de ARN obtenido de células en cultivo (Sección 2.9), al cual se lo incubó por 5min a 65°C con 1mM de dNTPs (mezcla de los cuatro deoxirribonucleótidos) y 50ng/µl de un oligonucleótido compuesto solo por el nucleótido T, de modo que hibride únicamente con los ARN mensajeros (ARNm), oligo(dT). La mezcla se incubó en hielo por 1 min y se le agregó MgCl₂ 5mM, DTT 10mM como agente reductor, un inhibidor de RNAsas, 50 unidades de la enzima retrotranscriptasa y su buffer 1X, y se incubó por 50min a 42°C para que se dé la retrotranscripción, la cual se terminó incubando a 70°C por 15min. Luego se puso la mezcla en hielo y se incubó por 20min a 37°C con RNAsa H para eliminar las moléculas híbridas que hayan quedado de ARN-ADNc, se cuantificó el ADNc obtenido y se conservó a -20°C.

2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para cuantificar los ácidos nucleicos se midió la absorbancia a 260nm, a partir de la cual se calculó que una A₂₆₀=1.0 equivale a 50µg/ml de ADN doble hebra, a 33µg/ml de ADNc y a 40µg/ml de ARN. A su vez, se midió la absorbancia a 230 y 280nm para calcular la relación 260/280 que indica la pureza de la muestra con respecto a la cantidad de proteína que posee y que debe encontrarse entre 1.8 y 2.0 para asegurar buena calidad, y la relación 260/230 que indica la impureza con respecto a los restos de solventes orgánicos usados durante la extracción y que debe encontrarse entre 2.0 y 2.2. Para estas medidas se utilizaron dos espectrofotómetros diferentes, el Eppendorf BioPhotometer y el NanoDrop 1000 de ThermoScientific.

2.12 PCR

2.12.1 Amplificación para el clonado de genes

Las amplificaciones se realizaron a partir de 100ng de ADN plasmídico si el gen de interés ya se encontraba clonado en otro vector o a partir de 1µg de ADNc, en un volumen final de 50µl. La mezcla de reacción se realizó con 0.4µM de cada oligonucleótido (diseñados como se detalló en la sección 2.6.1), 0.25mM de dNTPs, 1 unidad de ADN polimerasa de alta fidelidad (Pfu o Phusion) y 1X del buffer de la enzima. El programa de PCR base utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 2min a 98°C seguida por 35 ciclos de desnaturalización de 30s a 98°C, hibridación de los oligonucleótidos por 30s a 56°C y extensión a 72°C con una duración calculada de 1min por cada Kb que tenía el gen a amplificar. A continuación se realizó una extensión final de 10min a 72°C. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Multi Gene II de Labnet international, Inc.

2.12.2 Amplificación por PCR para cuantificación relativa de ARN

Las reacciones se llevaron a cabo a partir de 0.5-1µg de ADNc, siempre partiendo de la misma cantidad de ARN y ADNc original para las diferentes muestras a comparar. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados como se detalló en la sección 2.6.1. En todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo por duplicado o triplicado y en paralelo a la amplificación del gen de interés, se amplificó un gen de expresión constitutiva a modo de control, generalmente *GAPDH*.

PCR semicuantitativa: En un volumen final de 25µl, a los 0.5-1µg de ADNc se les agregó 0.2mM de dNTPs, 0.4µM de cada oligonucleótido, 1 unidad de Taq polimerasa y buffer de PCR 1X. El programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 5min a 95°C seguida por 20-25 ciclos de desnaturalización de 30s a 95°C, hibridación de los oligonucleótidos por 30s a 56°C y extensión a 72°C también de 30s. Se realizó una extensión final de 10min a 72°C. Las reacciones se realizaron en el termociclador Multi Gene II de Labnet international, Inc. Los productos de amplificación fueron sometidos a

electroforesis en geles de agarosa y la intensidad relativa de las diferentes bandas producidas se analizó con el software ImageJ (NIH).

PCR en tiempo real (Real Time PCR): Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el método de incorporación de SYBR Green. En un volumen final de 20µl, a los 0.5-1µg de ADNc se les agregó 20nM de cada oligonucleótido y la mezcla de reacción 2X SYBR Green (mezcla comercial que contiene Platinum Taq polimerasa, el colorante SYBR Green, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dNTPs, uracil ADN glicosilasa y estabilizantes; Invitrogen). El programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 10min a 95°C seguida por 40 ciclos de desnaturalización de 20s a 95°C, hibridación de los oligonucleótidos por 15s a 56°C y extensión a 72°C de 20s. Para determinar la expresión relativa de cada gen blanco se utilizó el método de comparación de curvas de amplificación (método de $\Delta\Delta Ct$), en el cual se comparan las curvas en el punto de amplificación umbral (C_t) de las diferentes muestras y se normalizan con las curvas generadas por la amplificación del gen de expresión constitutiva. El nivel de expresión relativa se presentó como la cantidad de veces que cambió una muestra con respecto a la otra (relative fold change), que se calcula según la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct (muestra A) - \Delta Ct (muestra B)]}$$

Donde cada $\Delta Ct = Ct^{gen\ blanco} - Ct^{gen\ exp.\ const.}$

Como control de amplificación específica de cada gen, una vez finalizada la amplificación se realizaron curvas de desnaturalización sometiendo a las muestras a un aumento de temperatura de 72 a 95°C y corroborando la presencia de un único pico de desnaturalización.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Rotor-Gene 6000 Series de Corbett research.

2.13 Microarreglos

Se realizaron dos estudios de microarreglos con el mismo diseño pero en diferentes tipos celulares: HeLa y hTERT-RPE. Los análisis de microarreglos se realizaron utilizando placas de 4x44K oligonucleótidos del genoma humano (G4112F, Agilent) en un diseño de dos colores. Estas placas poseen 4 réplicas de 44.000 oligonucleótidos diferentes que abarcan un total de 27.958 ARNs, de manera de incluir los de alta y baja expresión.

2.13.1 Preparación de las muestras

Se prepararon por cuatuplicado muestras de ARN extraído de células transfectadas con los vectores pSUPER EV y pSUPER BBS7 con el fin de comparar cambios a nivel de la expresión génica en presencia y ausencia de la proteína BBS7. La calidad (integridad) y cantidad de ARN se determinó con el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent) utilizando las microplacas RNA 6000 Nano Lab Chip Kit según indicaciones de los fabricantes. Se utilizaron sólo las muestras que obtuvieron un valor de integridad (RIN, por “RNA integrity number”) mayor a 8.

2.13.2 Marcado e hibridación

Para generar un ARN complementario fluorescente para la hibridación se utilizó un kit comercial (Low RNA Input Linear Amplification, Agilent), donde se marca 1µg de ARN total utilizando los colorantes Cy5-CTP o Cy3-CTP. Cantidades iguales de cada muestra marcada se hibridaron en las microplacas a 65°C por 17h en un horno con rotación (Agilent). Luego se lavaron las microplacas y se les agregaron las soluciones de estabilización y secado.

2.13.3 Análisis

Los resultados se leyeron con un escáner de Agilent (RNA microarray scanner) y los datos fueron extraídos con el software del equipo (Agilent’s Feature Extraction software (v9.5). Los análisis se realizaron en “R” (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>) a través de paquetes del entorno Bioconductor [170]. Los análisis de expresión diferencial se realizaron utilizando el software Limma (por “linear models for microarray

data”) [171] y los análisis de ontología a través del GOstats [172]. Las lecturas provenientes de las diferentes sondas fueron filtradas considerando la saturación, la intensidad de la señal con respecto al entorno y la uniformidad de la señal. Las sondas que resultaron con alguna de las réplicas filtradas, fueron eliminadas. Los genes fueron considerados con expresión diferencial cuando el valor P ajustado resultó $<1 \times 10^{-5}$ y el valor absoluto del log₂ del “foldchange” (cantidad de veces que cambia la expresión en una condición respecto a la otra) resultó mayor a 2.

2.14 Estudios *in silico*

Para evaluar la posible existencia de señales de localización nuclear (NLS) y de señales de exportación nuclear (NES) se utilizaron los programas de predicción NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus>) [173] y NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) [174], respectivamente.

2.15 Mutagénesis sitio-dirigida

Para eliminar la señal de exportación nuclear (NES) de la proteína 7 de Bardet-Biedl, se diseñaron oligonucleótidos para generar la mutación I634A (a la cual se le llamó en adelante NES) cambiando el codón ATT, posición 633 de la secuencia codificante, por el codón GCT:

BBS71634Afw	GCTTTAAAAGAATTACAGGCTCATGAGGGAAATACG
BBS71634Arev	CGTATTTCCCTCATGAGCCTGTAATTCTTTTAAAGC

De esta manera, a partir del ORF del gen de BBS7 previamente clonado en el vector pCMV-Myc, se produjo por PCR largo una copia del vector con la mutación deseada en BBS7. La mezcla de PCR se formó con 10ng de vector (6Kb), 0.5μM de cada oligonucleótido, 0.2mM de dNTPs, buffer HF 1X y 1U de ADN polimerasa de alta fidelidad “Phusion” (Finnzymes) en un volumen final de 50μl. El programa de ciclado tuvo una desnaturalización inicial de 30s a 98°C, 30 ciclos de desnaturalización de 10s a 98°C, hibridación de 30s a 55°C y extensión de 1.5min a 72°C, y una extensión final de 10min a 72°C. El tamaño del producto de PCR fue corroborado en gel de agarosa y a

continuación fue digerido con 10U de enzima DpnI (Fermentas) por 1:30h a 37°C para eliminar el vector original (molde), ya que esta enzima digiere ADN metilado. La enzima se inactivó incubando la mezcla de reacción por 10min a 65°C, y luego se transformaron bacterias *E. Coli* DH5 α quimiocompetentes de máxima eficiencia (Invitrogen) por choque térmico. Se seleccionaron 3 colonias positivas y se analizaron los plásmidos por secuenciación corroborando la presencia de la mutación.

2.16 Inhibición de la exportación nuclear

Para evaluar la presencia de la proteína BBS7 en el núcleo celular se realizó una inhibición general de la salida de proteínas desde el núcleo bloqueando la exportación nuclear a través de la proteína CRM1. El ensayo se realizó en células NIH3T3 en cultivo mediante la aplicación de dos reactivos diferentes, por un lado se realizó un tratamiento con 10mM *N*-etilmaleimida (NEM) (disuelto en el medio de cultivo) durante 10 minutos previos a la fijación para posterior análisis por inmunocitoquímica con el anticuerpo policlonal contra BBS7. Por otro lado, se realizó la misma prueba utilizando leptomicina B (LMB), otro agente inhibidor de la exportación nuclear. Para esto se les agregó 50ng/ml (concentración final) de LMB al medio de cultivo de las células y se incubó a 37°C por 3h para luego proceder a la fijación y análisis por inmunocitoquímica.

2.17 Extracción de proteínas

2.17.1 De levaduras

Para la extracción de proteínas de levaduras se partió de cultivos líquidos de 5ml (en crecimiento de un día al siguiente). Se centrifugaron a 1000g por 5min para descartar el medio de cultivo y las células fueron resuspendidas en 100 μ l de buffer de lisis (NaOH 1.85M y β -mercaptoetanol 7.4%) y 600 μ l de H₂O enfriados en hielo, mediante agitación por vórtex. Se incubaron en hielo por 15min para lisar las células y se les agregó 42 μ l de ácido tricloracético (TCA) para precipitar las proteínas, los tubos se incubaron en hielo por 15min. Luego se centrifugaron a 15.000g por 10min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1ml de acetona enfriada en hielo y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se resuspendió el precipitado en 200 μ l de una

solución conteniendo SDS 2.5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, EDTA 5mM y cóctel de inhibidor de proteasas, mediante vórtex e hirviendo las muestras por 10min. A continuación los tubos se centrifugaron a 15.000g por 5min ya 4°C, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Por último se midió la concentración de las proteínas obtenidas.

2.17.2 De células de mamífero

Para la extracción de proteínas de células en cultivo se les quitó el medio y se las lavó con PBS 1X. Luego se les agregó 300µl de buffer de lisis (NaCl 150mM, Tris-HCl pH=7.5 50mM, NP-40 1%, inhibidores de proteasas y ortovanadato de sodio 1mM) y se incubaron las placas en hielo por 15min. Luego las placas se rastrillaron removiendo las células aún adheridas a las placas, se homogeneizaron con pipeta y se transfirieron a tubos de 1.5ml. Se volvieron a incubar en hielo por 15min adicionales facilitando la lisis con vórtex cada 2min. Por último se centrifugaron 15min a 15000g y 4°C y el sobrenadante (proteínas) fue transferido a un tubo limpio para su cuantificación y análisis. Finalmente las proteínas se almacenaron a -20°C.

2.18 Cuantificación de proteínas

Para la medición de la concentración obtenida de proteínas se utilizó el método de ácido bicinoninico (BCA). Para la medición se construyó una curva de calibración con sero albúmina bovina (BSA) con las siguientes diluciones: 0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.15mg/ml. Se realizaron dos diluciones de las muestras: 1/10 y 1/20. Se pusieron todas las muestras y la curva de calibración por triplicado en una microplaca de 96 pocillos (microtiter fondo plano de baja adherencia, Deltalab), 20µl por pocillo con 200µl de BCA. La placa se agitó durante 30s y se incubó por 30min a 37°C, se la dejó alcanzar la temperatura ambiente y se midió en el lector fotométrico de microplacas Multiskan Ex de Thermo Scientific.

2.19 Electroforesis

2.19.1 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para la preparación de geles de agarosa se disolvió la cantidad deseada de agarosa (entre 0.8 y 1.5%) en buffer TBE 1X (10.8g/l de tris, 5.5g/l de ácido bórico, 0.93g/l de EDTA) calentando en microondas. Al gel aún líquido se le agregó 500ng/ml de bromuro de etidio y se dejó gelificar a temperatura ambiente en un molde. Las muestras de ADN o ARN a ser corridas en un gel de agarosa se mezclaron con azul de carga (2.5mg/ml de xilen-cianol, 30% de glicerol) y se colocaron en los pocillos del gel junto al cátodo de la cuba. Junto con las muestras se cargó siempre un marcador de peso molecular como referencia (Ladder de 100pb o de 1Kb, Invitrogen). Los geles se corrieron en TBE 1X a 80-120V según el caso y se visualizaron irradiándolos con luz UV.

2.19.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las soluciones utilizadas y el armado del gel se detallan en el anexo 3.

Para separar proteínas por su peso molecular se utilizaron geles desnaturizantes de SDS poliacrilamida (SDS-page) a diferentes porcentajes según el tamaño de las proteínas a separar (8-15%). Ver anexo 3 para la preparación de los geles. Las proteínas se hirvieron durante 5min en buffer de carga, Laemmli buffer 4X, se pusieron en hielo y se cargó la cantidad deseada en los geles. A su vez, se destinó un pocillo del gel a un marcador de peso molecular preteñido (P7711S, Biolabs). La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 2h a 30mA por gel en buffer TGS (Tris250mM pH=8.6, glicina 1.92M y 1% de SDS).

2.20 Transferencia

Una vez completa la electroforesis de proteínas se procedió a transferirlas a una membrana de PVDF (polivinilidenodifluoruro, Amersham). Para esto el gel se sumergió en buffer de transferencia (TGS 1X, metanol 20%) y la membrana fue hidratada en metanol antes de ponerla sobre el gel. Se armó el cassette de transferencia en el siguiente orden: esponja, papel absorbente, gel, membrana, papel absorbente y esponja, el cual se colocó en la cuba con buffer de transferencia y se le aplicó corriente eléctrica a través del gel de 400mA por 2h a 4°C con agitación.

2.21 Western blot

Las membranas fueron bloqueadas durante una noche en buffer PBS-T (PBS 1X, Tween 20 0.2%) con leche descremada al 5%. Luego las membranas fueron lavadas con PBS-T 3 veces (5min c/u) con agitación y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-T durante 3h con agitación. Se repitieron los lavados y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario por 1 hora. Se volvieron a lavar y se procedió a la detección con ECL (Pierce), método de quimioluminiscencia donde el sustrato, luminol, es oxidado por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario emitiendo luz que impacta sobre una placa de rayos X (Amersham).

Para los ensayos donde se evaluó expresión diferencial de alguna proteína, la membrana también fue incubada con anticuerpo anti-GAPDH, ya que es una proteína de expresión constitutiva por lo que sirve como control de carga. La intensidad relativa de las diferentes bandas producidas se analizó con el software ImageJ (NIH).

2.22 Ensayo de doble híbrido en levaduras

Para buscar potenciales interactores de la proteína BBS7 en levaduras se utilizó un ensayo de doble híbrido citoplasmático (Cytotrap two-hybrid system, Stratagene). Se trata de un método para detectar interacciones proteína-proteína *in vivo* ya que se basa en la generación de proteínas de fusión cuya interacción en el citoplasma de la levadura activa la vía de señalización Ras, induciendo el crecimiento celular.

Se utiliza una levadura *S. cerevisiae* mutante que es sensible a la temperatura (cepa cdc25H) dado que contiene una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen CDC25. Este gen es homólogo al gen humano Sos (hSos), que codifica un factor de intercambio guanil-nucleótido que se une y activa a Ras, comenzando la vía de transducción de señales Ras. Esta mutación no permite el crecimiento de las levaduras a 37°C pero sí a 25°C.

El sistema Cytotrap se basa en la habilidad de la proteína hSos de complementar el defecto cdc25 y activar la vía de transducción de señales Ras, permitiendo que la cepa crezca a 37°C. El ADN que codifica la proteína de interés (bait protein) se clona en el vector pSos, generando una proteína de fusión entre hSos y la proteína de interés. El ADN que codifica otra proteína de interés (target protein) o una librería de expresión (prey), es clonado en el vector pMyr y se expresa como una proteína de fusión con una secuencia de miristilación que ancla la proteína de fusión a la membrana celular. Ambas proteínas de fusión son co-expresadas en la levadura y las células son incubadas a 37°C. Si las proteínas bait y target interactúan físicamente, la proteína hSos es reclutada a la membrana y entonces activa la vía de señalización Ras permitiendo a la cepa cdc25H crecer a 37°C (Fig. 12).

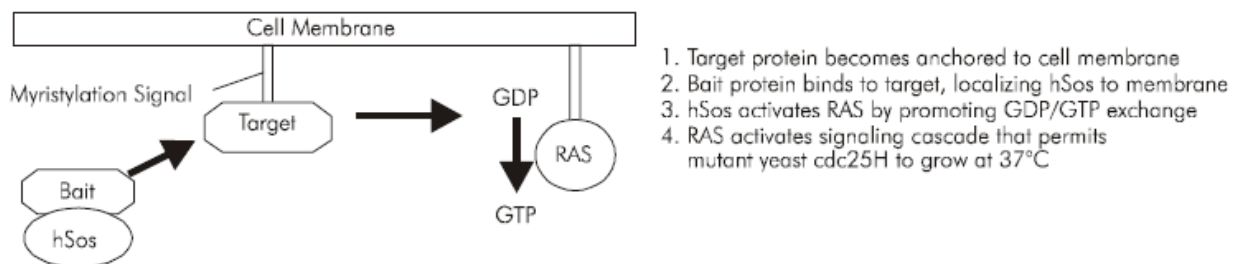


Fig. 12: Esquema de vía de señalización de Ras utilizada en el sistema doble-híbrido (adaptado del manual del "CytoTrapVector Kit", Stratagene).

La secuencia codificante del gen BBS7 se clonó en el vector pSOS para expresar la proteína SOS de humanos fusionada al extremo N-ter de BBS7 en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta construcción se transformó en levaduras de la cepa *cdc25H*, y posteriormente se las transformó con una librería de ADNc de cerebro embrionario humano (Stratagene), clonada en el vector pMyr. Se aislaron los plásmidos que resultaron positivos y los potenciales interactores fueron identificados mediante secuenciación.

2.23 Co-inmunoprecipitación

2.23.1 De proteínas sobre-expresadas

Las distintas proteínas BBS y la proteína RNF2 fueron clonadas en vectores de expresión pCMV-Myc (las BBSs) y pCMV-HA (RNF2) (ver sección 2.4.2). Estas construcciones fueron introducidas en células Hek293 mediante transfecciones transitorias utilizando lipofectamina o fosfato de calcio (ver sección 2.3.4), utilizando vectores vacíos como control. Los lisados celulares fueron obtenidos a las 48 horas post-transfección (ver sección 2.7.2). Para los ensayos de co-inmunoprecipitación se utilizaron bolitas de agarosa al 4% acopladas a proteína G, la cual posee sitios de unión para la porción Fc de los anticuerpos IgG (Ezview Red Protein G Affinity Gel, Sigma). Las bolitas (40µl por ensayo) se lavaron con el mismo buffer en el que se homogeneizaron las proteínas y se incubaron con 10µg de anticuerpo anti-Myc (Sigma) diluido en 500µl de PBS 1X, por 1h a 4°C con rotación continua. Luego se lavaron con el mismo buffer y se incubaron con el lisado celular, del cual se conservaron 50µl a -20°C para utilización posterior, por 4-16hs a 4°C con rotación continua. Por último se lavaron 3 veces también con rotación, las muestras fueron resuspendidas en buffer Laemmli 4X y se corrieron en un gel de poliacrilamida utilizando los 50µl de lisado separados anteriormente para corroborar la expresión de las proteínas. A continuación las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y analizadas por western blot utilizando el anticuerpo anti-HA (ver secciones 2.19-2.21).

2.23.2 *De proteínas endógenas*

Para corroborar la interacción BBS7-RNF2, se lisaron células HeLa y se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.23.1 pero incubando las bolitas de agarosa con el anticuerpo policlonal anti-BBS7 utilizado anteriormente. El western blot se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-RNF2 también utilizado anteriormente.

2.24 **Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia**

Distintas líneas celulares (HeLa, hTERT-RPE y NIH3T3) fueron utilizadas con el fin de determinar la localización a nivel celular de nuestras proteínas de interés mediante ensayos de inmunocitoquímica y detección tanto por microscopía de fluorescencia como confocal.

Para cada ensayo de inmunocitoquímica, se cultivaron las células seleccionadas sobre un cubreobjetos estéril colocado dentro de una placa de cultivo de 35mm. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se retiró el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con metanol por 10min a -20°C o con paraformaldehído 4% por 10min a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados con PBS 1X con agitación y las células se permeabilizaron con tritón 0.1% en PBS 1X por 10min. Se repitieron los lavados y se realizó un bloqueo con suero fetal 5.5% en PBS1X por 1h con agitación. Las células se volvieron a lavar y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X por 2h con agitación. Luego se realizaron 3 lavados y la placa se incubó con el anticuerpo secundario también diluido en PBS 1X por 1h. Se realizaron 3 lavados, de 3min cada uno con agitación, y las células se incubaron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) para teñir el núcleo celular. Se realizaron los últimos lavados y los cubreobjetos fueron escurridos y montados sobre portaobjetos con 20µl de medio de montaje (Prolong gold antifade reagent, Invitrogen). Al día siguiente fueron sellados con esmalte de uñas y visualizados al microscopio. Para el análisis se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Epifluorescence Microscope Olympus IX81) y un microscopio confocal para corroborar localización sub-celular (Spectral Confocal Microscope Leica TCS SP5).

2.25 Fraccionamiento celular

En los ensayos en que se compararon la fracción nuclear y la citoplasmática, se utilizaron células Hek293 y HeLa y se siguió el protocolo detallado en el kit “Qproteome Cell Compartment” de Qiagen. Para cada experimento se partió de 2 placas de 10cm confluentes que fueron tratadas con los diferentes buffers del kit obteniendo por centrifugación cuatro diferentes fracciones de manera secuencial: citosol, membranas, núcleo y citoesqueleto. Dado el interés de los experimentos, sólo se utilizaron las fracciones nuclear y citosólica, que fueron analizadas por western blot utilizando como proteínas control la histona H3 y la γ -tubulina, respectivamente.

2.26 Inmunoprecipitación de cromatina

Para evaluar si la proteína BBS7 se une al ADN se realizó una inmunoprecipitación de cromatina siguiendo el protocolo “Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit” de Cell Signaling. Para cada ensayo se partió de 5 placas de 10cm confluentes de células HeLa o de células Hek293. En primer lugar se generaron enlaces covalentes entre proteínas y ADN en contacto físico (crosslink) agregando 270 μ l de formaldehído 37% al medio de cultivo de cada placa e incubando 10min. La reacción se detuvo agregando 1ml de glicina. A continuación se quitó el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X enfriado en hielo. Se les agregó 1ml de PBS1X con 10 μ l de PMSF, levantando, resuspendiendo y juntando las células de las 5 placas en un único tubo. Luego fueron centrifugadas a 1500rpm por 5min a 4°C y resuspendidas en 5ml de buffer salino con inhibidores de proteasas para lisar las membranas plasmáticas. Se incubaron en hielo por 10min mezclando por inversión cada 3min. Los núcleos se colectaron centrifugando por 5min a 3000rpm y 4°C y se resuspendieron en 5ml de buffer. La cromatina fue digerida en fragmentos agregando 4500 unidades de nucleasa micrococcal, que se mezcló por inversión y se incubó por 20min a 37°C. La digestión se detuvo agregando 50 μ l de EDTA y poniendo los tubos en hielo. Para romper las membranas nucleares, los núcleos se sonicaron mediante 3 pulsos de 15s con 15% de amplitud, incubando en hielo por 1min entre pulsos. Los lisados se centrifugaron por 10min a 10.000rpm y 4°C y la cromatina (el sobrenadante) fue transferida a un nuevo tubo. Se separaron 50 μ l para analizar su calidad y el resto se conservó a -80°C. El análisis de calidad consistió en tratar esa fracción de cromatina con RNAsa A por 30min

a 37°C y proteinasa K por 2h a 65°C. El ADN fue purificado por columna de sílice y cuantificado por nanodrop. A su vez fue corrido en un gel de agarosa al 1% para verificar que el tamaño de los fragmentos de ADN generados estuviesen entre 150 y 900pb, o sea, entre 1 y 5 nucleosomas de largo.

Una vez corroborada la calidad de la cromatina, esta fue preparada para la inmunoprecipitación con diferentes anticuerpos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se reservaron 10µl de cromatina como control previo a la precipitación. Para cada inmunoprecipitación se pusieron en un tubo entre 10 y 20µg de cromatina (alrededor de 500µl de la preparación) junto con el anticuerpo seleccionado. Se utilizaron entre 5 y 8µg de los anticuerpos anti-RNF2 y anti-BBS7. Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti-histona H3 y como control negativo uno anti-IgG de conejo (el cual se espera que no inmunoprecipite cromatina) y anti-γ tubulina (el cual tampoco se espera que inmunoprecipite cromatina si se logró una correcta separación del núcleo y el centrosoma), y se incubaron con rotación toda la noche a 4°C. Al día siguiente se les agregó 30µl de bolitas de agarosa con proteína G y se incubaron 2h más en las mismas condiciones. A continuación se lavaron las bolitas de agarosa 3 veces con un buffer con baja cantidad de sal mediante incubación con rotación con el mismo y centrifugado. Luego se realizó un lavado con un buffer rico en sales para facilitar la elución de la cromatina, para lo cual, ésta se incubó con un buffer de elución por 30min a 65°C con agitación a 1200rpm y la cromatina se purificó por centrifugación, transfiriéndola a un nuevo tubo. A todas las muestras, incluyendo la cromatina antes de precipitar que se había preparado previamente, se las trató con proteinasa K con NaCl durante 2h a 65°C para eliminar las proteínas. Luego se realizó una purificación del ADN obtenido mediante columnas con membrana de sílice. El análisis del ADN se realizó mediante PCR en tiempo real, en el cual para cada una de las muestras se realizaron amplificaciones control con oligonucleótidos específicos del gen RPL30, que codifica para la proteína ribosomal L30 utilizado como control positivo, y sin oligonucleótidos como control negativo. A su vez, se ensayó la amplificación de un gran número de genes donde predominaron los blancos de RNF2 y regiones promotoras de la expresión de los mismos.

2.27 Producción de lentivirus

Para una correcta expresión de transgenes en células hTERT-RPE, se realizó una transducción con lentivirus. Para el armado de los mismos, primero se seleccionó el vector pLKO.1-puro conteniendo la región codificante para la horquilla que inhibe la expresión de BBS7 más eficiente entre los 5 disponibles (ver sección 2.4.4), mediante transfección con fosfato de calcio en células HeLa. Una vez elegido el mejor vector, se utilizaron 3µg para transfectar células Hek293FT junto con 3µg del plásmido dr8.2 y 0.375µg del plásmido vsv.G para la construcción de los virus. Como control, se construyeron lentivirus con un plásmido pLKO.1 conteniendo la secuencia para la generación de una horquilla que no hibrida con ningún ARNm (NS de “non-silensing”). Las transfecciones se realizaron con lipofectamina en placas con células en un 80% de confluencia. A las 72h se evaluó la morfología y viabilidad del cultivo por microscopía, verificando que hubiera lisis producida por la salida de los virus y se procedió a cosechar las partículas virales levantando el medio de cultivo y centrifugando por 15min a 2000rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante con los lentivirus fue filtrado con filtros descartables de 0.45 micras, alicuotado de a 1ml (donde se asume un título viral de aproximadamente 8×10^6 ut/ml por cálculos realizados durante la puesta a punto la técnica) y congelado a -80°C.

2.28 Transducción de células de mamífero

Para la transducción con los lentivirus que inhiben la expresión de BBS7 así como los lentivirus control (NS) se utilizaron células hTERT-RPE aproximadamente a un 70% de confluencia. A cada placa de 35cm se les agregó en 1ml de medio de cultivo, 300µl de los lentivirus producidos junto con 8µg/ml de polibreno, polímero catiónico utilizado para mejorar la eficiencia de la infección viral. En todos los casos, se destinó una placa de células sin transducir como control de la selección con antibióticos. A las 24h, una vez constatado el buen estado de las células, se les cambió el medio de cultivo para comenzar la selección agregando medio de cultivo con 20µg/ml de puromicina. A las 48h se procedió a cosechar las células transducidas controlando que en el control con células sin transducir la selección hubiese actuado correctamente (muerte celular masiva).

2.29 Análisis *in vivo* utilizando el pez cebra

Para la verificación en un modelo animal de los datos obtenidos en células, se estableció una colaboración con el laboratorio del Dr. Katsanis en la Universidad de Duke, Durham, USA. Para estos análisis se utilizó como modelo animal el pez cebra, *Danio rerio*, en el cual se realizaron experimentos de inhibición de la expresión génica en las primeras etapas del desarrollo embrionario para observar el efecto de esa inhibición sobre la expresión de otros genes. Estos experimentos fueron llevados a cabo principalmente por Perciliz Tan. Se diseñaron morfolinós (MOs) específicos, ácidos nucleicos modificados que dirigen la inhibición de genes mediante hibridación con el transcrito primario inhibiendo su correcta maduración o traducción (Gene Tools). Con el objetivo de evaluar cambios en la expresión de distintos blancos de RNF2 como consecuencia de la depleción de proteínas BBS, los embriones de pez cebra en el estadio de una-dos células fueron inyectados con 1nl de preparación de morfolino a dosis previamente establecidas: 1.5ng de morfolino contra *bbs4*, 6ng de morfolino contra *bbs7*, 0.5ng de morfolino contra *rnf2* y 5ng de un morfolino control que no inhibe la expresión de ningún gen en el pez cebra (diseñado contra una mutación intrónica del gen de la β -globina humana). En todos los casos se trató de cantidades de morfolino que corroboramos que bajan significativamente la expresión de su gen blanco sin afectar la sobrevivencia de los animales. Los embriones fueron montados y fijados 30 horas post-fertilización (estadio Prim-15) y se realizaron hibridaciones con sondas de ARN antisentido específicas para los genes blanco de RNF2 *bcl11a*, *six1b*, *pou3f2*, *hoxb8a* y *lef-1* (clones obtenidos de Openbiosystems). Para la realización de las sondas se utilizó como molde la secuencia de los genes amplificada por PCR y se marcaron con nucleótidos ligados a digoxigenina. Los embriones fueron fijados y permeabilizados, luego fueron incubados con las sondas específicas en condiciones que facilitan la hibridación de los ARNs antisentido con los ARNm que se estuviesen expresando en ese momento. A continuación se realizaron lavados para eliminar los restos de sonda inespecífica que pudieran quedar y los ARNs híbridos se identificaron por inmunohistoquímica usando anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina contra las sondas marcadas con digoxigenina mediante un substrato cromogénico [175].

Resultados:

Capítulos 3, 4 y 5

Los datos que se presentan en estos capítulos fueron publicados en

“Epistasis between RET and BBS mutations modulates enteric innervation and causes syndromic Hirschsprung disease” de Pontual L, Zaghoul NA, Thomas S, Davis EE, McGaughey DM, Dollfus H, Baumann C, Bessling SL, Babarit C, Pelet A, Gascue C, Beales P, Munnich A, Lyonnet S, Etchevers H, Attie-Bitach T, Badano JL, McCallion AS, Katsanis N, Amiel J. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33): 13921-6, 2009.

“Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome” Zaghoul NA, Liu Y, Gerdes JM, Gascue C, Oh EC, Leitch CC, Bromberg Y, Leibel RL, Sidow A, Badano JL, Katsanis N. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 10602-10607, 2010.

“Direct role of Bardet-Biedl Syndrome proteins in transcriptional regulation” Gascue C, Tan P, Cardenas-Rodriguez M, Libisch G, Fernandez-Calero T, Liu Y, Astrada S, Robello C, Naya H, Katsanis N, Badano JL. *Journal of Cell Science*, 125: 1–14, 2012.

Ver Anexo 6.

Capítulo 3:

Búsqueda de interactores de las proteínas BBS

3.1 Estrategia experimental

Para obtener información sobre el rol biológico de proteínas de función desconocida la estrategia elegida como punto de partida fue la identificación de proteínas capaces de interactuar físicamente con la proteína de interés. Estos interactores se buscaron a través de un ensayo doble híbrido en levaduras y se confirmaron en células de mamífero por ensayos de co-inmunoprecipitación. La caracterización se inició con el estudio de BBS7 dado que no existe ninguna información funcional disponible acerca de esta proteína excepto que interactúa con otras proteínas BBS y conforma un subgrupo de proteínas BBS junto a BBS1 y BBS2, con quienes comparte similitudes en su secuencia de aminoácidos. Por este motivo, es probable que la información que se obtenga sobre BBS7 sea extrapolable a otras proteínas BBS.

3.2 Ensayo doble híbrido

Con el objetivo de identificar nuevos interactores para la proteína BBS7, se realizó un ensayo doble-híbrido en levaduras ("Cytotrap assay") utilizando esta proteína como anzuelo ("bait"). Como se describió en la sección 2.22, este es un método para detectar interacciones proteína-proteína *in vivo* utilizando a *S. cerevisiae* cdc25H como hospedero ya que en este ensayo la interacción de dos proteínas en el citoplasma de la levadura activa la vía de señalización Ras, rescatando la mutación sensible a la temperatura en *cdc25* e induciendo el crecimiento celular. Entonces se clonó el marco abierto de lectura de *BBS7* en el vector pSOS, de manera de poder expresar en células de levadura una proteína de fusión SOS-BBS7. En primer lugar se crecieron diferentes clones de las levaduras *S. cerevisiae* cdc25H transfectadas con el vector pSOS-BBS7 para evaluar si existía algún efecto tóxico para la célula por la sobre-expresión de esta proteína exógena, así como para evaluar los diferentes niveles de la proteína de fusión por western blot. Al no detectar toxicidad, se seleccionó la colonia con mayor expresión de SOS-BBS7 para continuar con el ensayo. A continuación se determinó si la expresión de SOS-BBS7 era capaz de activar el ensayo por sí sola. Para esto, las levaduras se co-transformaron con pSOS-BBS7 y pMyr vacío (EV) y se evaluó la capacidad de estas células de crecer tanto a 25°C como a la temperatura restrictiva de

37°C utilizando glucosa o galactosa en el medio de cultivo. Este ensayo mostró que SOS-BBS7 no es capaz de activar la vía de *Ras* por sí misma.

Para realizar el ensayo se utilizó una librería de ADNc de cerebro fetal humano clonada en el vector pMyr, donde las distintas proteínas se expresan fusionadas a una señal de mistirilación (Myr). Con el objetivo de analizar aproximadamente 10^6 colonias transformantes (pSOS-BBS7/pMyr-librería) de manera de tener una amplia cobertura de la librería, primero se realizó una puesta a punto del sistema evaluando la eficiencia de transformación de las levaduras con pSOS-BBS7. Luego se procedió a transformarlas con la librería de manera de poder hacer el análisis de 10^6 unidades formadoras de colonias. En una primera ronda de selección se aislaron 34 colonias que crecieron a 37°C en placas con galactosa. A continuación estos positivos se testearon individualmente creciéndolos a 25°C o 37°C tanto en glucosa como en galactosa. De este experimento surgieron 13 clones que cumplieron el criterio de validación del ensayo, la capacidad de crecer a 37°C solo en un medio con galactosa como fuente de carbohidratos. Se secuenciaron los 13 vectores pMyr extraídos de las colonias positivas resultando ser iguales 11 de ellos, correspondientes al gen *RNF2* (en *Homo sapiens* también llamado *RING1B*, *BAPI*, *DING*, *BAP-1*, *HIP13* y *RING2*). La posible interacción de BBS7 con RNF2 fue confirmada re-transformando las levaduras *cdc25H*, *cdc25H/pSOS(ev)* y *cdc25H/pSOS-BBS7* con pMyr-RNF2. Los resultados indicaron que RNF2 sólo pudo promover el crecimiento celular a 37°C cuando se co-transformó con pSOS-BBS7 (Fig. 13).

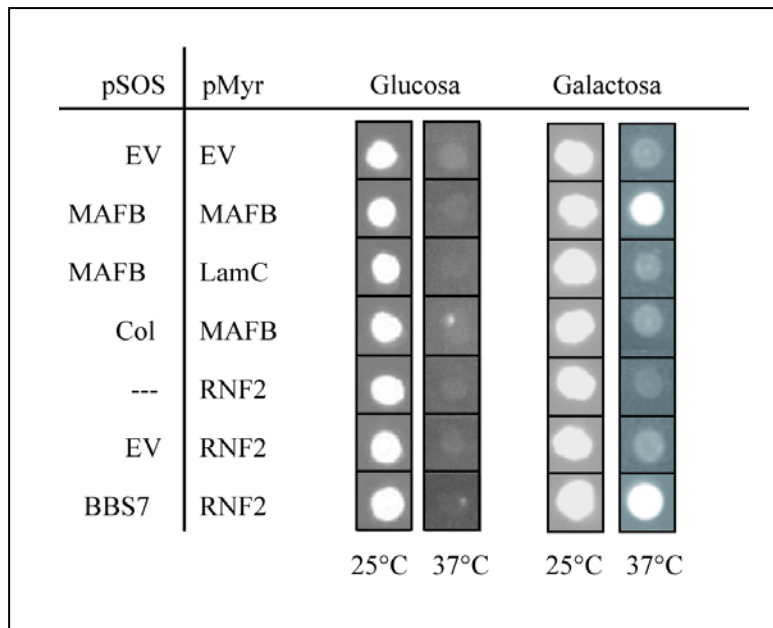


Fig.13: Ensayo doble-híbrido en levaduras utilizando a BBS7 como anzuelo que resultó en la identificación de RNF2 como interactor. Se muestra como control positivo la interacción MAFB-MAFB y como controles negativos los dos vectores vacíos (EV-EV), MAFB-Lamin C y Col-MAFB, proteínas que no interaccionan. También se muestra como RNF2 activa la vía de Ras solo en presencia de BBS7 y no por sí sola.

La proteína RNF2 es una proteína nuclear que funciona como una E3 ubiquitín ligasa que monoubiquitina la histona H2A en la lisina 119 [176]. A su vez, es miembro del Polycomb Group, PcG, los cuales son complejos multiproteicos que se unen a la cromatina con un rol remodelador llevando principalmente a la silenciamiento epigenético de sus genes blanco [177]. Las proteínas polycomb fueron originalmente descritas en *Drosophila* como represores transcripcionales de genes homeóticos durante el desarrollo. Ahora se sabe que los genes blanco de las proteínas PcG se encuentran fundamentalmente vinculados al desarrollo, la proliferación y la diferenciación celular [178-180]. Dado que en varias ciliopatías existe un desbalance entre la proliferación y la diferenciación y que el vínculo entre BBS7 y una proteína nuclear podría generar una oportunidad para entender cómo la información captada por las cilias llega al núcleo para finalmente modular la expresión génica, el vínculo

BBS7-RNF2 resultó interesante como para profundizar su análisis tomando un papel principal en este trabajo que se irá desarrollando en este y los capítulos siguientes.

3.3 Co-inmunoprecipitación en células de mamífero

Para evaluar si la interacción entre BBS7 y RNF2 ocurría también en células de mamífero, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP). Primero se co-expresaron ambas proteínas unidas a un epítoto diferente, Myc-BBS7 y HA-RNF2, en cultivos de células Hek293. A continuación las células se lisaron y se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo Myc, las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida y finalmente se analizó la presencia de RNF2 mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Como control, en paralelo se realizó el mismo ensayo pero transfectando las células con el vector pCMV-Myc vacío (Myc-EV, empty vector) junto con HA-RNF2. Sólo se observó la presencia de RNF2 en los inmunoprecipitados cuando se co-expresaron Myc-BBS7 y HA-RNF2 y no en el control negativo (Fig. 14 izq.). Durante el desarrollo de la tesis se obtuvieron anticuerpos contra las proteínas endógenas, por lo que se testeó la interacción BBS7-RNF2 sin tener que realizar transfecciones transientes, de modo de evitar la posibilidad de observar artefactos asociados con la sobre-expresión de proteínas. Se realizó entonces una CoIP de ambas proteínas utilizando anticuerpos contra las proteínas endógenas, lisando células sin transfectar e inmunoprecipitando con un anticuerpo policlonal anti-BBS7. Como control negativo se inmunoprecipitó con inmunoglobulinas de conejo. A continuación se corrieron y separaron las proteínas mediante la técnica de SDS-PAGE y se observó la presencia de RNF2 por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-RNF2. Nuevamente, sólo se observó RNF2 al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-BBS7 y no con el control negativo (Fig. 14 der.).

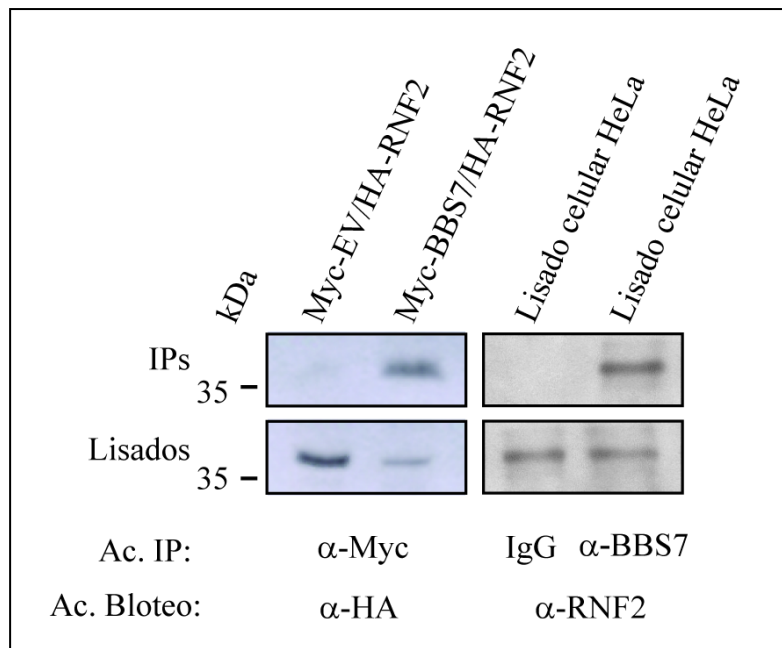


Fig. 14: Ensayos de co-inmunoprecipitación mostrando que BBS7 interactúa con RNF2 en células de mamífero. Izquierda: lisados celulares expresando ambas proteínas fusionadas a un epítopo (Myc y HA respectivamente) y bloteados con un anticuerpo anti-HA luego de realizar una electroforesis SDS-PAGE. Derecha: interacción de ambas proteínas endógenas mediante inmunoprecipitación de lisados celulares sin tratar utilizando un anticuerpo anti-BBS7 e inmunoglobulinas de conejo como control negativo y análisis por Western blot con un anticuerpo anti-RNF2.

Con el ensayo mostrado en la Fig. 14 quedó demostrado que BBS7 y RNF2 son capaces de interactuar en células de mamífero. Para ampliar este resultado, resultó interesante probar si la interacción con RNF2 era exclusiva de BBS7 o era una característica común a varias BBSs dado que existen múltiples evidencias de que estas proteínas suelen formar complejos.

3.4 Co-inmunoprecipitaciones para evaluar interacción de RNF2 con otras BBSs

Dado que existen al menos 17 proteínas BBS y que se ha visto que forman complejos probablemente realizando funciones similares o complementarias, se evaluó la capacidad de otras BBSs de interactuar con RNF2. Para esto se realizaron transfecciones en células con los vectores pCMV-Myc donde fueron clonadas los marcos abiertos de lectura de los genes de BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS6, BBS8 y BBS10, junto con el vector pCMV-HA RNF2. De nuevo se realizó un control utilizando el vector pCMV-Myc vacío (Myc-EV). En este caso se realizó a su vez otro control en el cual también se expresó fusionada a Myc, una proteína no directamente relacionada con las BBS, SIN1 (Myc-control), junto con HA-RNF2. A continuación se lisaron las células y se realizaron las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-Myc. Este ensayo resultó en que HA-RNF2 fue co-inmunoprecipitado con todas las proteínas BBS testeadas pero no con los controles (Fig. 15), mostrando que estas BBSs también tienen la capacidad de interactuar con RNF2 en este sistema.

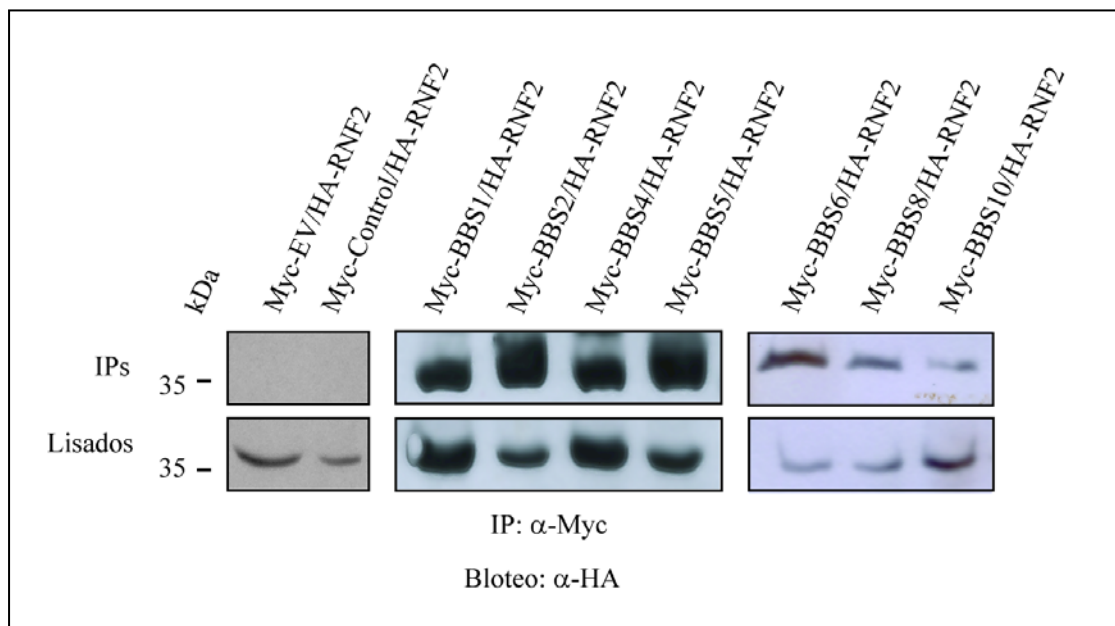


Fig. 15: BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS6, BBS8 y BBS10, pero no la proteína no relacionada SIN1 (Myc-control), interactúan con RNF2 en células de mamífero.

La capacidad de las proteínas BBS (reportadas como centrosómicas/ciliares) de interactuar con una proteína nuclear como RNF2 generó una pregunta acerca de en qué compartimiento celular se puede estar dando esta interacción. Una posibilidad sería que las proteínas BBS interactúen con un pool citoplasmático de RNF2. Otra posibilidad sería que las proteínas BBS tengan la capacidad de entrar al núcleo celular, al menos de manera transitoria, por lo cual esta localización no haya sido detectada o reportada. Para intentar responder esta interrogante, se realizaron análisis bioinformáticos de las secuencias de las proteínas BBS así como una serie de ensayos de localización celular que se describen en el siguiente capítulo.

Capítulo 4:

Localización de las proteínas BBS salvajes y con las mutaciones encontradas en pacientes

4.1 Estrategia experimental

Los resultados del capítulo 3 mostraron a varias proteínas BBS interactuando con una proteína nuclear, RNF2. Dado que la localización de las proteínas BBS estudiadas hasta el momento es ciliar, de cuerpo basal y/o de centrosoma, nuestros datos generaron una interrogante a la hora de determinar un sitio para que esa interacción se lleve a cabo.

En primer lugar se determinó la localización endógena de la proteína BBS7 dado que la misma no había sido reportada aún, teniendo en cuenta la posibilidad de que esta proteína pueda estar presente no sólo en los compartimientos clásicos de estas proteínas, sino también en el compartimiento nuclear.

Para evaluar la posibilidad de que las BBSs pudiesen ingresar al núcleo celular, se realizaron estudios *in silico* de la secuencia de estas proteínas buscando señales relacionadas con una posible localización nuclear.

Dado que el análisis *in silico* mostró la presencia de señales de exportación nuclear (NES por "Nuclear Export Signal") en la gran mayoría de las proteínas BBS (ver sección 4.3), se decidió evaluar la relevancia funcional de estas señales centrando los estudios en la proteína principal de este trabajo, BBS7. La funcionalidad de la señal NES se evaluó mediante dos aproximaciones diferentes. Por un lado, esta señal se anuló mediante mutagénesis dirigida y por otro, se realizaron ensayos de bloqueo químico de la exportación nuclear para evaluar la localización endógena de BBS7.

A continuación se analizaron los patrones de localización celular de dos mutaciones de cambio de sentido en BBS7 que fueron previamente encontradas en pacientes. Es sabido que en ausencia de un ensayo funcional, establecer si una variante encontrada en pacientes es deletérea o no, puede ser sumamente complicado. Esto es especialmente cierto para las mutaciones de cambio de sentido donde las consecuencias de un cambio de aminoácido muchas veces sólo pueden ser evaluadas en forma relativa, basándose en el nivel de conservación del residuo involucrado, la naturaleza del cambio y la frecuencia de este tipo de variantes en individuos no afectados. Evaluar por tanto los efectos de estos cambios a nivel de la localización de

la proteína podría aportar información valiosa. Para esto, las proteínas, tanto la salvaje como las mutantes, fueron expresadas en cultivos celulares fusionadas al epítipo Myc, y se analizaron por inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. Dado que este análisis mostró la existencia de cambios de localización de las proteínas mutantes de BBS7 con respecto a la salvaje (ver sección 4.6), surgió la pregunta de si las mutaciones que presentan otras proteínas BBS podrían tener efectos similares. Para responder esta pregunta, se determinó la localización celular de varias proteínas BBS comparando la distribución de la proteína salvaje con las diferentes mutantes reportadas en los pacientes. Esta parte del trabajo se enmarcó dentro de un proyecto realizado en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Katsanis en la Universidad de Duke de Estados Unidos, que apuntó a evaluar funcionalmente un número de mutaciones de cambio de sentido en diferentes genes BBS (125 alelos en un total de 14 genes) con el objetivo de entender porqué en algunas familias BBS se hereda como rasgo recesivo, porqué en otras ocasiones mutaciones en un determinado gen no son suficientes para causar la enfermedad, y porqué en otros casos, mutaciones en más de un gen colaboran para modular la expresividad del síndrome. Como se detalla más adelante, este estudio involucró la realización de ensayos *in vivo* utilizando como modelo al pez cebra, *Danio rerio*, evaluando cambios en su desarrollo al anular la expresión de diferentes genes BBS mediante el uso de morfolinós (MOs) y a su vez, realizando experimentos de rescate inyectando ARNs codificantes para las diferentes proteínas salvajes y mutantes, complementando los ensayos de localización realizados en el marco de esta tesis.

4.2 Localización endógena de BBS7

Dado que la proteína utilizada en los experimentos de búsqueda de interactores mostrados en el capítulo 3 fue BBS7 y que la misma no había sido caracterizada, se procedió a estudiar su patrón de localización celular. Para esto se utilizó la técnica de inmunocitoquímica en cultivos celulares utilizando un anticuerpo policlonal para BBS7 producido en conejo (donado por el Dr. Katsanis). Dada la localización reportada para las proteínas BBS caracterizadas a la fecha, para el análisis también se utilizaron anticuerpos anti- γ tubulina y anti-tubulina acetilada, de manera de marcar centrosomas-cuerpo basal y el axonema ciliar respectivamente. En todos los casos se utilizó DAPI para teñir el núcleo celular (Fig. 16).

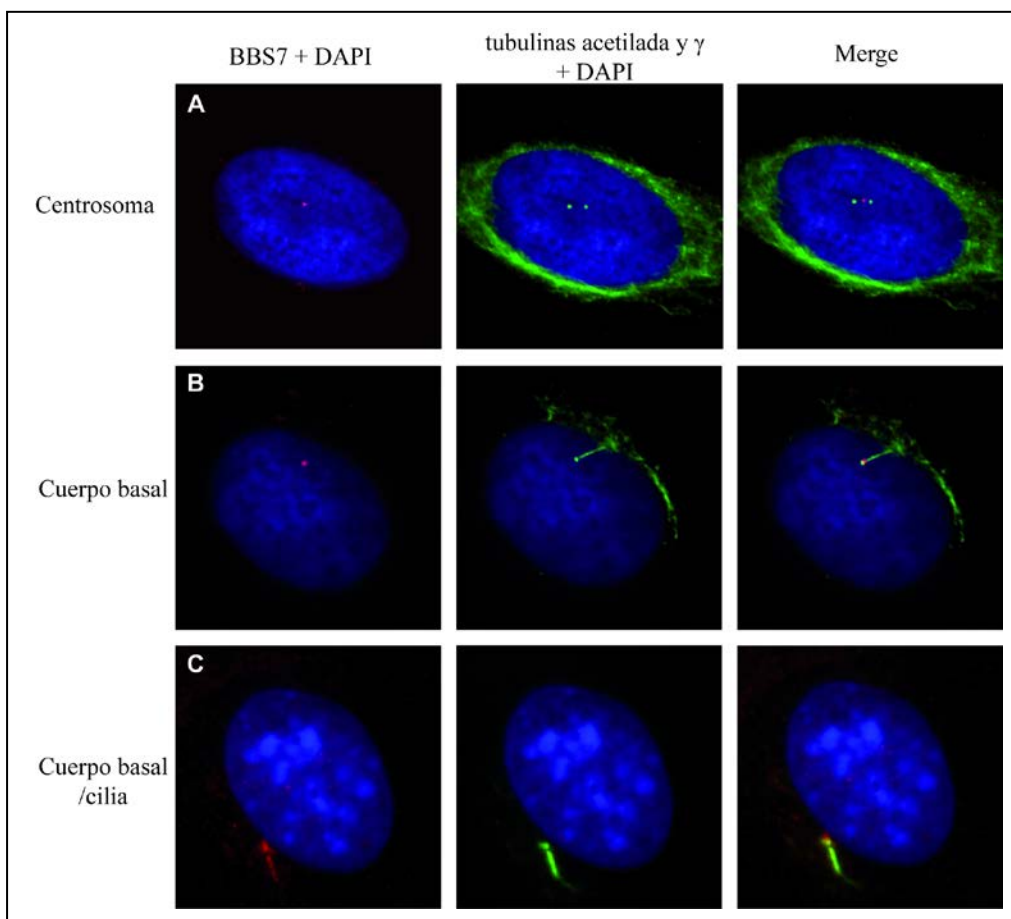


Fig. 16: Inmunicitoquímica en células NIH3T3 realizada con anticuerpos anti-BBS7 (rojo, columna izq.), anti-tubulinas γ y acetilada (verde, columna central) y DAPI (azul). BBS7 puede observarse en la región centrosómica (A), en el cuerpo basal (B) y en cuerpo basal y cilia (C).

Utilizando células murinas NIH3T3, el ensayo de la Fig. 16 mostró una localización dinámica de BBS7, presentándose no sólo en el centrosoma como la mayor parte de las proteínas BBS reportadas a la fecha, sino que también se encontró en el cuerpo basal y el axonema ciliar en algunas células. Estos resultados indican que si bien la localización de BBS7 sería comparable a la de otras proteínas BBS reportadas, la misma no sería estática, de hecho la visualización de BBS7 en el axonema ciliar no se dio en todas las células ciliadas, lo que sugeriría que la entrada a la cilia podría estar bajo cierta regulación.

Sin embargo, con las condiciones de cultivo e inmunocitoquímica utilizadas no se pudo observar a BBS7 dentro del núcleo celular. Entonces se planteó la hipótesis que si BBS7 es capaz de entrar al núcleo celular, quizás lo haga de forma transitoria o se encuentre en niveles bajos, volviéndose por lo tanto indetectable en las condiciones utilizadas. Por lo tanto, en primer lugar se realizó un análisis *in silico* de las proteínas BBS intentando obtener información acerca de posibles motivos o señales que pudieran mediar su localización y en particular su entrada/salida del núcleo.

4.3 Análisis *in silico* de las proteínas BBS

Para evaluar si BBS7 u otra de las proteínas BBS tendrían la capacidad de ingresar al núcleo celular, se realizó un análisis *in silico* en busca de señales de importación nuclear (NLS) utilizando el programa informático de predicción NLStradamus [173]. Estas señales generalmente se caracterizan por la presencia de un grupo de 16 aminoácidos específicos (KRPAATKKAGQAKKKK) suficiente para dirigir a la proteína hacia el núcleo celular, señal monopartita, aunque en algunas proteínas también se presenta como una señal bipartita, la misma secuencia de AA dos veces con una separación de 10 AA espaciadores, donde ambas señales se comportan de manera interdependiente. Las proteínas que portan estas señales son reconocidas por la molécula transportadora importina α/β e ingresadas al núcleo [181, 182]. Se analizó la secuencia de aminoácidos de las 16 proteínas BBS reportadas a la fecha. Con la excepción de BBS14/CEP290, ninguna de las proteínas BBS analizadas tendría una NLS.

La ausencia de una señal NLS sin embargo, no es impedimento para que una proteína ingrese al núcleo celular dado que existen mecanismos no convencionales de ingresar a este compartimiento que no requieren de la presencia de este tipo de señal [183]. Si efectivamente las proteínas BBS tienen la capacidad de ingresar al núcleo celular, una explicación posible de porqué no son detectadas es que por ejemplo, sus niveles en este compartimiento sean mantenidos bajos, a través de su exportación activa. La salida de proteínas del núcleo en muchos casos es mediada por un tipo de secuencias aminoacídicas denominadas señales de exportación nuclear (NES). Estas señales son extremadamente relevantes en la regulación de la localización subcelular de un gran número de proteínas, en particular de aquellas que cumplen roles transitorios y altamente regulados dentro del núcleo, teniendo impacto por ejemplo en la transcripción y otros procesos nucleares fundamentales para la viabilidad de la célula [184]. Las señales NES consisten en un grupo de residuos aminoacídicos ricos en leucinas que son reconocidos por los receptores CRM1 localizados en los poros nucleares, conformando un sistema de translocación muy conservado evolutivamente [185, 186].

Para la búsqueda de las señales NES se analizaron las proteínas BBS1-BBS16 con el programa NetNES 1.1 [174], encontrándose una o más de estas señales en todas las proteínas BBS con la única excepción de BBS8. A modo de ejemplo se muestra el análisis de BBS1 en la Fig.17, los demás análisis se muestran en el anexo 4.

BBS1: Sec-Pos-Residuo	ANN	HMM	NES	Predicción
Secuencia-176-Q	0.112	0.246	0.102	-
Secuencia-177-L	0.848	0.247	0.674	Si
Secuencia-178-E	0.076	0.193	0.148	-
Secuencia-179-L	0.704	0.193	0.689	Si
Secuencia-180-S	0.106	0.054	0.122	-
Secuencia-460-R	0.099	0.287	0.062	-
Secuencia-461-L	0.791	0.293	0.627	Si
Secuencia-462-R	0.080	0.260	0.189	-

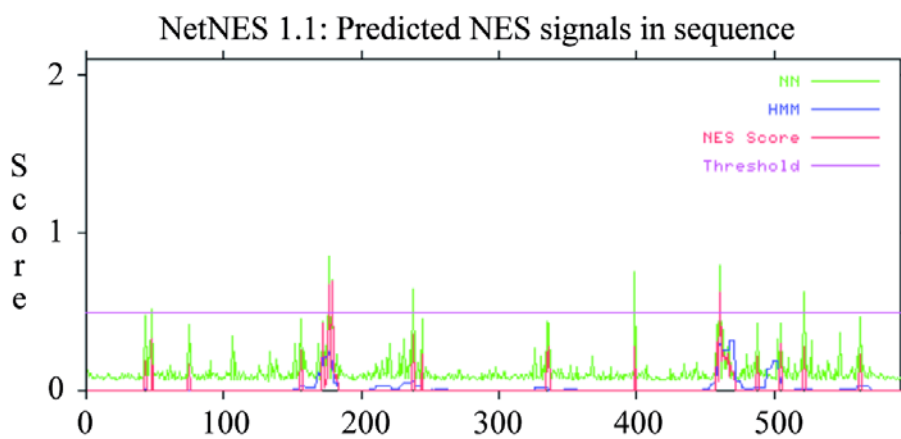


Fig. 17: Análisis *in silico* de la proteína BBS1 mostrando tres señales de exportación nuclear (picos rojos), halladas a través del programa NetNES 1.1. Se muestran solamente la primera proteína analizada.

Este resultado sugiere que las proteínas BBS podrían tener la capacidad de entrar al núcleo celular, quizás de manera no convencional, y que pudieran ser activamente exportadas del mismo a través de la proteína CRM1.

Para poder testear esta posibilidad, se evaluó en primer lugar la funcionalidad de la señal NES encontrada. Para esto se realizó una mutagénesis dirigida con oligonucleótidos diseñados para anular la señal NES en la proteína BBS7 de manera de poder observar a continuación si la mutación afecta su localización.

4.4 Mutagénesis sitio-dirigida hacia el sitio NES de BBS7

Los datos aportados por el software utilizado para la predicción de las señales de exportación nuclear mostraron que BBS7 tendría una señal NES entre los aminoácidos leucina 625 e isoleucina 634 que se muestra como dos picos positivos en el análisis (Fig. 18, panel superior). Utilizando el mismo predictor, se evaluó el impacto de introducir mutaciones en diferentes residuos de esta señal. De acuerdo con este análisis, mutando la isoleucina 634 a un residuo de alanina, aminoácido (AA) del mismo grupo que tampoco tiene polaridad, anularía completamente la señal NES en la proteína BBS7 (Fig. 18, panel inferior).

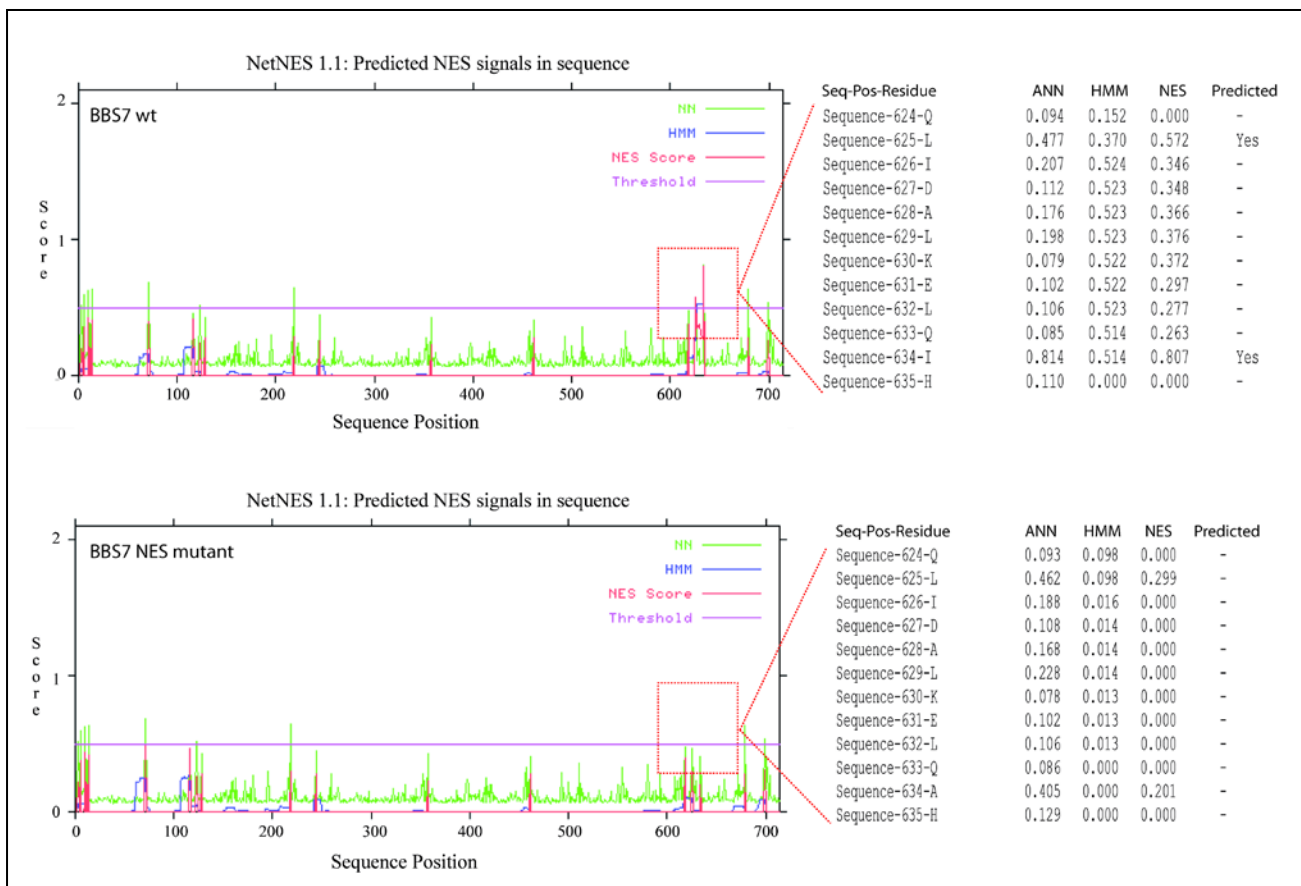


Fig. 18: Análisis *in silico* de BBS7 mostrando la localización de una señal de exportación nuclear, NES (picos rojos, panel superior). La introducción de la mutación I634A anula esta señal (panel inferior).

Considerando la predicción del software NetNES 1.1 se generaron oligonucleótidos de manera de introducir una mutación que cambiase el codón ATT por el codón GCT (posición 633 de la secuencia codificante) en la secuencia del marco abierto de lectura de BBS7 utilizando el vector pCMV Myc-BBS7 como molde. De esta manera la proteína expresada presenta un cambio en la isoleucina blanco por una alanina, mutación I634A generada por la construcción Myc-BBS7 I634A, aquí llamada mutante NES, que a continuación fue utilizada para evaluar la funcionalidad de esta señal a nivel celular. Se realizó un ensayo de inmunocitoquímica sobre-expresando tanto la proteína BBS7 salvaje o “wild type” (wt) como la mutante NES, en ambos casos fusionadas en su extremo N-terminal a un epítipo Myc, para poder evaluar si se observaban diferencias en la localización de estas proteínas (Fig. 19).

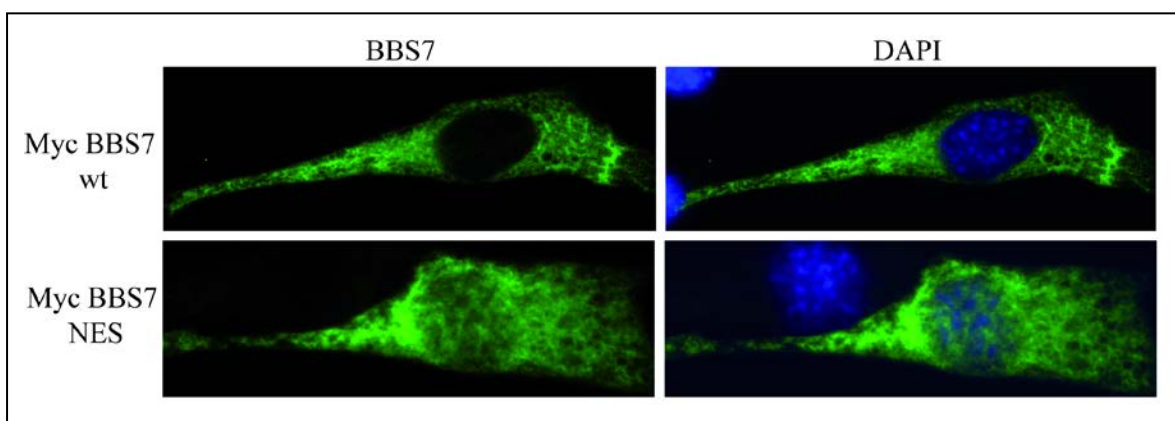


Fig. 19: Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células NIH3T3 expresando Myc-BBS7 wt (panel superior) y Myc-BBS7 NES (panel inferior) utilizando un anticuerpo anti-Myc (verde) y DAPI para mostrar el núcleo celular.

Frecuentemente la sobreexpresión de proteínas en células de mamífero no reproduce la localización celular de la proteína endógena, posiblemente debido a los altos niveles de expresión asociados a la transfección transitoria y la utilización de un promotor fuerte como el CMV. Posiblemente por estos motivos, Myc-BBS7 wt estaría inundando el citoplasma y ya no se limitaría a ubicarse en la región centrosómica como se mostró para la proteína endógena (Fig. 16). Teniendo en cuenta estas dificultades, de todos

modos es posible utilizar este tipo de sistemas artificiales para evaluar el impacto de distintos cambios en la proteína de interés. En este sentido, es importante notar que las células transfectadas con Myc-BBS7 NES, mostraron una localización diferente a la de las células expresando la proteína wt. Mientras la proteína Myc-BBS7 wt se presentó exclusivamente en el citoplasma en la gran mayoría de las células analizadas, Myc-BBS7 NES se presentó distribuida en toda la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo celular en la mayor parte de las células (Fig. 19, panel inferior; Fig. 24 para ver cuantificación del efecto). Por lo tanto la señal NES sería funcional sugiriendo que BBS7 podría estar ingresando al núcleo de donde sería activamente exportada.

Para testear esta posibilidad, se llevó a cabo un ensayo de fraccionamiento celular que permitiese observar y cuantificar la acumulación de la proteína BBS7 NES en el núcleo en comparación con la proteína wt. Para esto se cultivaron células HeLa y se transfectaron con los vectores pCMV-Myc BBS7 y pCMV-Myc BBS7 NES, utilizando el vector vacío pCMV-Myc EV como control. Luego las células se lisaron de modo tal de ir separando las fracciones nuclear y citosólica (ver sección 2.25) que se analizaron por Western blot para evaluar la cantidad relativa de cada variante de BBS7 con un anticuerpo monoclonal anti-Myc, y utilizando los anticuerpos anti- γ -tubulina y anti-histona H3 como controles de pureza de las fracciones obtenidas (Fig. 20).

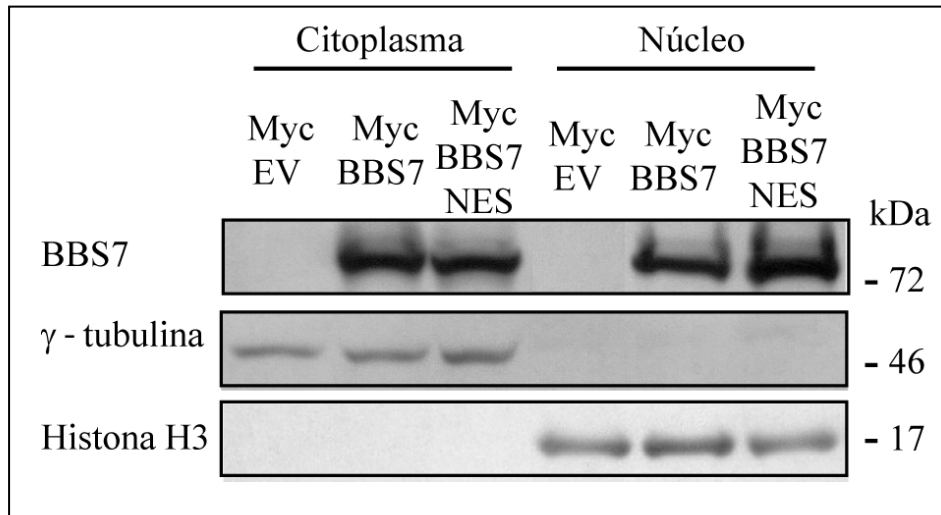


Fig. 20: Fraccionamiento celular en células de mamífero luego de ser transfectadas con Myc-EV, Myc-BBS7 wt y Myc-BBS7 NES. Se utilizaron los anticuerpos anti- γ tubulina y anti-histona H3 como control de las fracciones citoplasmática y nuclear respectivamente.

En este experimento se observó que si bien es posible detectar Myc-BBS7 wt en el núcleo, existe una acumulación mayor de BBS7 NES en la fracción nuclear en comparación con la proteína salvaje (aumento del 50% calculado en base a la intensidad de las bandas con el programa ImageJ). Estos resultados estarían de acuerdo con lo observado por inmunocitoquímica y apoyan la idea de que BBS7 tendría la capacidad de entrar el núcleo celular y de que la señal NES sería funcional.

4.5 Localización nuclear de BBS7 endógena

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde se muestra que BBS7, en condiciones de sobre-expresión, tendría la capacidad de entrar al núcleo pero sería activamente exportada del mismo, se podría explicar el hecho de no poder visualizar la proteína endógena en el núcleo por inmunocitoquímica. Teniendo en cuenta este factor, y con el fin de poder observar la presencia de BBS7 endógena en el núcleo, se realizaron una serie de experimentos basados primero en aumentar la concentración de trabajo de nuestro anticuerpo BBS7 y luego en realizar un bloqueo de la salida de proteínas hacia el citoplasma a través de la señal NES. Existen al menos dos drogas

capaces de unirse a CRM1 y bloquear su acción; estas son leptomicina B y *N*-etilmalemida, que se ha probado que pueden utilizarse en ensayos *in vitro* [186-188].

En primer lugar se pudo observar que la utilización del anticuerpo BBS7 utilizado previamente pero a una concentración de trabajo mayor (1/250 vs 1/500), resultó en una señal nuclear clara (Fig. 21, paneles superiores). A su vez, un tratamiento de 3h con 50ng/ml de leptomicina B (LMB) previo a la fijación para inmunocitoquímica resultó en un aumento evidente de la señal nuclear de BBS7 (Fig. 21, paneles inferiores).

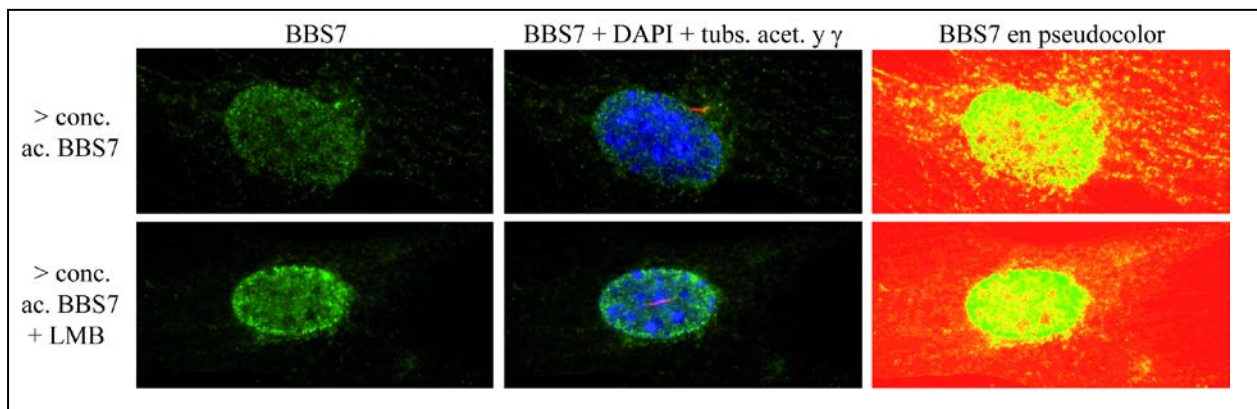


Fig. 21: Inmunocitoquímica en células NIH3T3 sin tratar (panel superior) y tratadas con LMB (panel inferior). En la primera columna se muestra a BBS7 en verde, en la columna central se muestra junto con DAPI (azul) para marcar el núcleo y con las tubulinas γ y acetilada para marcar centrosoma/cuerpo basal y cilia (rojo), respectivamente. En la última columna se muestra la misma imagen de la primera columna en pseudocolor para remarcar la presencia de BBS7 dentro del núcleo celular.

A continuación se realizó un ensayo con la otra droga reportada que bloquea la salida de proteínas a través de CRM1, *N*-etilmalemida (NEM), de modo de poder evaluar si se observa un efecto similar. Se trataron células NIH3T3 con 10mM de NEM durante 10min y luego se analizaron por inmunocitoquímica. Para evitar el riesgo de aparición de señal inespecífica debida al aumento de la concentración del anticuerpo, en este caso se utilizó la concentración de anticuerpo anti-BBS7 puesta a punto para los

ensayos de localización reportados al principio de este capítulo (Fig. 16). Mientras que los controles realizados sin tratamiento resultaron en la misma distribución mostrada en la figura 16, el tratamiento con NEM resultó en la aparición de una señal nuclear evidente para BBS7 que aparece en forma de cúmulos o agregados dentro del compartimiento nuclear (Fig. 22).

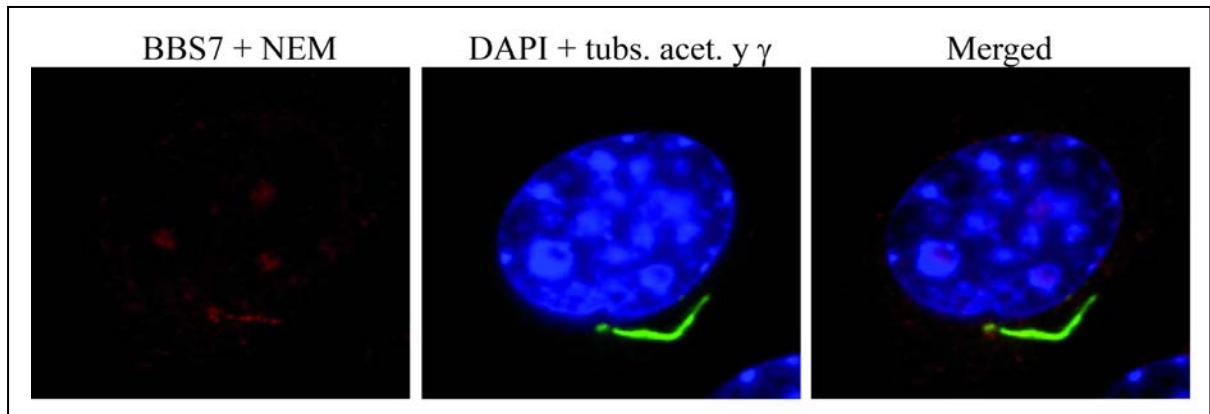


Fig. 22: Inmunocitoquímica en células NIH3T3 donde se muestra a BBS7 (rojo) en acúmulos nucleares luego del tratamiento con NEM (primer panel), luego se muestra el núcleo marcado con DAPI y las tubulinas γ y acetilada para marcar centrosoma/cuerpo basal y cilia, respectivamente (verde).

Como se muestra en la Fig. 22, BBS7 se encontró en el cuerpo basal y la cilia, como ya se había mostrado anteriormente, pero a su vez estaría ingresando al núcleo ya que se puede ver un aumento en la cantidad de proteína en este compartimiento al bloquear la exportación nuclear mediada por CRM1 al tratar con las dos drogas testeadas.

Como punto final a estos análisis, se intentó observar la localización endógena de BBS7 en el núcleo por otra aproximación técnica, el fraccionamiento de células sin tratar. A pesar que la mayor parte de la proteína se localizó en el citoplasma, como se esperaba, se logró observar una banda correspondiente a BBS7 en la fracción nuclear (Fig. 23).

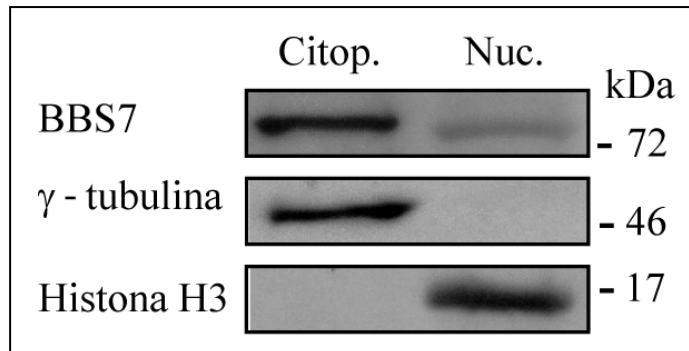


Fig. 23: Western blot realizado sobre las fracciones citoplasmática y nuclear de células sin tratar utilizando los anticuerpos contra BBS7 y contra γ -tubulina e histona H3 como control de las fracciones.

En resumen, dadas las evidencias obtenidas por diferentes aproximaciones, se puede concluir que BBS7 tiene la capacidad de entrar al núcleo celular al menos de manera transitoria.

4.6 Análisis de las mutantes naturales de BBS7

A partir de los datos mostrados en este capítulo, se generó la pregunta de si la entrada de BBS7 al núcleo celular sería relevante para la función de esta proteína y por ende para el desarrollo de la enfermedad. Resultó entonces interesante determinar la localización de las proteínas BBS7 que presentan las mutaciones que han sido descritas en los pacientes BBS, y en particular las mutaciones de cambio de sentido, en donde la secuencia de aminoácidos ha sido alterada. Hasta el momento de este estudio, se habían reportado dos mutaciones de este tipo generando proteínas con las siguientes alteraciones en la secuencia de aminoácidos: H323R y T211I [11]. Ambas mutaciones fueron encontradas en homocigosis en pacientes BBS y aún no se habían reportado estudios funcionales sobre ellas.

Para poder analizarlas, se generaron estas variantes de BBS7 por mutagénesis dirigida utilizando como molde la construcción pCMV-Myc BBS7 y se transfectaron células NIH3T3 para analizar su localización por inmunocitoquímica. El experimento se realizó con las diferentes construcciones de BBS7 por triplicado, wt, NES, H323R y T211I, de

manera de poder cuantificar las observaciones. A las 48hs las células se fijaron y se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-Myc, y por microscopía de epifluorescencia se evaluó la localización de BBS7 en al menos 70 células por preparado. Los datos obtenidos mostraron que aproximadamente el 50% de las células transfectadas con BBS7 NES presentaban tinción nuclear (la proteína se encontraba distribuida por toda la célula incluyendo citoplasma y núcleo como se mostró en la Fig. 19), mientras que las transfectadas con la proteína wt solamente alcanzaban el 8%. Resultó interesante observar que las mutantes H323R y T211I mostraron un fenotipo intermedio con entre 20 y 25% de células con tinción nuclear (Fig. 24). La diferencia que mostraron las tres proteínas mutantes en comparación con la wt fue estadísticamente significativa ($P < 0.001$ en los tres casos).

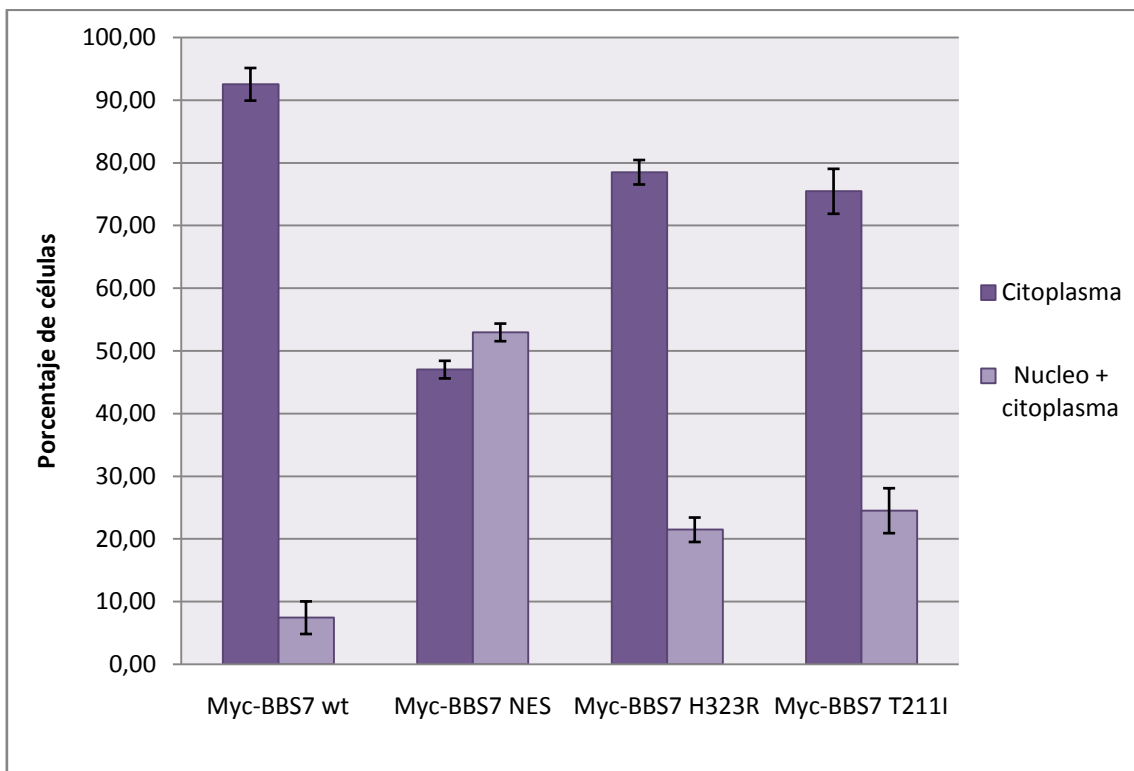


Fig. 24: Gráfico que muestra el porcentaje de células transfectadas con las construcciones Myc-BBS7 WT, NES, H323R Y T211I que mostraron una localización citoplasmática (con exclusión nuclear) contra una localización celular general que incluye núcleo y citoplasma.

Al observar que las mutantes de BBS7 también presentaban cambios en la localización subcelular, se realizó un análisis *in silico* de su secuencia para evaluar si la señal NES estaba siendo afectada por las respectivas mutaciones pero no se observaron alteraciones en la misma. A su vez, se evaluó si las mutaciones H323R y T211I eran capaces de afectar la interacción de BBS7 con la proteína nuclear RNF2. Para esto se transfectaron células Hek293 con los vectores pCMV-Myc BBS7 H323R y T211I junto con el vector pCMV-HA RNF2, realizando un experimento similar al descrito en la sección 3.4, donde el vector vacío, pCMV Myc-EV se utilizó como control (Fig. 25).

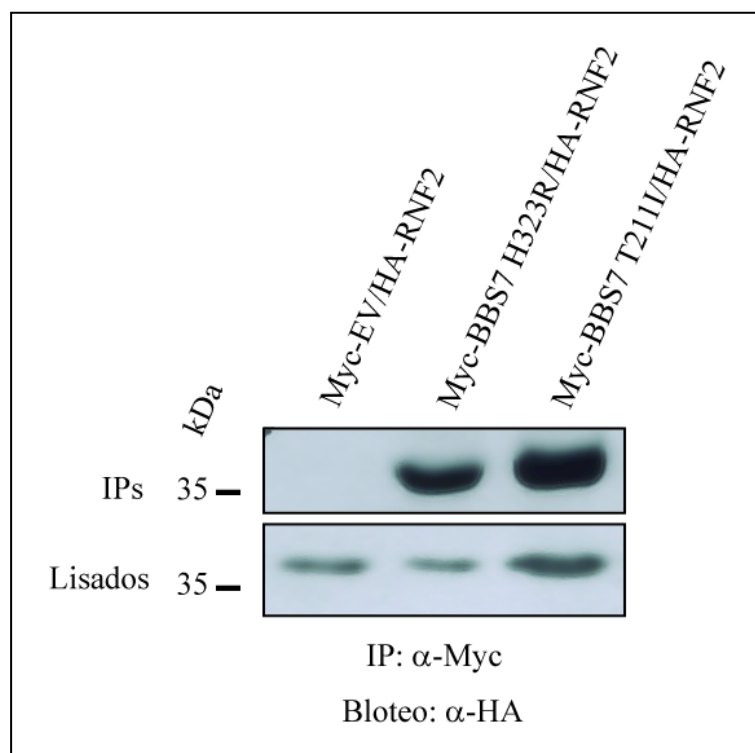


Fig. 25: Co-inmunoprecipitación de las mutantes de BBS7 H323R y T211I mostrando su interacción con RNF2 al ser expresadas con los epítopes Myc y HA, respectivamente.

En la figura 25 se observa como la interacción con RNF2 no se encuentra afectada por la presencia de las mutaciones H323R y T211I, a pesar de que si afectarían su patrón de localización, encontrándose en mayor abundancia en el núcleo (Fig. 24).

4.7 Análisis de localización de otras proteínas BBS salvajes y mutantes

Como ya se mencionó, evaluar el efecto de mutaciones puntuales que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos no es trivial, especialmente en ausencia de un ensayo funcional. En este contexto, determinar si existen cambios a nivel de localización subcelular puede brindar información relevante que ayude a entender las consecuencias fisiológicas de una determinada mutación.

En colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Katsanis en la Universidad de Duke en los Estados Unidos, se participó en un estudio que apuntó a evaluar funcionalmente 125 mutaciones puntuales en distintos genes de BBS con el objetivo de poder determinar su contribución a la patogénesis de la enfermedad y su involucramiento en los patrones de herencia complejos descritos en la introducción de este trabajo. Se trató de un estudio que abarcó tanto estudios en cultivos celulares, a raíz de los resultados obtenidos con BBS7, como *in vivo* utilizando el modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

La serie de ensayos *in vivo* fue realizada por nuestros colaboradores y se centró en evaluar la funcionalidad de las mutaciones analizadas. Para esto, en primer lugar se evaluaron cambios a nivel del desarrollo al anular la expresión de diferentes genes BBS mediante el uso de morfolinos (MOs) en embriones de pez cebra. Previamente se había demostrado que la supresión de algunas proteínas BBS en el pez cebra causa defectos en la gastrulación que incluyen un acortamiento del cuerpo, somites más largos y las notocordas curvadas. Estos fenotipos son consistentes con defectos en la vía de señalización de PCP, que probablemente esté en la base de varios de los fenotipos de los pacientes BBS como los defectos de audición, mal cierre del tubo neural y quistes renales [4, 14, 16, 17, 90, 155, 166, 189-192]. Primero se procedió a inyectar morfolinos que inhiben la traducción de los genes *bbs1-12* en embriones de pez cebra en el estadio de 1-2 células. Analizando los embriones en el estadio de 8 a 10 somites, los resultados obtenidos para los 12 genes analizados fueron comparables a los descritos anteriormente. En la figura 26 se muestra el efecto de la supresión de BBS4 a modo de ejemplo. A continuación se realizaron experimentos de rescate para cada morfolino con ARNm humano, método probado anteriormente que se basa en la

alta conservación que existe entre los ortólogos de *bbs* humanos y del pez cebra [15, 17]. Para estos ensayos se co-inyectaron los embriones con cada morfolino y su ARNm correspondiente, y se observó un rescate del fenotipo en una cantidad significativa de embriones (Fig. 26).

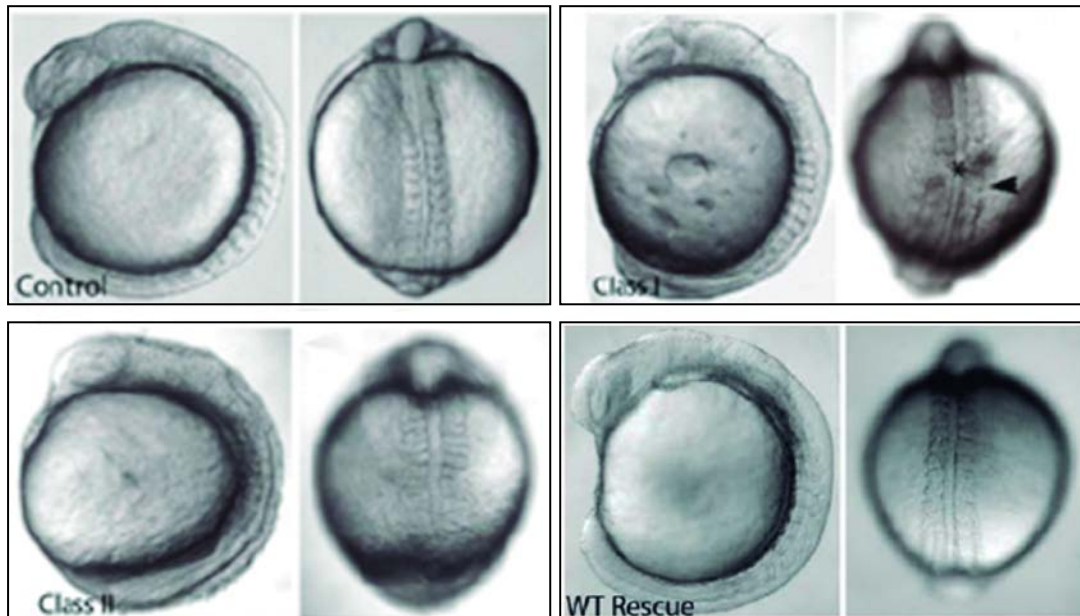


Fig. 26: Embriones de pez cebra sin tratar (panel superior izquierdo, control) y tratados con morfolinós contra *bbs4* donde se observan defectos en la gastrulación en diferentes grados, por lo que los embriones fueron clasificados como clase I (fenotipo modesto, panel superior derecho) o clase II (fenotipo severo, panel inferior izquierdo). En estos se observa un acortamiento del eje del cuerpo, una notocorda ensanchada y curvada (*), y somites ensanchados (flecha). En el panel inferior derecho se muestra el rescate del fenotipo wt co-inyectando con el ARNm humano de BBS4. Trabajo realizado por Norann Zaghloul.

Poder rescatar los fenotipos wt del pez cebra con ARNm humano brindó la posibilidad de testear el efecto de las diferentes mutaciones no sinónimas encontradas en los pacientes BBS (n=109) evaluando si continúan pudiendo rescatar el fenotipo o no, y si no lo pueden rescatar, observar el efecto que generan en los embriones. Primero se diseñaron las construcciones introduciendo las mutaciones a estudiar, se produjeron los ARNm correspondientes y se inyectaron en los embriones junto con el morfolino correspondiente. Como controles se utilizaron embriones sin inyectar, inyectados con

el morfolino solo, con cada ARNm solo, y por último con el morfolino y el ARNm wt. El efecto de la co-inyección del morfolino con cada ARNm mutante se comparó por un lado con el efecto del morfolino solo y por otro con el ensayo de rescate con el morfolino y el ARNm wt.

De los alelos testeados, 14 no mostraron diferencias en la eficiencia de rescate al comparar con el efecto del ARNm wt, sugiriendo que las mutaciones son benignas con respecto a la función. Por otro lado, 15 alelos mostraron un rescate parcial del fenotipo, mostrando que se trata de alelos hipomorfos con respecto a la función. Otro grupo de 45 alelos no mostró ningún efecto de rescate por lo que fueron catalogados como alelos nulos. Por último, 35 alelos produjeron un fenotipo significativamente más severo que el morfolino solo y que el ARNm mutante solo, sugiriendo que se trata de alelos dominantes negativos (Fig. 27).

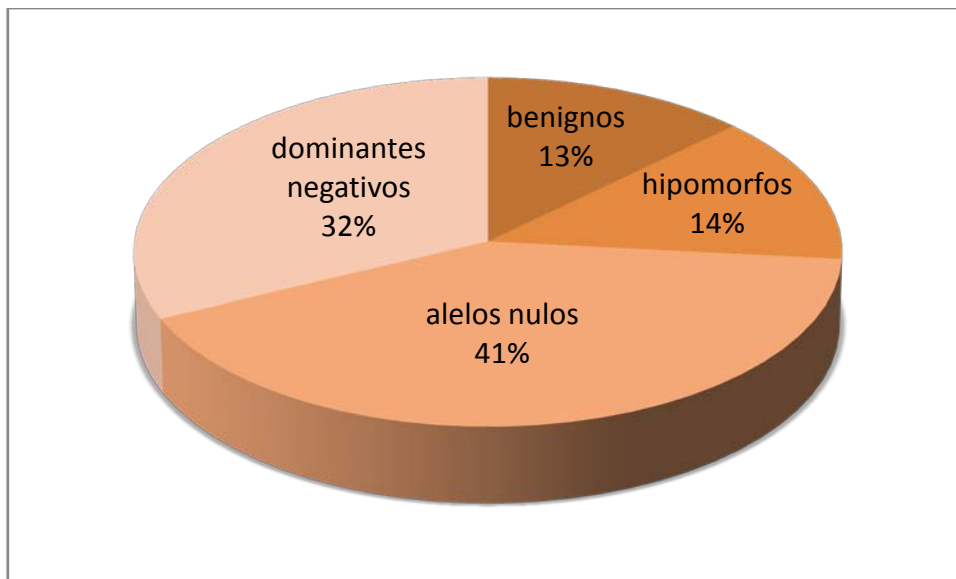


Fig. 27: Gráfico que muestra el efecto de los 109 alelos analizados en los experimentos de rescate realizados en el pez cebra.

En paralelo a los estudios de nuestros colaboradores, se evaluó en cultivos celulares la localización celular de 17 mutaciones BBS al azar, el 14% de las analizadas *in vivo*. A pesar de que la sobre-expresión de proteínas wt generó una localización

mayoritariamente difusa en el citoplasma como se mostró anteriormente para BBS7, igual se pudieron observar diferencias con las proteínas mutantes (Fig. 28).

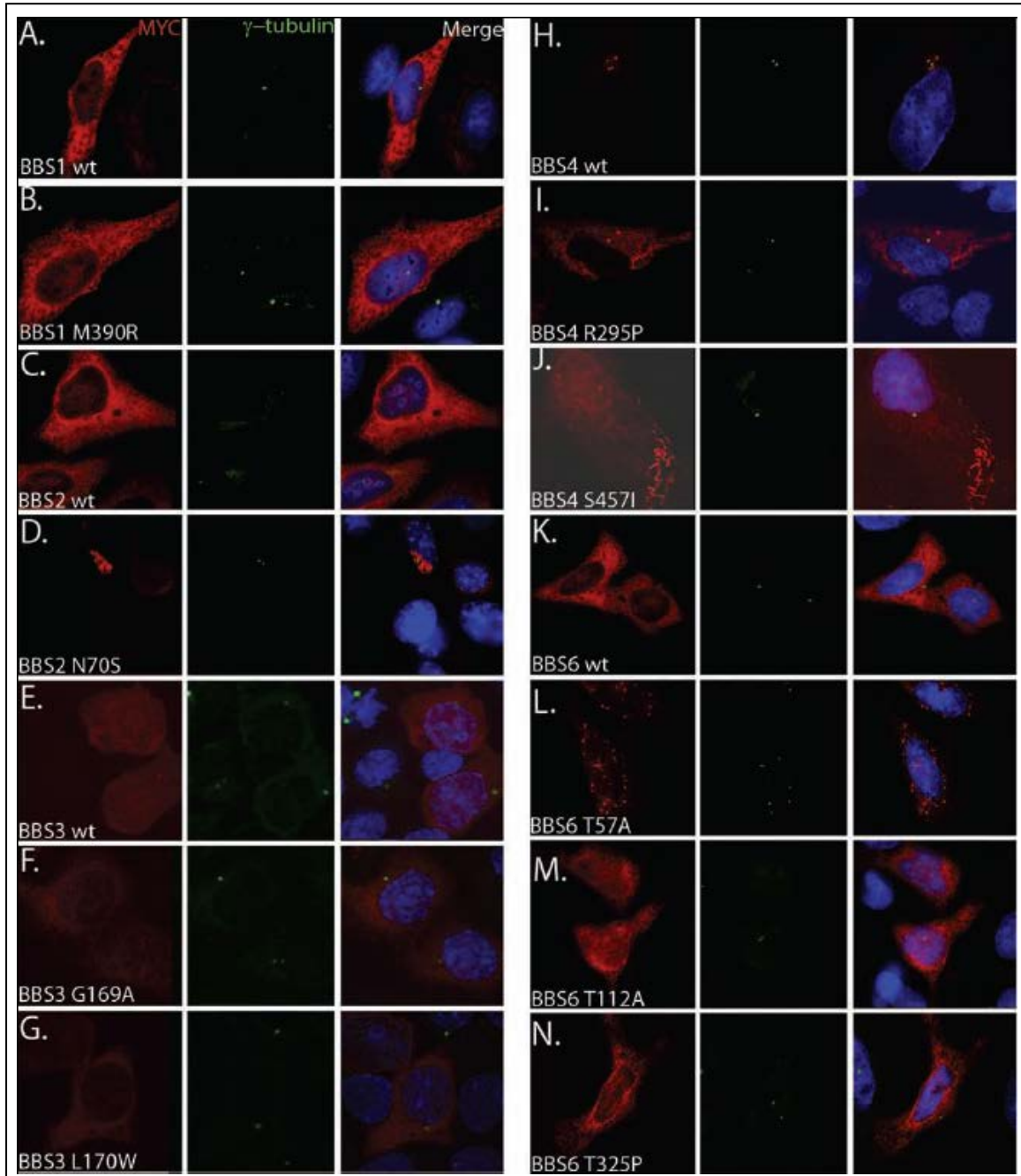


Fig. 28: Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando inmunocitoquímicas en células HeLa transformadas con vectores pCMV-Myc (rojo) expresando diferentes alelos de los genes BBS. Se utilizó un anticuerpo contra γ -tubulina para marcar el centrosoma (verde) y DAPI para marcar los núcleos celulares (azul).

Mientras que algunas de las proteínas mutantes analizadas no presentaron cambios en la localización celular con respecto a la proteína wt, otras generaron un efecto observable como los que se muestran en la figura 27. Se muestran mutaciones que generaron un efecto sutil, al menos al ser observadas por este método, como ser la mutación M390R de BBS1 que mostró un efecto similar al de las mutantes de BBS7 apareciendo en el citoplasma pero también en el núcleo celular. Otras generaron un efecto más drástico como ser las mutantes N70S de BBS2 o S457I de BBS4 que mostraron una localización totalmente diferente a la wt.

Al cruzar los resultados de los estudios *in vivo* e *in vitro* se encontró una correspondencia casi total, el 94% de los alelos que mostraron una localización aberrante en los cultivos celulares de células de mamífero, también mostraron un fenotipo aberrante en el desarrollo del pez cebra, así como las mutaciones catalogadas como benignas en el ensayo en peces, no mostraron cambios observables en el patrón de localización celular.

Un hecho importante a destacar es que al realizar los ensayos de rescate en el pez cebra para las mutantes H323R y T211I de BBS7, ambas resultaron comportarse como dominantes negativos. Por lo tanto, de alguna manera los resultados de localización aberrante mostrados en la sección 4.6, podrían estar explicando el efecto observado en el fenotipo de los peces.

En definitiva, este resultado ejemplifica la importancia de este tipo de estudios donde los datos de localización posiblemente sean importantes para explicar el efecto dominante negativo de estas mutaciones. A la vez, estos resultados apoyan la hipótesis de que localización nuclear de BBS7 tenga relevancia fisiológica, brindando por tanto información que seguramente podrá ser relevante para entender la relación funcional entre BBS7 y RNF2.

Capítulo 5:

Caracterización de la interacción BBSs-RNF2

5.1 Estrategia experimental

A continuación, los estudios fueron enfocados a intentar entender la importancia biológica de la interacción física entre las proteínas BBS y RNF2. Con este fin, se realizaron ensayos con ARN de interferencia para estudiar el efecto de la falta de algunas proteínas BBS sobre RNF2. El efecto se evaluó en base a su expresión y abundancia por RT-PCR y western blot, así como su localización por inmunocitoquímica y su funcionalidad mediante el análisis de expresión de sus genes blanco, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* utilizando como modelo el pez cebra.

Dado que en estos análisis se encontró que BBS7 afecta los niveles de RNF2 y como consecuencia, la expresión de sus genes blanco, surgió la pregunta de si esta capacidad de BBS7 de modular la expresión génica iba más allá de RNF2, posibilidad que fue evaluada mediante ensayos de microarreglos que permitieron el análisis de un gran número de genes en forma simultánea. Se realizaron dos ensayos iguales pero con diferentes líneas celulares, de modo de poder comparar los resultados y así poder eliminar artefactos generados por la utilización de una línea celular particular.

5.2 BBS7 y otras BBSs regulan los niveles proteicos de RNF2

El primer ensayo funcional que se realizó para analizar el vínculo BBS7-RNF2 consistió en alterar los niveles de la proteína BBS7 mediante su inhibición utilizando ARN de interferencia (siRNA) y evaluar los niveles de RNF2 por western blot así como su localización por inmunocitoquímica. Para esto se diseñó un vector pSUPER (ver sección 2.4.3) que codifica para un siRNA específico para *BBS7* y se utilizó el vector vacío como control negativo (pSUPER EV). Primero se evaluó la eficiencia del vector transfectando células HeLa por duplicado, que se lisaron a las 72hs. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE para ser luego analizadas por western blot con un anticuerpo contra BBS7 y un anticuerpo contra GAPDH como control de carga, encontrándose una reducción de aproximadamente el 25% en los niveles de BBS7 (Fig. 29).

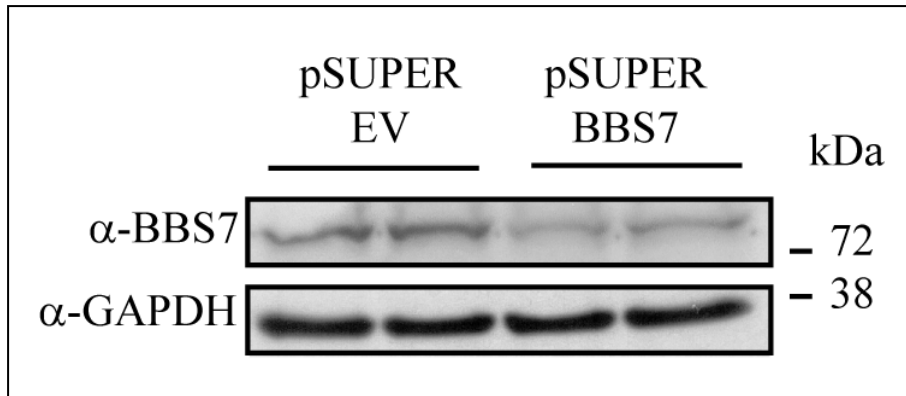


Fig. 29: Western blot mostrando la inhibición de la expresión de BBS7 en lisados celulares al utilizar ARN de interferencia (construcción pSUPER BBS7). Como control de la inhibición se transfectaron células con el vector vacío (pSUPER EV) y como control de carga se utilizó el anticuerpo anti GAPDH sobre la misma membrana que para BBS7. Se muestra el peso molecular de proteínas de referencia (marcador de peso molecular).

Al comprobar que la construcción generada para inhibir la expresión de BBS7 funciona correctamente, se realizó un ensayo para evaluar como esta inhibición afecta la localización de RNF2, no encontrándose diferencias con los controles. A continuación se evaluó si la inhibición de BBS7 altera la expresión de RNF2. Entonces, también se diseñó un vector que inhibe la expresión de RNF2, como herramienta para futuros experimentos y para probar la especificidad del anticuerpo adquirido contra RNF2 en western blot. Entonces se transfectaron células HeLa por triplicado con los vectores pSUPER EV, pSUPER BBS7 y pSUPER RNF2, a las 72hs las células se lisaron y las proteínas se separaron por SDS-PAGE para después ser analizadas por western blot con un anticuerpo monoclonal contra RNF2 y con uno contra GAPDH como control (Fig. 30).

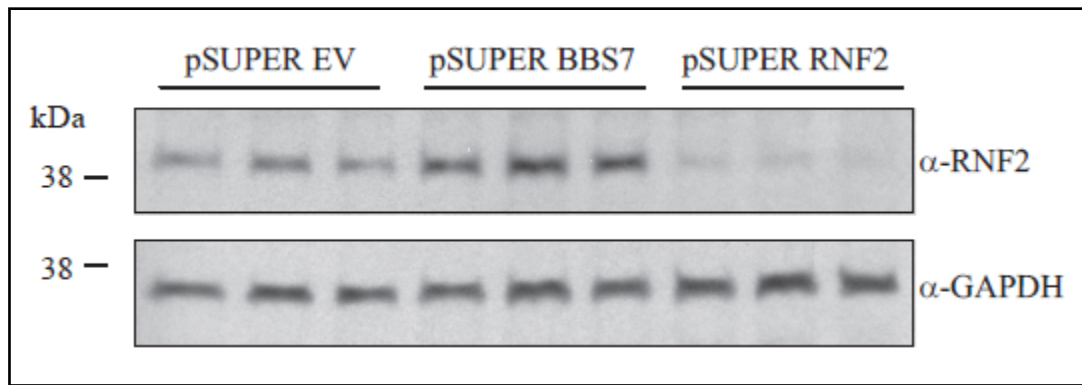


Fig. 30: Western blot realizado con anticuerpos contra RNF2 y contra GAPDH como control de carga donde se observa el efecto de la inhibición de BBS7 (pSUPER BBS7) sobre los niveles de RNF2. La utilización de la construcción pSUPER RNF2 confirma la identidad de la señal obtenida por western blot.

Como se puede observar en la figura 30, la inhibición de BBS7 resultó en un aumento en los niveles de RNF2 (ver cuantificación en la figura 32). Por lo tanto, BBS7 estaría regulando negativamente a RNF2, ya sea inhibiendo su expresión, alterando su traducción, o su estabilidad, o estimulando su degradación. A continuación se realizó el ensayo inverso donde se sobre-expresó BBS7 con la construcción Myc-BBS7 utilizada anteriormente pero no se observaron cambios en los niveles de RNF2.

Como se mostró en el capítulo 3, otras BBSs además de BBS7 son capaces de interactuar con RNF2. Por este motivo, este ensayo se amplió para evaluar los niveles de RNF2 en células donde la expresión de BBS1, BBS2 y BBS4 fue inhibida por ARN de interferencia. En primera instancia se construyeron plásmidos pSUPER con secuencias blanco para la inhibición de estos genes y se testeó su eficiencia por retrotranscripción y PCR en tiempo real. Para esto se transfectaron células por triplicado con cada construcción incluyendo a pSUPER EV como control. A las 72hs las células se lisaron y se extrajo su ARN a partir del cual se generó ADNc que se amplificó por PCR en tiempo real, también por triplicado, con oligonucleótidos específicos para cada gen. En todas las muestras también se amplificó el gen *GAPDH* para normalizar los resultados de las diferentes amplificaciones (Fig. 31).

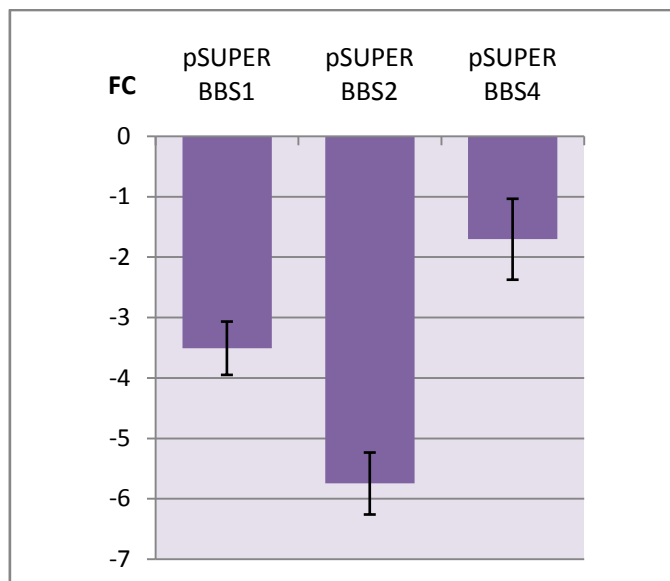


Fig. 31: Gráfico mostrando la inhibición de la expresión de los genes *BBS1*, *BBS2* y *BBS4* mediante amplificación por PCR en tiempo real. Los resultados se muestran como nivel de expresión relativa (Fold change, FC): normalizados con respecto a los controles, ADNc de células transfectadas con pSUPER EV y amplificación del gen GAPDH en cada muestra. Las barras de error muestran el desvío estándar generado entre las réplicas de cada PCR (ver sección 2.12.2).

Como muestra la figura 31, los tres vectores diseñados producen una inhibición de más del 50% en la expresión de sus genes blanco. Por lo tanto se utilizaron para evaluar el efecto que estos cambios producen en los niveles de RNF2. Para esto se transfectaron células HeLa por triplicado con cada construcción, utilizando el vector vacío como control (pSUPER EV). Las células se lisaron a las 72hs y las proteínas se separaron por SDS-PAGE y a continuación se analizaron por western blot con un anticuerpo monoclonal contra RNF2 y con uno contra GAPDH como control de carga. La intensidad de las bandas obtenidas para RNF2 fue analizada con el software ImageJ y se graficaron junto con los datos obtenidos previamente para BBS7 (ver fig. 30), determinando un valor de expresión del 100% el obtenido en las células control transfectadas con pSUPER EV (Fig. 32).

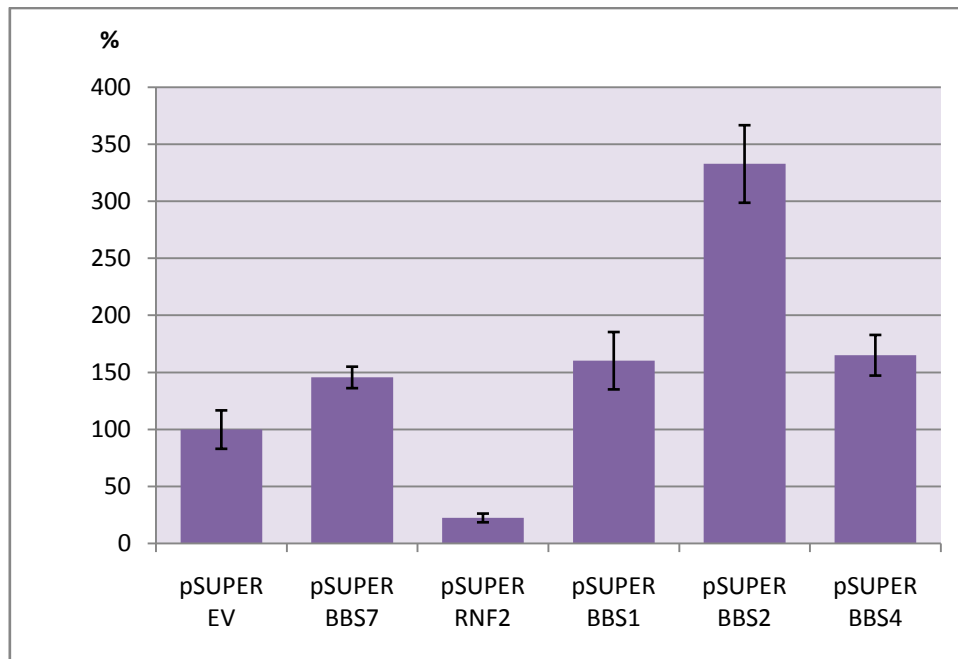


Fig. 32: Gráfico mostrando la intensidad relativa de las bandas de western blot correspondientes a RNF2 en muestras donde diferentes genes BBS fueron inhibidos con vectores pSUPER que expresan ARN de interferencia. Las barras de error muestran el desvío estándar generado entre las réplicas de cada ensayo.

En la figura 32 se puede observar que no sólo BBS7 estaría regulando la expresión de RNF2, sino que BBS1, BBS2 y BBS4 estarían ejerciendo el mismo efecto, generando un aumento significativo ($P < 0.05$ para cada caso) en la abundancia de RNF2 al inhibirlas. Este experimento muestra un efecto comparable de BBS1, BBS4 y BBS7, con un aumento de RNF2 de aproximadamente 50%. Sin embargo, la inhibición de BBS2 generó un efecto mayor, de más del 300% de aumento de RNF2 con respecto al control. Si bien este efecto puede deberse a una mayor eficiencia del vector pSUPER BBS2, como se observa en la figura 30, también podría estar causado por diferencias funcionales entre las diferentes proteínas BBS. En este sentido es interesante notar que hasta el momento, BBS2 es la única proteína BBS que se pudo observar en el núcleo celular por inmunocitoquímica sin ningún tipo de tratamiento de enriquecimiento (Fig. 33).

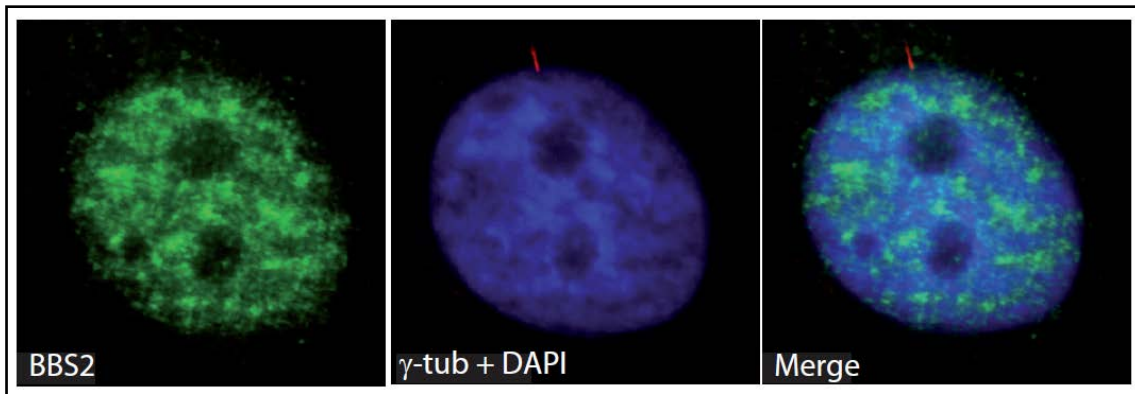


Fig. 33: Inmunocitoquímica realizada en células de mamífero con un anticuerpo policlonal contra BBS2 (verde). El núcleo celular se muestra teñido con DAPI (azul) y la cilia se muestra en rojo marcada con anticuerpo monoclonal contra tubulina acetilada.

Para evaluar si el efecto de las BBSs sobre los niveles proteicos de RNF2 se debe a una inhibición a nivel de ARN, se realizaron ensayos de RT-PCR y PCR en tiempo real en muestras donde BBS7 había sido inhibido. Resultó llamativo encontrar que los niveles de ARNm de *RNF2* descienden levemente en ausencia de BBS7 (Fig. 34), sugiriendo que el efecto de BBS7, y quizás las demás BBSs, es sobre la proteína y que RNF2 podría estar regulando su propia transcripción mediante un mecanismo de retroalimentación negativa.

5.3 BBS7 es capaz de alterar la expresión de genes blanco de RNF2

Por lo que se mostró anteriormente, inhibir la expresión de BBS7 resultaría en un aumento de los niveles proteicos de RNF2. Como ya se mencionó en el capítulo 3, RNF2 es miembro del grupo de proteínas PcG (“Polycomb Group”), que tienen un rol importante durante el desarrollo embrionario dado que regulan directamente la expresión, fundamentalmente a través de la represión, de un gran número de genes vinculados al desarrollo y la diferenciación. Por lo tanto, se decidió testear si el aumento de RNF2 en células donde BBS7 fue inhibida efectivamente repercute a nivel de la función proteica. Gracias a la existencia de un gran panel de genes blanco de RNF2 detectado en células pluripotentes murinas [193], se seleccionaron 11 genes de

forma aleatoria para evaluar su perfil de expresión al inhibir la expresión de BBS7. Para esto se transfectaron células HeLa con las construcciones pSUPER BBS7 y pSUPER EV como control y a las 72hs las células se lisaron para extraer el ARN. A continuación se midió la expresión a nivel de ARNm de los genes seleccionados tanto por PCR semicuantitativo como por PCR en tiempo real (Fig. 34).

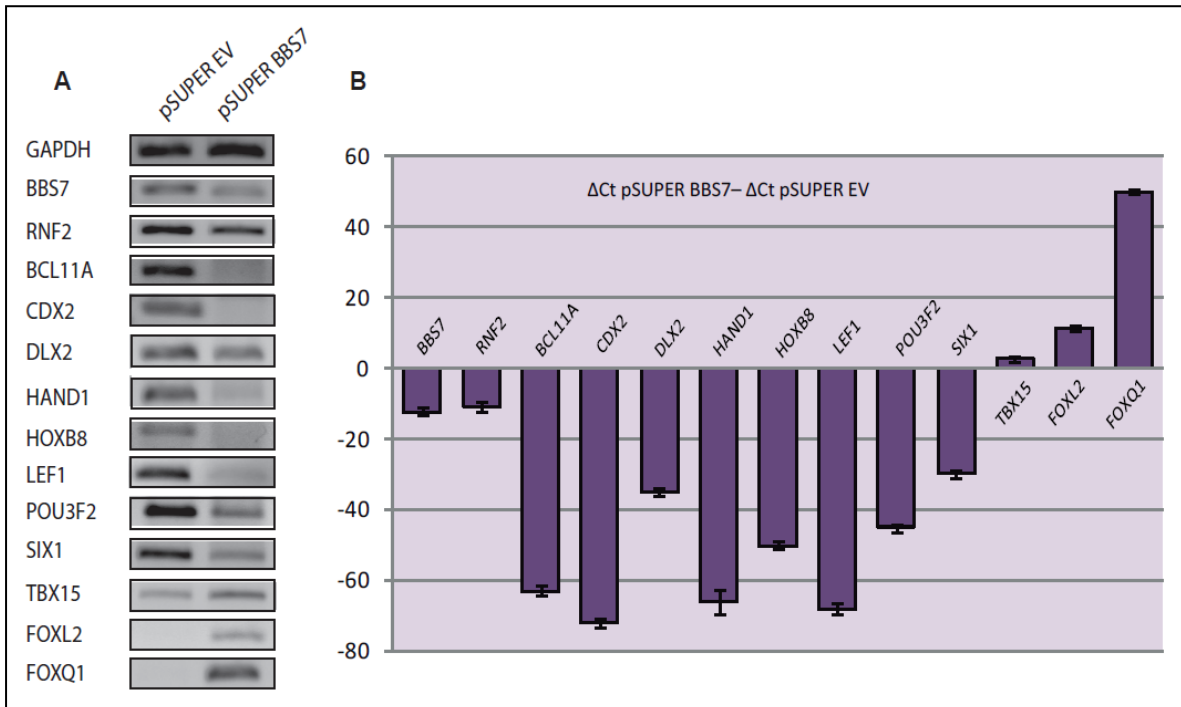


Fig. 34: Expresión diferencial de 11 genes blanco de RNF2 entre células donde la expresión de BBS7 fue reducida (pSUPER BBS7) y células control (pSUPER EV). En el panel A se observan los resultados de una corrida electroforética en geles de agarosa de los productos de PCR semicuantitativa de los 11 genes seleccionados y de los genes *GAPDH*, *BBS7* y *RNF2*. En el panel B se muestran los resultados de PCR en tiempo real de los mismos genes que en A, mostrándose la diferencia en el número de ciclos en que comienza la amplificación exponencial entre las muestras (ΔC_t pSUPER BBS7 - ΔC_t pSUPER EV).

En la figura 34 se puede observar que los datos obtenidos con ambas aproximaciones son comparables mostrando que la reducción en la expresión de BBS7 genera cambios significativos en la expresión de los genes analizados. De forma consistente con el rol de represor transcripcional que ha sido reportado para RNF2, los niveles de ARNm de

los genes *BCL11A*, *CDX2*, *DLX2*, *HAND1*, *HOXB8*, *LEF1*, *POU3F2* y *SIX1* disminuyeron en las células donde la expresión de BBS7 fue reducida, posiblemente debido al aumento de los niveles de RNF2 observado en estas condiciones y por ende una mayor represión por parte de esta proteína PcG. Sin embargo, los niveles de ARNm de los genes *TBX15*, *FOXL2* y *FOXQ1* se encontraron sobre-expresados en estas mismas condiciones. Es importante resaltar que la proteína RNF2 también se ha visto asociada a regiones genómicas transcripcionalmente activas, a pesar de que el mecanismo subyacente no está dilucidado aún [194], lo que podría explicar el resultado obtenido para estos tres genes.

5.4 La desregulación de los genes blanco de RNF2 también ocurre *in vivo*

Para poder evaluar si el efecto de BBS7 sobre los genes blanco de RNF2 observado *in vitro* también se observa *in vivo*, se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*), nuevamente en colaboración con nuestros colegas del grupo dirigido por el Dr. Katsanis en la Universidad de Duke. Para esto se utilizó un morfolino que bloquea la traducción del gen *bbs7* y, para ampliar el análisis, también se utilizó un morfolino contra el gen *bbs4*. Al inyectar a los embriones del pez cebra con estos morfolinicos, en ambos casos se observaron los defectos en la gastrulación característicos de los morfantes para los genes BBS como se describió en el capítulo anterior, que incluyen acortamiento de los ejes del cuerpo y notocordas curvadas. En primer lugar se realizaron hibridaciones *in situ* sobre el animal completo 30hs después de la fertilización para evaluar la expresión de los genes blanco de RNF2 *bcl11a* y *pou3f2* en embriones control y morfantes. Con el fin de evaluar la especificidad de los morfolinicos y poder determinar que los posibles cambios en la expresión de estos genes sean específicos de la inhibición de las proteínas bbs, se realizaron experimentos de rescate del fenotipo co-inyectando ARNm humano de *BBS4* y *BBS7* junto con los morfolinicos correspondientes. Para estos ensayos, se utilizó como control un morfolino estándar (MO control). En los embriones control el gen *bcl11a* se expresa predominantemente en el telencéfalo, el bulbo olfatorio y parcialmente en el mesencéfalo y romboencéfalo, mientras que el gen *pou3f2* se expresa en todas las estructuras cerebrales y espinales (Fig. 35). Mientras

que la inyección del morfolino control no generó ningún fenotipo ni generó cambios en la expresión de los genes *bcl11a* ni de *pou3f2*, el patrón de expresión de estos genes se vio afectado en los morfantes de *bbs7* y *bbs4*, observándose una reducción significativa de sus niveles de ARNm. La co-inyección de los ARNm de *BBS4* y *BBS7* con sus morfolinos correspondientes rescató totalmente la expresión de ambos genes demostrando la especificidad de estos fenotipos (Fig. 35).

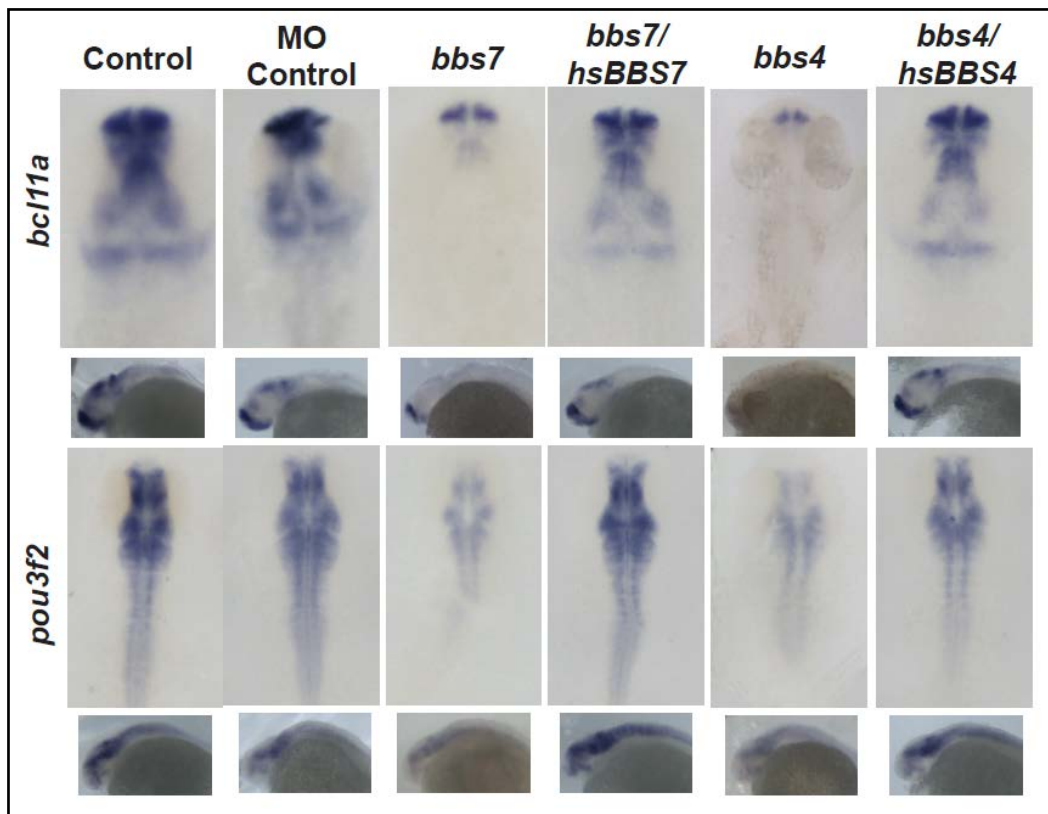


Fig. 35: Embriones sin inyectar (control), inyectados con un morfolino estándar (MO control), un morfolino contra *bbs7* y otro contra *bbs4*. Para estos últimos dos, se muestran experimentos de rescate co-inyectándolos con el ARN humano correspondiente, *hsBBS7* y *hsBBS4*. En todos los casos se muestra el patrón de localización de los genes *bcl11a* y *pou3f2* teñidos mediante hibridación *in situ* con sondas específicas. Ensayo realizado por Perciliz Tan.

Dado el éxito de esta primera aproximación que no sólo permitió mostrar el efecto específico de los MOs diseñados, sino que también permitió observar que estos estarían generando un efecto sobre la localización de los genes blanco de RNF2 estudiados, se procedió a hacer un análisis más completo que incluyó, además de *bcl11a* y *pou3f2*, los blancos de RNF2 *six1b*, *hoxb8a* y *lef1*. Se analizaron entre 25 y 30 embriones por sonda en dos inyecciones de morfolino independientes.

Como se observa en la figura 36, el gen *lef1* se expresa en el hipotálamo, el diencéfalo, el tectum, los límites entre encéfalo y romboencéfalo, aletas pectorales y arcos branqueales. Al igual que para *bcl11a* y *pou3f2*, los embriones inyectados con los morfolinicos contra *bbs7* y *bbs4* mostraron una tinción significativamente menor para *lef1* cuando se los comparó con los embriones control, de manera concordante con las observaciones en células donde un aumento de RNF2 resulta en una inhibición de la expresión de estos genes blanco.

Por otro lado, si bien los niveles de expresión de *six1b* y *hoxb8* fueron comparables entre morfantes y controles, el patrón de expresión *six1b* se vio significativamente alterado en los morfantes de *bbs*. Mientras que los controles mostraron expresión en los arcos branquiales y vesículas óticas, los morfantes de *bbs7* mostraron tinción adicional en el diencéfalo y los morfantes de *bbs4* lo hicieron en las aletas pectorales y romboencéfalo. La expresión de *hoxb8a* no se vio alterada en ninguno de los casos (Fig. 36).

Por último, se decidió testear si los cambios observados en los patrones de expresión de estos genes se deben efectivamente a un aumento de los niveles de Rnf2 consecuencia de la reducción en los niveles de proteínas Bbs. Para esto se diseñó también un morfolino para inhibir la expresión de Rnf2 en los embriones de pez cebra, que se testeó independientemente y se utilizó en experimentos de rescate co-inyectándolo con cada uno de los morfolinicos contra los dos MO *bbs*. Como se puede observar en la figura 36, la expresión de *lef1* en los dobles morfantes fue parcialmente rescatada en todas las regiones del embrión mientras que la expresión de los genes *bcl11a* y *pou3f2* no solamente fue rescatada sino que fue expandida con respecto a los

controles, probablemente como consecuencia de una reducción de Rnf2 a niveles incluso menores que los presentes en los controles (Fig. 36).

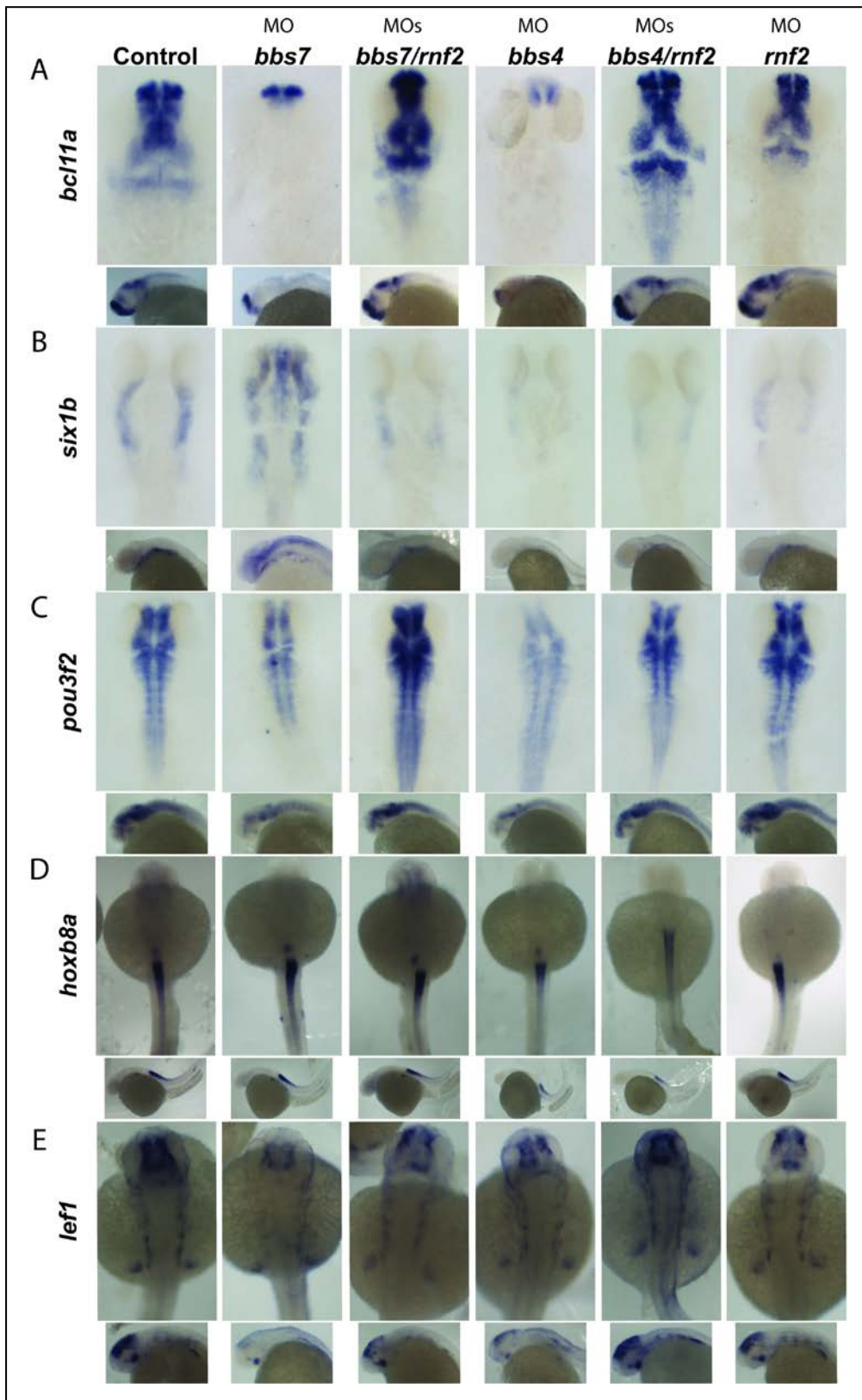


Fig. 36: Embriones inyectados con morfolinolinos contra *bbs7*, *bbs4* y *rnf2*, así como co-inyecciones *bbs4-rnf2* y *bbs7-rnf2*, procesados para hibridación in situ con sondas para *bcl11a* (A), *six1b* (B), *pou3f2* (C), *hoxb8a* (D) y *lef1* (E). Ensayo realizado por Perciliz Tan.

De esta manera, los datos aquí presentados indican que los genes blanco de Rnf2 son desregulados *in vivo* en ausencia de las proteínas Bbs4 y Bbs7, corroborando y asignando relevancia fisiológica a los datos obtenidos *in vitro*.

5.5 BBS7 regula la expresión génica más allá de RNF2

Las proteínas PcG fueron descritas inicialmente en *Drosophila* como represores transcripcionales de genes homeóticos durante el desarrollo [195]. Más tarde, mediante análisis funcionales se determinaron los sitios de unión de estas proteínas, llamados PREs (Elementos de Respuesta a Polycombs), secuencias que reclutan a las proteínas PcG silenciando genes vecinos [196]. En este organismo se encontraron dos tipos de complejos que se unen a las PREs, los complejos PRC1 formados por las proteínas PC, PSC, PH y dRING [197], y los complejos PRC2 que incluyen a E(Z), proteína que metila la histona H3 en el aminoácido Lys27 (H3K27), SU(Z)12, ESC y P55, una proteína de unión a histonas [198]. Cada uno de estos componentes asegura la habilidad del complejo de unirse y metilar los nucleosomas [199]. Los homólogos hallados en células de mamífero se encuentran bastante conservados, habiéndose detectado para el complejo PRC1 a: PHC1, 2 y 3, RING1A, RNF2 y BMI1 y para el complejo PRC2 a: SUZ12 y EED entre otras [200].

Para evaluar si el efecto de BBS7 sobre la expresión génica se da solamente a través de su interacción con RNF2 o si se extiende más allá de esta proteína PcG en particular, en colaboración con las Unidades de Biología Molecular y Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo, se realizaron dos ensayos de microarreglos utilizando para cada uno, un chip que incluye 44.000 sondas por cuatuplicado, abarcando 27.958 genes y transcritos humanos diferentes. Este diseño permitió realizar cada experimento con 3 replicas biológicas y una cuarta con los colores invertidos (verde y rojo), conformando un alto número de controles en cada ensayo. Uno de los experimentos se realizó en células HeLa y el otro en células hTERT-RPE, de modo de poder analizar los resultados que se repiten en ambas líneas quitando el sesgo que pueda generar cada línea celular en particular. En ambos experimentos se compararon

dos condiciones: ARN control contra ARN de células donde la expresión de BBS7 había sido inhibida mediante ARN de interferencia.

En el primer ensayo, realizado en células HeLa, luego de varios pasos de control exigentes donde se eliminaron los datos que eran inconsistentes entre las réplicas y entre las sondas del mismo gen, se obtuvieron 18.872 sondas analizables, correspondientes a 13.420 genes y transcritos diferentes. Se trabajó con dos datos obtenidos en el ensayo: la cantidad de veces que estaba alterada la expresión de cada gen, FC (“fold change”), entre la muestra y el control, y con la significancia estadística de este cambio, el valor P. El primer paso de análisis consistió en comparar los resultados con los datos obtenidos anteriormente de manera de tener varios controles diferentes para este experimento. Por un lado se verificó la inhibición de BBS7 con una bajada de tres veces en su expresión con respecto al control. También se verificó la bajada en la expresión de RNF2 (que resultó ser de dos veces) de manera similar a como se había encontrado en el ensayo de PCR semicuantitativo y en tiempo real mostrado en la Fig. 34. A su vez se verificaron los demás genes (blancos de RNF2) analizados en ese ensayo y el resultado fue consistente entre ambos experimentos para todos los casos en que se trató de sondas analizables.

Además de los genes blanco de RNF2 analizados previamente, un número importante de genes mostró una expresión alterada. En primer lugar, los genes analizables se ordenaron en función de sus valores P, desde el valor menor (el gen que mostró el cambio más importante) a los mayores (correspondiente a genes sin variaciones de expresión entre las muestras). Para poder observar los datos obtenidos de forma global, se graficaron como puntos en función de su valor P y su FC (“Vulcano Plot” Fig. 37).

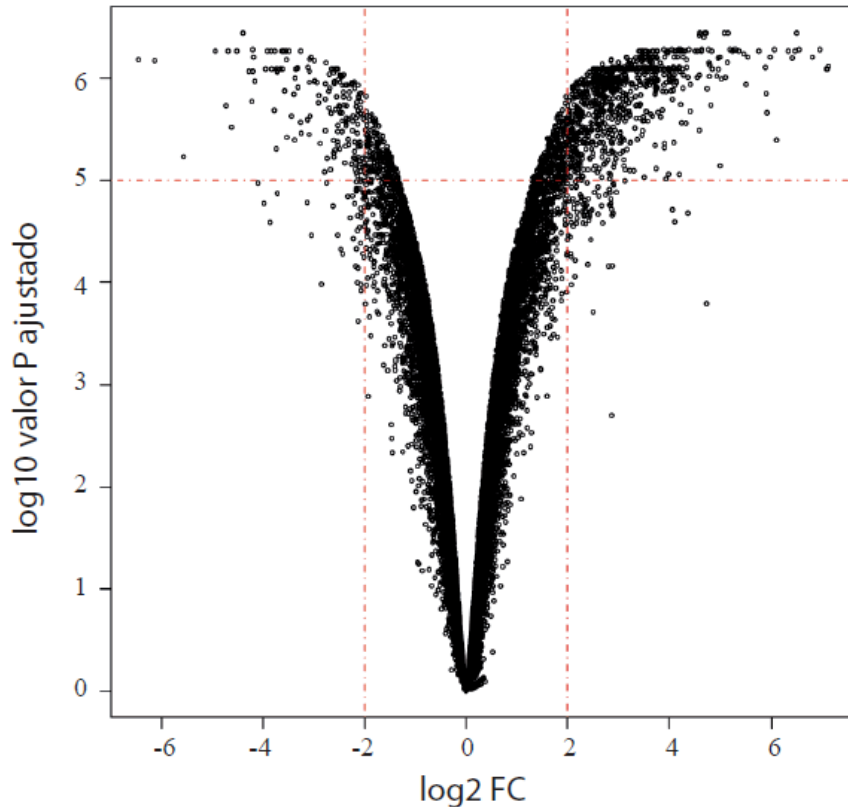


Fig. 37: Gráfico mostrando donde se ubican las diferentes sondas analizables del ensayo de microarreglos en función de su variación entre las muestras pSUPER EV y pSUPER BBS7 cuantificado como veces en que varía su expresión, FC, y la significancia de este cambio, valor P. Se utilizaron escalas logarítmicas para mejorar su visualización.

En este gráfico se puede observar una mayor cantidad de genes sobre-expresados (83%) que sub-expresados (17%), sugiriendo un rol para BBS7 fundamentalmente represor de la expresión génica.

A continuación se estableció un corte arbitrario y exigente en la lista de datos separando los valores con un valor $P < 1 \times 10^{-5}$ y un log2 del FC de ± 2 para definir un grupo de transcritos expresados diferencialmente (DE) que resultó en una lista de 1005 genes*. Al tratarse de una lista tan extensa, se realizó un primer análisis enfocado a los genes blanco de RNF2 pero a su vez ampliando el estudio para incluir a

*La lista total se encuentra en <http://ics.biologists.org/content/125/2/362/suppl/DC1>

otras proteínas PcG: SUZ12, EED y PHC1, así como la marca epigenética H3K27, que corresponde a una trimetilación de la histona H3 dependiente de la acción de las proteínas PcG, dado que se han reportado sus listas de genes blanco [193]. Entonces en primer lugar se analizó cuántos de los genes DE obtenidos en el ensayo de microarreglos se encontraban en estas listas y cuántos no. El análisis mostró que de los 7.275 genes analizables que no estaban presentes en ninguna de estas listas PcG (grupo NO), 503 (6.9%) estaban diferencialmente expresados en el ensayo. Sin embargo, el 17% de los genes blanco de RNF2, el 22% de los blancos de SUZ12, el 25% de los de EED, el 20% de los blancos de PHC1 y el 21% de los genes con la marca H3K27 resultaron DE en el ensayo (Tabla 4). Además del grupo NO, se realizó un control adicional comparando los genes DE de este ensayo con los que aparecen en la lista de genes blanco de la proteína ciclina D1, recientemente reportada como un regulador transcripcional de genes del desarrollo [201] (Ctrl-Neg Tabla 4). En este caso, sólo un 7% de estos genes se encontraron DE en el ensayo.

	RNF2	SUZ12	EED	PHC1	H3K27	NO	Ctrl-Neg
DE	97	105	82	103	241	503	51
NO DE	464	370	242	419	896	6772	679
TOTAL	561	475	324	522	1137	7275	730
% DE	17%	22%	25%	20%	21%	6.9%	7%

Tabla 4: Análisis del total de genes blanco de las proteínas PcG RNF2, SUZ12, EED, PHC1 y la marca epigenética H3K27, como de la proteína control (Ctrl-Neg), que se encontraron o no diferencialmente expresados (DE) en el ensayo de microarreglos donde se inhibió la expresión de BBS7. NO corresponde a los genes analizables que no se encontraban en ninguna de las listas PcG.

La comparación entre los genes DE que se encuentran en las listas PcG con los que no se encuentran en las mismas, grupo NO, presentó diferencias estadísticamente significativas, con un test de Chi-cuadrado de Pearsons de $\chi^2=457$, Df=6 (por “Degrees of freedom”, grados de libertad), $P<2.2\times 10^{-6}$. A su vez, la comparación con el control negativo, ciclina D1, no reveló diferencias con el grupo NO. Por lo tanto estos resultados confirmaron la interacción funcional entre BBS7 y RNF2 pero a su vez dejó en evidencia un vínculo entre BBS7 y otras proteínas PcG.

Un análisis global del ensayo de microarreglos sin embargo mostró una aparente contradicción. Por un lado, el análisis general mostró una mayoría de genes (83%) sobre-expresados al inhibir BBS7 (ver Fig. 37), sugiriendo un efecto principalmente represor. Sin embargo, se mostró que la ausencia de BBS7 determina un aumento en los niveles de RNF2 lo que a su vez lleva a la reducción en los niveles de expresión de sus genes blanco. En este contexto por tanto BBS7 actuaría, quizás indirectamente, como un activador de la expresión por lo menos de este grupo de genes. Para estudiar este fenómeno en mayor detalle se resolvió analizar si la proporción de genes sobre- y sub-expresados entre los genes blanco de las PcG muestra el mismo patrón que la lista total de genes DE. Este análisis mostró una proporción diferente a la general, encontrándose que dentro de los genes blanco de las PcG diferencialmente expresados en el ensayo de microarreglos (ver tabla 4), solo el 60% de genes estaban sobre-expresados mientras que un 40% se encontraban sub-expresados. Al comparar las dos proporciones estadísticamente, la diferencia entre ellas mostró un $P<0.001$ dando por tanto consistencia a los resultados obtenidos por las diferentes aproximaciones.

A continuación se realizó un ensayo similar al mostrado en la tabla 4 pero evitando la separación arbitraria de genes, o sea un análisis sin sesgo del total de datos obtenidos en el ensayo de microarreglos. La hipótesis a testear fue que si un grupo de genes se expresa de manera diferencial en ausencia de BBS7, estos deberían mostrar colectivamente un valor P menor que los genes que no estén vinculados a BBS7. Entonces se analizaron los genes blanco de las proteínas PcG RNF2, SUZ12, EED y PHC1, así como la lista de genes con la marca epigenética H3K27 comparando sus valores de P en el ensayo de microarreglos con los valores P de los genes que no están

en estas listas, grupo NO, y los genes blanco del control negativo. Consistentemente con el análisis anterior, este análisis reveló que los genes asociados a las proteínas PcG presentaron valores de P significativamente menores que los dos controles: Test de Chi cuadrado Kruskal-Wallis $\chi^2=461$, Df=6, $P<2.2\times 10^{-6}$ (Fig. 38).

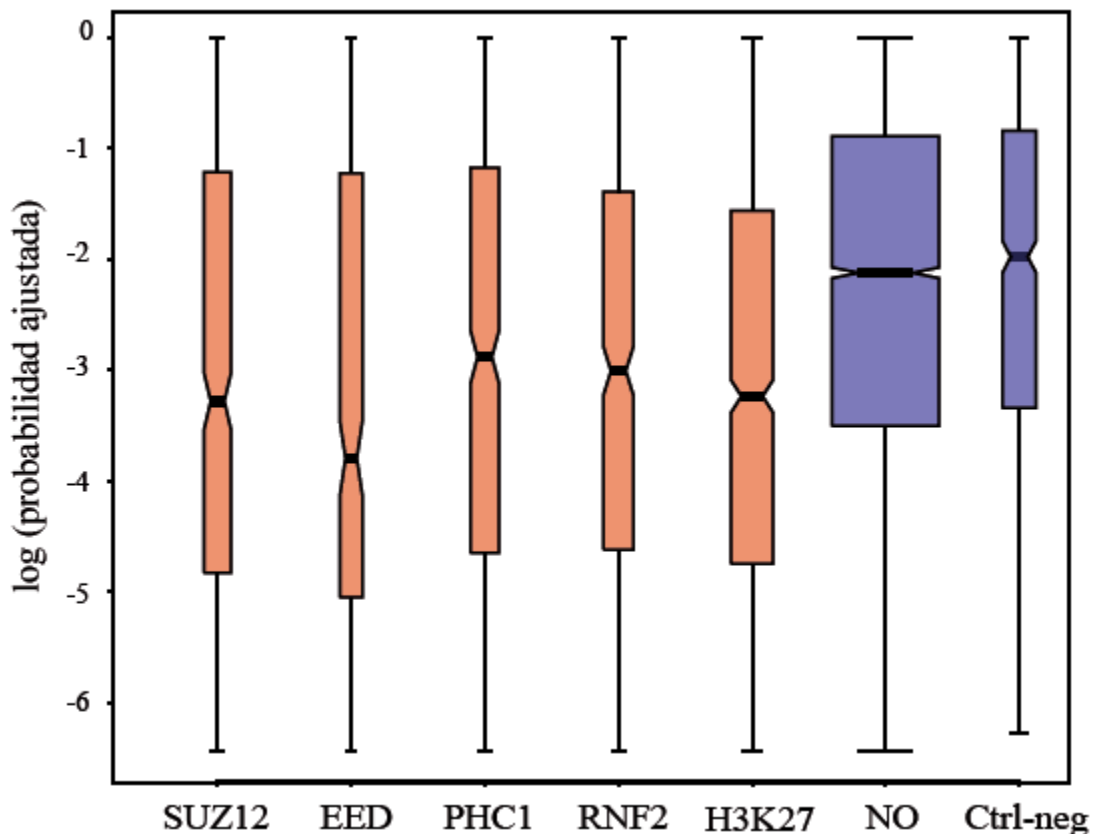


Fig. 38: Boxplot mostrando a los genes blanco de las diferentes proteínas PcG así como a los marcados epigenéticamente por ellas (H3K27), en función de su valor de P en el ensayo de microarreglos al inhibir BBS7. Se observa que estos genes tienen valores de P menores que los genes de los controles negativos: genes que no son blancos de estas proteínas (NO) y los blancos de la proteína ciclina D1 (Ctrl-neg).

Tanto este análisis sin sesgo como el anterior con el corte arbitrario de los datos, mostraron que BBS7 probablemente participa en la regulación de los genes blanco de RNF2 así como de otras proteínas PcG como SUZ12, EED y PHC1.

A continuación se realizó otro análisis en base a los valores P (sin sesgo) comparando los datos del experimento con los genes incluidos en el proteoma ciliar, una base de datos creada en el año 2006 que se mantiene actualizada con el ingreso de todas las proteínas que van siendo descritas vinculadas a la función y/o estructura ciliar [202] (www.ciliaproteome.org). Este análisis se realizó con el objetivo de evaluar si la regulación de la expresión génica que estaría realizando BBS7 también abarca genes vinculados a la función y/o estructura ciliar (Fig. 39).

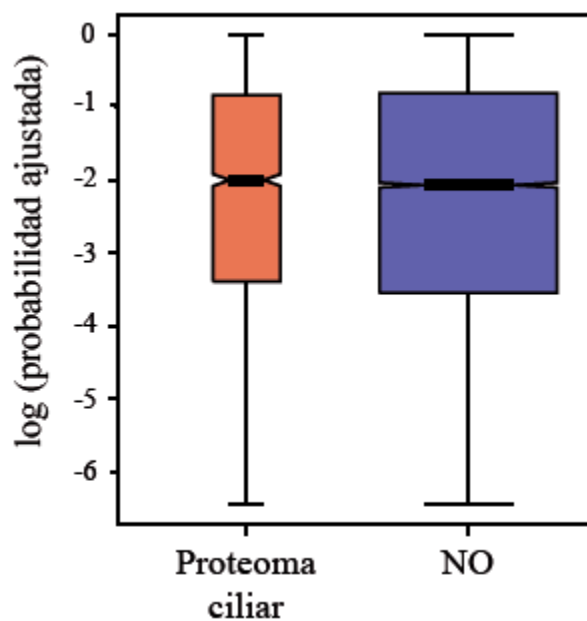


Fig.39: Boxplot mostrando la distribución de los genes presentes en el proteoma ciliar y los que no están presentes (NO) según el valor P que presentaron en el ensayo de microarreglos al inhibir BBS7.

En este ensayo se pudo observar que no se encontraron diferencias significativas entre las listas de genes analizadas, mostrando que la inhibición de BBS7 no parece afectar en forma global la expresión de genes asociados funcional y estructuralmente con la biología de las cilias.

Finalmente se realizó un análisis de ontología utilizando la lista de genes diferencialmente expresados (DE) definidos anteriormente con un corte en función del valor P y del número de veces que mostraron cambios en su expresión (FC), con el objetivo de encontrar procesos biológicos o vías comunes que estuviesen alteradas en ausencia de BBS7. Este análisis mostró una expresión alterada de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis celular, la organización e interacción celular y la locomoción celular entre otros, en general, genes con un rol importante en el desarrollo, tratándose de funciones que se encuentran asociadas a los genes blanco de las proteínas PcG (Fig. 40).

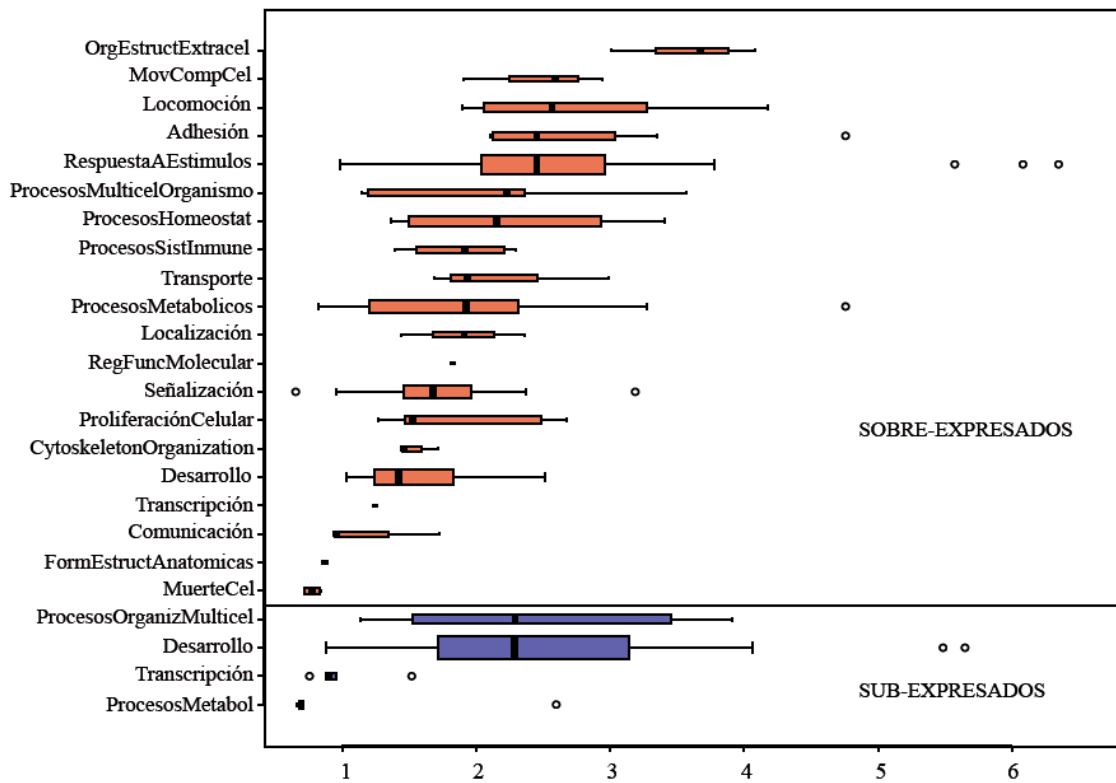


Fig. 40: Boxplot mostrando los genes sobre- y sub-expresados en ausencia de BBS7 organizados en función de su ontología. Se representan sólo las clases que mostraron una sobre-representación estadísticamente significativa en el ensayo de microarreglos.

A continuación se repitió fielmente el ensayo de microarreglos con un único cambio, se realizó en células hTERT-RPE (originadas de células epiteliales pigmentadas de retina), células de diferente origen que las HeLa (originadas de células tumorales). El objetivo de este segundo ensayo se basa en que al tratarse de líneas celulares transformadas sería importante realizar el ensayo en al menos dos líneas independientes, de modo de poder validar los resultados del experimento recién mostrado al poder comparar los datos entre las líneas. Para esto también se transfectaron células con los vectores pSUPER EV como control y pSUPER BBS7 por triplicado, se extrajo el ARN, se marcó y se hibridó en un chip igual al anterior, en el cual también se hicieron tres réplicas biológicas y una réplica técnica con cambio de color entre las muestras. Nuevamente se obtuvo un número alto (comparable al anterior) de genes diferencialmente expresados. Los datos obtenidos en este segundo ensayo fueron sometidos a los mismos análisis que los del primero, análisis con y sin sesgo, comparando los blancos de la proteína RNF2 y las otras proteínas PcG, así como la comparación con el proteoma ciliar y el análisis de ontología. Es importante destacar que los resultados fueron prácticamente iguales entre los dos experimentos para la totalidad de los análisis realizados, repitiéndose la asociación entre BBS7 y los genes blanco de las proteínas PcG, la no vinculación con los genes del proteoma ciliar y a su vez, los grupos de ontología de los genes diferencialmente expresados también fueron comparables. Curiosamente sin embargo, no hubo una correspondencia en la identidad de genes individuales diferencialmente expresados. Por lo tanto, si bien los genes afectados por la inhibición de BBS7 en las distintas líneas celulares serían diferentes, las vías y procesos en los cuales los mismos participan serían comparables, nuevamente implicando genes blanco de las proteínas PcG, probablemente reflejando diferencias intrínsecas al transcriptoma de cada línea.

Capítulo 6:

Discusión

El conocimiento cada vez más profundo de la biología de las cilias ha sido clave para comenzar a comprender las consecuencias fenotípicas causadas por la disfunción de estos organelos celulares. Sin embargo, y a pesar de estos avances, poco se sabe aún del rol exacto de un gran número de proteínas ciliares, tanto en las cilias como en otros contextos independientes de ellas. Este trabajo fue concebido considerando este punto que es especialmente cierto en el caso de las proteínas asociadas al síndrome de Bardet-Biedl. Como fue detallado en capítulos anteriores, y como se discutirá a continuación, este trabajo brinda no solo información novedosa acerca de la función de un grupo de proteínas asociadas a BBS sino que deja en evidencia el alto grado de complejidad del tema al encontrar que algunas proteínas BBS, al menos BBS2 y BBS7, no solo actuarían en las cilias y centrosomas sino que también son capaces de ingresar al núcleo celular aunque sea de manera transitoria. Demostrar esta capacidad fue un aspecto crítico de esta tesis dado que las proteínas BBS habían sido previamente reportadas únicamente en el centrosoma, el cuerpo basal y el axonema ciliar, restringiendo y sesgando por lo tanto todo análisis funcional a estos organelos.

6.1 Aportes al entendimiento de la base celular de BBS

Mediante un ensayo de doble-híbrido en levaduras se identificó una interacción directa entre BBS7 y RNF2, interacción que luego fue corroborada para otras proteínas BBS. Como se mencionó en los capítulos anteriores, RNF2 es un miembro del grupo polycomb (PcG). Las proteínas PcG regulan la expresión de distintos genes involucrados en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular a través del remodelado de cromatina [178-180]. En este contexto, los datos obtenidos en esta tesis seguramente serán importantes para continuar entendiendo la base celular y molecular de distintos fenotipos que caracterizan a BBS y posiblemente a otras ciliopatías. Por ejemplo, es importante destacar que el balance entre proliferación y diferenciación, proceso en el cual los genes PcG participan, está claramente alterado en muchos de los fenotipos que caracterizan las ciliopatías. Un ejemplo típico de este desbalance es la formación de quistes renales. Esta patología está caracterizada por una proliferación celular aumentada y problemas de diferenciación en las células

epiteliales que conforman los túbulos renales, resultando en la formación de quistes que progresivamente afectan la funcionalidad del órgano y eventualmente resultan en falla renal [203, 204].

Los ensayos realizados en esta tesis generaron una extensa lista de genes cuya expresión estaría afectada en ausencia de BBS7, aunque también mostraron que no todos estos genes identificados por los ensayos *in vitro* mostrarían el mismo efecto en ensayos *in vivo*. Sin embargo, el hecho de que las proteínas BBS afecten la expresión y actividad de reguladores transcripcionales claves como lo son las proteínas PcG, podría generar pistas importantes para entender la base celular de las diferentes manifestaciones clínicas que caracterizan a BBS y otras ciliopatías. Por ejemplo, aquí se muestra como la inhibición de BBS7 resulta en una bajada importante en los niveles de *SIX1* en ensayos *in vitro*, así como en una expresión ectópica en los ensayos con peces cebra. A su vez, otros investigadores demostraron en modelos murinos que *Six1* se encuentra implicada en la formación de estructuras sensoriales especializadas, placodas, así como en otros aspectos del desarrollo del sistema sensorial, hallazgos que pueden ser relevantes para explicar los defectos en la termosensación reportados recientemente en pacientes y animales BBS [205, 206]. De la misma manera, *SIX1* se ha visto implicada en procesos como la transición epitelio-mesénquima (EMT) [207], generando potenciales pistas para entender la marcada fibrosis observada en el fenotipo renal de las ciliopatías.

6.2 Mecanismo por el cual BBS7 regula RNF2 y otras PcG

En esta tesis se pudo constatar que múltiples proteínas BBS interaccionan con RNF2, de hecho, todas las analizadas en este trabajo, al menos en condiciones de sobre-expresión, y que esta interacción generaría un efecto regulatorio sobre RNF2. Esto sugiere que las proteínas BBS podrían estar actuando sobre RNF2 en el contexto de un complejo. El conjunto de datos aquí mostrados apoyan esta posibilidad ya que mientras la inhibición de alguna de estas proteínas BBS genera un aumento en la cantidad de RNF2, la sobre-expresión de proteínas BBS individualmente no genera efecto. Una interpretación posible es pensar que el quitar una proteína podría

desestabilizar un complejo pero agregar una sola no tendría efecto si no se consigue alcanzar la formación de un mayor número de complejos activos. Desde hace unos años que se van encontrando evidencias de que las proteínas BBS actúan en forma de complejo, de hecho se ha descrito el BBSoma formado por 6 proteínas BBS que actúa transportando proteínas desde el aparato de Golgi hacia la cilia [32, 165]. De esta manera podría ser posible pensar que un complejo similar estaría afectando la función de RNF2. De hecho, los patrones de herencia que presentan algunas familias BBS, enfermedad históricamente catalogada como autosómica recesiva, han resaltado el alto nivel de complejidad que presentan un gran número de enfermedades humanas en lo que respecta a su base genética. Inclusive en aquellas consideradas puramente mendelianas no es raro encontrar interacciones entre diferentes genes así como con el ambiente. Esta complejidad refleja el hecho de que las proteínas en general no actúan en forma aislada sino que son parte de complejos y vías, por lo que los resultados obtenidos en esta tesis generan un aporte más al análisis de este fenómeno. En este sentido es importante resaltar que este no es sólo un fenómeno interesante desde una perspectiva biológica, sino que es uno de los principales factores que explican las dificultades en establecer correlaciones genotipo-fenotipo, impactando así significativamente en la clínica genética y dificultando los niveles de confianza que se pueden otorgar a un diagnóstico genético, que en muchos casos se realiza sin tener en cuenta o conocer todos los factores involucrados en la etiología de la enfermedad.

Un tema interesante a explorar que surge de los datos de esta tesis sería el mecanismo por el cual las proteínas BBS estarían regulando los niveles proteicos de RNF2. Una posibilidad, basada en la capacidad de BBS7 de entrar al núcleo y su exportación activa de este compartimiento, es que BBS7 sea necesaria para de alguna manera interferir con la actividad de RNF2 o su unión al ADN, provocando un aumento en su accesibilidad por parte del proteasoma y en consecuencia favoreciendo su degradación, por ejemplo mediando su translocación al citoplasma. En este sentido, estudios recientes muestran como la inhibición de BBS4 genera fallas en la función del proteasoma que lleva a la acumulación de β -catenina citoplasmática [166]. Por esta razón, nuestros colaboradores en el laboratorio dirigido por el Dr. Katsanis realizaron un ensayo como el reportado pero en este caso inhibiendo la expresión de BBS7. Se

trata de un ensayo realizado en la línea celular HEK293 ZsGreen que funciona como un sensor de la actividad del proteasoma dado que en esta línea, la proteína verde fluorescente (GFP) se encuentra marcada constitutivamente para su degradación. Este estudio mostró que al inhibir la expresión de BBS7, la cuantificación de la luminiscencia emitida por GFP medida mediante citometría de flujo, fue de tres veces mayor en estas células que en las células control, indicando que la inhibición de BBS7 estaría afectando la función del proteasoma. Estos datos abren la posibilidad de que BBS7, y probablemente las demás proteínas BBS que regulan la expresión de RNF2, puedan estar afectando su tasa de degradación. Aunque este ensayo plantea una posibilidad interesante acerca del mecanismo de regulación, es importante tener en cuenta que se trata de un ensayo de actividad general del proteasoma. En este sentido, si BBS7 es necesaria para la correcta función del proteasoma, entonces el efecto que genera su inhibición, sea por un ensayo o por una mutación en un paciente, podría afectar un sinnúmero de proteínas, un efecto que por lo menos a priori debería resultar en fenotipos más graves aún del que se observa. Si efectivamente existe un rol regulatorio de las proteínas BBS sobre la actividad del proteasoma, será importante analizar que tan globalmente se afecta a las proteínas que son procesadas por este sistema o si existen mecanismos o cofactores que brinden cierta especificidad.

Para entender la relación entre BBS7 y proteínas nucleares como RNF2, será importante comprender con mayor profundidad el rol de BBS7 dentro del núcleo y el mecanismo por el cual es capaz de regular la expresión génica. Por ejemplo será importante determinar si BBS7 se une directamente al ADN o si su efecto está siempre mediado por la interacción con otras proteínas como RNF2 u otras PcG. Esta interrogante se podría abordar por un ensayo de “ChiP on chip” (Precipitación de cromatina seguida de un ensayo de microarreglos) donde el ADN obtenido en la precipitación de cromatina con un anticuerpo contra BBS7 sería hibridado en un chip de microarreglos para interrogar sondas correspondientes a las secuencias promotoras y reguladoras, o por un ensayo de secuenciación masiva, de manera de obtener información acerca de las secuencias a las cuales se estaría uniendo. En el marco de esta tesis se intentó determinar si BBS7 era capaz de interactuar con el ADN mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina. Este ensayo presentó varias

dificultades técnicas como ser la poca cantidad de ADN que se obtiene. Esto hace que sea imprescindible amplificar el ADN obtenido para poder saber de manera cualitativa si de hecho se logró obtener ADN o no, método que resulta difícil de realizar al no saber a priori a qué secuencias se uniría BBS7. Por otro lado, los ensayos de “ChiP on chip” o secuenciación masiva resultan muy costosos como para realizar si no se está seguro si efectivamente se logró inmunoprecipitar ADN al utilizar un anticuerpo contra BBS7. Por estas razones, sería interesante encontrar otro mecanismo de análisis para determinar en primer lugar si BBS7 se une o no al ADN.

6.3 Relevancia fisiológica de la entrada de BBS7 y posiblemente otras BBSs al núcleo celular

El conjunto de los datos aquí presentados apoya la idea de que en el caso de las proteínas BBS, la capacidad de ingresar al núcleo celular sea un componente importante de su actividad biológica y por lo tanto fisiológicamente relevante. En primer lugar, la gran mayoría de las proteínas BBS analizadas en este estudio presentan señales de exportación nuclear (NES), que para el caso de BBS7 se constató que se trata de una señal funcional. En segundo lugar, mientras que la reducción en los niveles de BBS1, 2, 4 y 7 resulta en un aumento de RNF2, la inhibición de BBS2, que estaría presente en el núcleo a mayores niveles, provoca un aumento de RNF2 aún mayor. Por último, dos mutaciones de BBS7 (H323R y T211I) presentes en pacientes BBS [11] muestran una proteína con mayor localización nuclear que la proteína salvaje. Es importante destacar a su vez, que estas dos mutantes son capaces de unirse a RNF2 y fueron categorizadas como dominantes negativos en los ensayos de rescate realizados en pez cebra. En este contexto, es interesante especular que la entrada aumentada al núcleo, sumado a su capacidad de unir RNF2, podrían ser factores importantes para entender el efecto dominante de estas mutantes por ejemplo teniendo en cuenta la posibilidad de que BBS7 nuclear actúe facilitando la degradación de RNF2 como se discutía anteriormente.

Resta determinar el mecanismo por el cual las mutantes H323R y T211I se acumulan en el núcleo, ya que por ejemplo, no se prevé que estas mutaciones afecten residuos

involucrados en las señales NES presentes en BBS7. Sin embargo es interesante notar que la mutación T211I resulta en un cambio en uno de los picos generados por el programa NetNES, notándose una disminución en la señal en comparación con la proteína wt (ver Anexo 5). Pero dado que según la predicción la señal seguiría presente, además de que esta proteína presentaría una señal adicional, una posible explicación de por qué estas mutantes se encuentran en mayor cantidad en el núcleo que la proteína wt, sería que estas mutaciones estén afectando interacciones proteína-proteína necesarias para una exportación nuclear eficiente. Las proteínas que son exportadas de esta manera interactúan físicamente con el receptor CRM1 y a veces requieren la presencia de otras proteínas como RanGTP y/o proteínas adaptadoras que medien esta interacción [174, 185, 212]. Además, la actividad de una señal NES puede estar regulada por la unión de proteínas adicionales y modificaciones post-traduccionales [174], aspectos que también podrían verse afectados por estas mutaciones.

Un aspecto difícil de entender en lo que respecta a estas mutantes en BBS7 y otras analizadas, para las cuales se determinó un efecto dominante negativo, es el hecho de que el síndrome se herede mayormente en forma recesiva. Sin embargo, al analizar el patrón de distribución de estas mutaciones en los pacientes BBS, se encontró que por un lado, estos alelos sólo se presentan en el 18% de los casos, y al analizar su contribución se encontró que la gran mayoría se encuentra en un locus epistático. Esto sugiere que en el patrón de herencia trialélica descrito para BBS, la mayor parte de los efectos modificadores de la penetrancia y expresividad del síndrome se heredarían de manera dominante [213].

Es importante destacar que la habilidad de algunas proteínas ciliares de entrar al núcleo celular no sería exclusiva de las proteínas BBS y que ya se ha reportado anteriormente, como ser el caso de inversina, proteína responsable de uno de los tipos de nefronostisis (NPHP2), o de policistina 1, proteína alterada en la poliquistosis renal dominante (ADPKD), así como de NEK1, proteína centrosómica mutada en modelos murinos de poliquistosis renal [208-210]. De la misma manera, OFD1, la proteína mutada en la ciliopatía “Síndrome orofaciodigital de tipo 1”, también ha mostrado tener esta capacidad, la cual se ha vinculado con la expresión génica por su asociación

con una acetiltransferasa de histonas [211]. Además, como ya se mencionó en la introducción, existen similitudes sorprendentes entre el proceso de importación nuclear y la entrada a la cilia. Se demostró que el motor molecular KIF17 posee una señal de localización ciliar que es similar a la señal de localización nuclear clásica NLS y que las proteínas importina β 2 y RanGTP, claves en la importación nuclear, también se encuentran en la cilia y son necesarias para el ingreso de KIF17 a la misma [61]. Este tipo de mecanismos comunes entre la entrada a la cilia y al núcleo podrían explicar cómo se regula la localización de BBS7. En este sentido sería interesante realizar experimentos que permitan detectar cuál es el mecanismo de entrada de esta proteína al núcleo (Ver sección 6.5, Perspectivas).

6.4 Regulación de la entrada al núcleo de las proteínas BBS

Un aspecto clave para entender la función nuclear de BBS7 y por tanto su mecanismo de acción sobre proteínas como RNF2, es determinar los factores que regulan su entrada y salida de este compartimiento. Teniendo en cuenta la importancia de la función ciliar en diferentes cascadas de señalización, una posibilidad sería que se trate de señales provenientes de las cilia las que están regulando la localización subcelular de las proteínas BBS estudiadas aquí. Sería interesante por lo tanto poder realizar experimentos donde o bien se estimulen o se inhiban diferentes vías de señalización que operan a través de la cilia para evaluar si son las responsables de la localización de estas proteínas. Como una primera aproximación al problema, en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Katsanis en la Universidad de Duke, se realizaron ensayos en células en cultivo inhibiendo la expresión de proteínas clave para la correcta función ciliar, los motores moleculares anterógrado KIF3A y retrógrado IFT139. En estos ensayos se evaluaron por RT-PCR los niveles de ARNm de 6 de los genes blanco de RNF2 analizados en este trabajo. A pesar de que los resultados obtenidos en estos ensayos no mostraron cambios estadísticamente significativos, mostraron una tendencia marcada donde la inhibición de KIF3A generó el mismo efecto sobre estos genes que la inhibición de BBS7 mientras que la inhibición de IFT139 generó el efecto opuesto (Fig. 41). Estos datos sugerirían por tanto que componentes ciliares

específicos podrían estar jugando un rol en la regulación de RNF2, que a su vez podría estar mediado por proteínas como BBS7. En este contexto, el estudio de las proteínas BBS brinda una oportunidad para entender como la información captada por las cilias es capaz de alcanzar el núcleo para finalmente modular expresión génica.

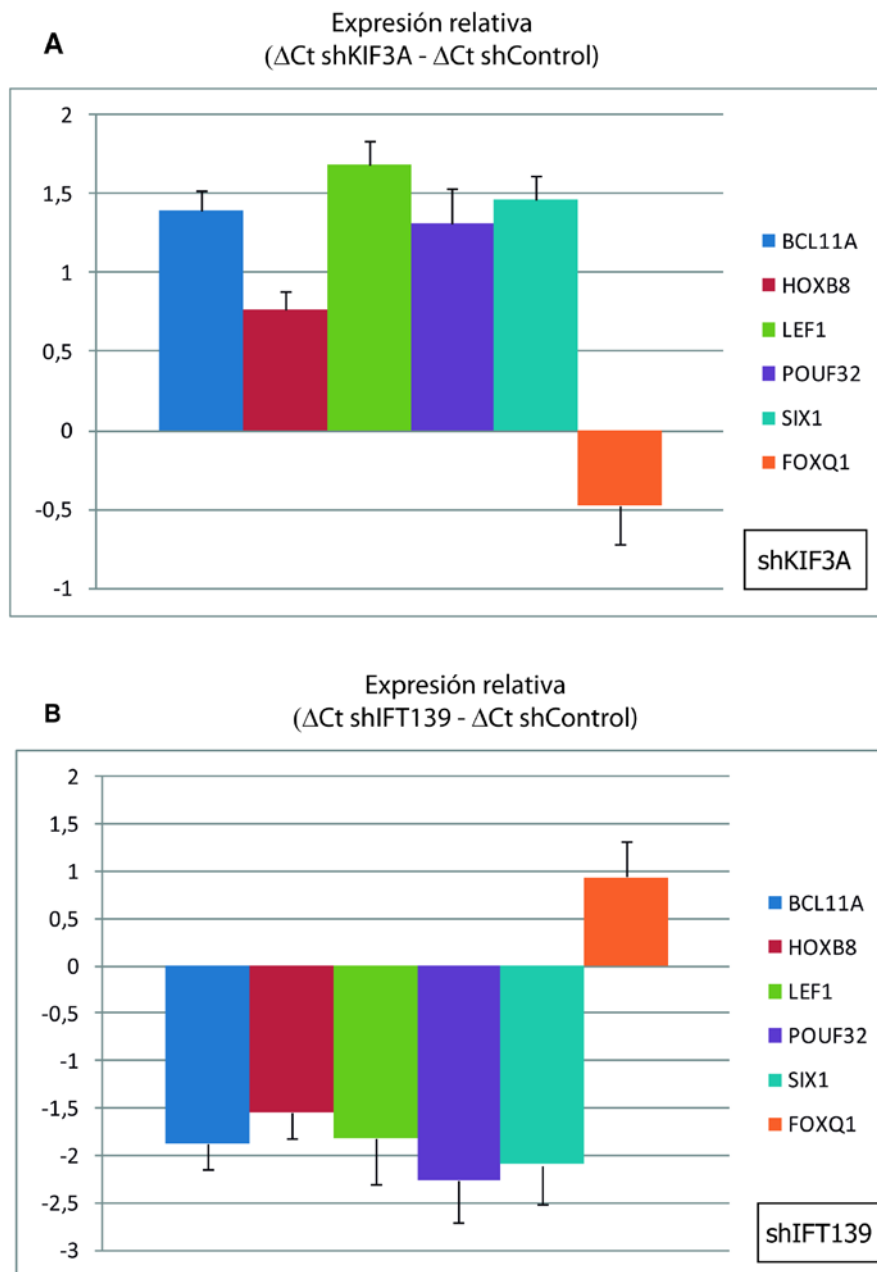


Fig. 41: Gráficos mostrando la expresión relativa de los genes *BCL11A*, *HOXB8*, *LEF1*, *POUF32*, *SIX1* y *FOXQ1* al comparar células control con células donde se inhibió la expresión de KIF3A (panel A), y con células donde se inhibió la expresión de IFT139 (panel B).

En conclusión, proteínas como las BBS podrían estar generando un vínculo entre la cilia y el interior de la célula, a través de la transducción de diferentes tipos de señales y finalmente, ejerciendo su rol a través de la regulación de la transcripción. Se requieren más estudios para evaluar la posibilidad de que señales provenientes de las ciliias modulen la actividad de las proteínas BBS, su capacidad para entrar al núcleo, su asociación con RNF2 u otras PcG, y por tanto su rol sobre la regulación génica. Entender el tipo de genes que se encuentran afectados en última medida por la función de proteínas como las BBS dará mayor profundidad al entendimiento de la patogénesis y base celular de las ciliopatías.

6.5 Perspectivas

Uno de los aspectos más interesantes a determinar como continuación de este trabajo es el mecanismo de entrada de las proteínas BBS al núcleo celular, aspecto crítico para poder comprender el rol biológico de estas proteínas. Es probable que sea todo el complejo del BBSoma u otro complejo similar el que estaría ingresando al núcleo. El hecho que los datos aquí presentados muestren que varias proteínas BBS interactúan con RNF2, fortalece la hipótesis de la formación de un complejo de las BBS que quizás incluya a RNF2, al menos en el núcleo celular.

Otro aspecto que sería interesante evaluar es si la entrada de BBS7 al núcleo depende del transporte a través de microtúbulos. Este mecanismo no convencional de entrada al núcleo celular ha sido demostrado para otras proteínas reguladoras como p53 y Rb [183]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el BBSoma formaría la cubierta proteica de vesículas que dirigen proteínas hacia la membrana de la cilia primaria. Según estos datos, el BBSoma se ensamblaría sobre la membrana y la unión de BBS3 (Arl6) sería la señal que dirige la vesícula a la cilia en vinculación con los microtúbulos [165]. Durante el desarrollo de esta tesis, a través de ensayos de inmunocitoquímica, se obtuvieron datos preliminares no publicados aún que muestran que donde hay una alta densidad de microtúbulos, se encuentra una fuerte tinción específica para BBS7 en unas estructuras que podrían ser vesículas (Fig.42). De estas

observaciones surge la pregunta de si BBS7 utilizaría el transporte vesicular a través de microtúbulos para ingresar al núcleo celular.

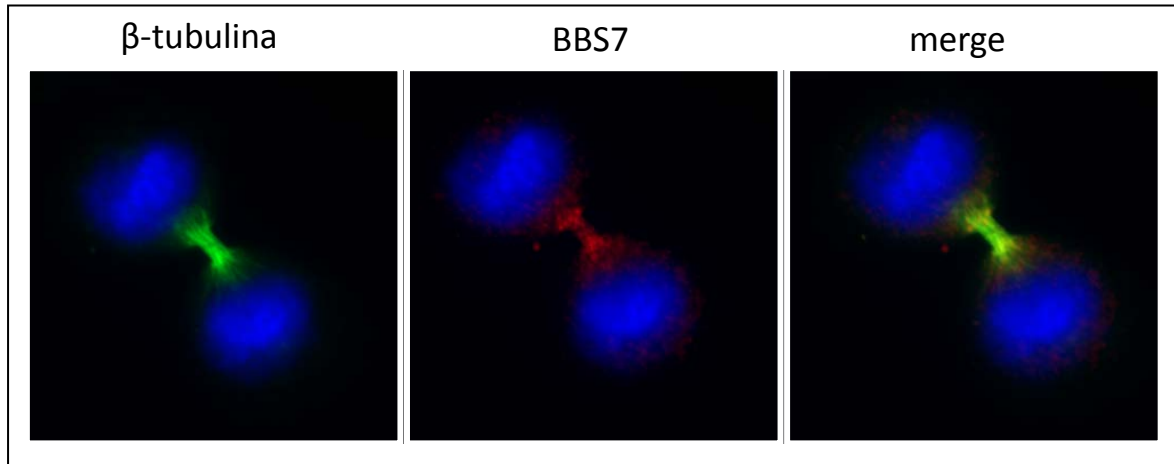


Fig. 42: Células en la última fase de división mitótica, citocinesis, donde aún se mantienen unidas por una densa concentración de microtúbulos. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, en verde se observan los microtúbulos y en rojo se observa BBS7.

Determinar el mecanismo de entrada de la proteína BBS7 al núcleo va a resultar muy importante sobre todo en lo que respecta a entender su rol biológico extra-ciliar. Por otro lado, como las proteínas BBS carecen de señal de localización nuclear, estos datos proveerán información importante para profundizar el análisis de los mecanismos de localización nuclear no convencionales, lo cual resulta interesante en un sentido más amplio que el de este grupo de proteínas o esta patología en particular. Además, dado que aquí se muestra que las mutaciones que BBS7 presenta en los pacientes con BBS alteran su presencia en el núcleo, determinar el mecanismo de ingreso a dicho compartimiento puede ayudar a dilucidar el mecanismo subyacente a la biología de la enfermedad.

Estas perspectivas serán llevadas adelante como continuación de esta tesis en el marco de un proyecto Fondo Clemente Estable (FCE).

Bibliografía

1. Beales, P.L., et al., *New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey*. J Med Genet, 1999. 36(6): p. 437-46.
2. Halac, U. and D. Herzog, *Bardet-Biedl Syndrome, Crohn Disease, Primary Sclerosing Cholangitis, and Autoantibody Positive Thyroiditis: A Case Report and A Review of a Cohort of BBS Patients*. Case Report Med, 2012. 2012: p. 209827.
3. Beales, P.L., et al., *Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families*. J Med Genet, 1997. 34: p. 92-98.
4. Ross, A.J., et al., *Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates*. Nat Genet, 2005. 37(10): p. 1135-40.
5. Mykytyn, K., et al., *Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome*. Nat Genet, 2002. 31(4): p. 435-8.
6. Nishimura, D.Y., et al., *Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(47): p. 16588-93.
7. Fan, Y., et al., *Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome*. Nat Genet, 2004. 36(9): p. 989-93.
8. Mykytyn, K., et al., *Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4*. Nat Genet, 2001. 28(2): p. 188-91.
9. Li, J.B., et al., *Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene*. Cell, 2004. 117(4): p. 541-52.
10. Katsanis, N., et al., *Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome*. Nat Genet, 2000. 26(1): p. 67-70.
11. Badano, J.L., et al., *Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2*. Am J Hum Genet, 2003. 72(3): p. 650-8.
12. Ansley, S.J., et al., *Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome*. Nature, 2003. 425(6958): p. 628-33.
13. Nishimura, D.Y., et al., *Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene*. Am J Hum Genet, 2005. 77(6): p. 1021-33.
14. Stoetzel, C., et al., *BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus*. Nat Genet, 2006. 38(5): p. 521-4.
15. Chiang, A.P., et al., *Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(16): p. 6287-92.
16. Stoetzel, C., 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, 2007. 80(1): p. 1-11.
17. Leitch, C.C., et al., *Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome*. Nat Genet, 2008. 40(4): p. 443-8.
18. Marion, V., 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, 2012. 49(5): p. 317-21.
19. Kim, S.K., et al., *Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis*. Science, 2010. 329(5997): p. 1337-40.
20. Otto, E.A., et al., *Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy*. Nat Genet, 2010. 42(10): p. 840-50.
21. Janssen, S., et al., *Mutation analysis in Bardet-Biedl syndrome by DNA pooling and massively parallel resequencing in 105 individuals*. Hum Genet, 2011. 129(1): p. 79-90.
22. Badano, J.L. and N. Katsanis, *Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission*. Nat Rev Genet, 2002. 3(10): p. 779-89.
23. Badano, J.L., et al., *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, 2003. 12(14): p. 1651-9.

24. Badano, J.L., et al., *Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome*. *Nature*, 2006. 439(7074): p. 326-30.
25. Katsanis, N., et al., *Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder*. *Science*, 2001. 293(5538): p. 2256-9.
26. Beales, P.L., 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*, 2003. 72(5): p. 1187-99.
27. Bin, J., et al., *BBS7 and TTC8 (BBS8) mutations play a minor role in the mutational load of Bardet-Biedl syndrome in a multiethnic population*. *Hum Mutat*, 2009. 30(7): p. E737-46.
28. Abu-Safieh, L., et al., *In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome*. *Eur J Hum Genet*, 2012. 20(4): p. 420-7.
29. Laurier, V., et al., *Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2, BBS10), three mutations, but no triallelism*. *Eur J Hum Genet*, 2006. 14(11): p. 1195-203.
30. Redin, C., et al., *Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom syndromes*. *J Med Genet*, 2012. 49(8): p. 502-12.
31. Smaoui, N., et al., *Screening of the eight BBS genes in Tunisian families: no evidence of triallelism*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. 47(8): p. 3487-95.
32. Nachury, M.V., et al., *A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis*. *Cell*, 2007. 129(6): p. 1201-13.
33. Kim, J.C., 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*, 2004. 36(5): p. 462-70.
34. Kim, J.C., et al., *MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis*. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 5): p. 1007-20.
35. Marion, V., et al., *Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(6): p. 1820-5.
36. May-Simera, H.L., et al., *Patterns of expression of Bardet-Biedl syndrome proteins in the mammalian cochlea suggest noncentrosomal functions*. *J Comp Neurol*, 2009. 514(2): p. 174-88.
37. Badano, J.L. and N. Katsanis, *Life without centrioles: cilia in the spotlight*. *Cell*, 2006. 125(7): p. 1228-30.
38. Debec, A., W. Sullivan, and M. Bettencourt-Dias, *Centrioles: active players or passengers during mitosis?* *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(13): p. 2173-94.
39. Badano, J.L., T.M. Teslovich, and N. Katsanis, *The centrosome in human genetic disease*. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(3): p. 194-205.
40. Hoyer-Fender, S., *Centriole maturation and transformation to basal body*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. 21(2): p. 142-7.
41. Andersen, S.S., *Molecular characteristics of the centrosome*. *Int Rev Cytol*, 1999. 187: p. 51-109.
42. Bobinnec, Y., et al., *Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998. 39(3): p. 223-32.
43. Rieder, C.L., S. Faruki, and A. Khodjakov, *The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center*. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(10): p. 413-9.
44. Zheng, Y., et al., *Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex*. *Nature*, 1995. 378(6557): p. 578-83.
45. Bornens, M., *Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. 14(1): p. 25-34.

46. Moritz, M., et al., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome*. *Nature*, 1995. 378(6557): p. 638-40.
47. Piel, M., et al., *The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells*. *J Cell Biol*, 2000. 149(2): p. 317-30.
48. Andersen, J.S., et al., *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling*. *Nature*, 2003. 426(6966): p. 570-4.
49. Nogales-Cadenas, R., et al., *CentrosomeDB: a human centrosomal proteins database*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): p. D175-80.
50. Dawe, H.R., H. Farr, and K. Gull, *Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells*. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 1): p. 7-15.
51. Paintrand, M., et al., *Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations*. *J Struct Biol*, 1992. 108(2): p. 107-28.
52. Pelletier, L. and Y.M. Yamashita, *Centrosome asymmetry and inheritance during animal development*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012.
53. Bahe, S., et al., *Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion*. *J Cell Biol*, 2005. 171(1): p. 27-33.
54. Hagiwara, H., et al., *Ultrastructural and immunohistochemical study of the basal apparatus of solitary cilia in the human oviduct epithelium*. *J Anat*, 2002. 200(Pt 1): p. 89-96.
55. Hagiwara, H., et al., *The primary cilia of secretory cells in the human oviduct mucosa*. *Med Mol Morphol*, 2008. 41(4): p. 193-8.
56. Irigoien, F. and J.L. Badano, *Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium*. *Curr Genomics*, 2011. 12(4): p. 285-97.
57. Singla, V. and J.F. Reiter, *The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle*. *Science*, 2006. 313(5787): p. 629-33.
58. Davis, E.E., M. Brueckner, and N. Katsanis, *The emerging complexity of the vertebrate cilium: new functional roles for an ancient organelle*. *Dev Cell*, 2006. 11(1): p. 9-19.
59. Reiter, J.F., O.E. Blacque, and M.R. Leroux, *The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization*. *EMBO Rep*, 2012. 13(7): p. 608-18.
60. Kee, H.L., et al., *A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia*. *Nat Cell Biol*, 2012. 14(4): p. 431-7.
61. Dishinger, J.F., et al., *Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP*. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(7): p. 703-10.
62. Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease*. *Cell*, 2009. 137(1): p. 32-45.
63. Sulik, K., et al., *Morphogenesis of the murine node and notochordal plate*. *Dev Dyn*, 1994. 201(3): p. 260-78.
64. Nonaka, S., et al., *Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein*. *Cell*, 1998. 95(6): p. 829-37.
65. Dabdoub, A. and M.W. Kelley, *Planar cell polarity and a potential role for a Wnt morphogen gradient in stereociliary bundle orientation in the mammalian inner ear*. *J Neurobiol*, 2005. 64(4): p. 446-57.
66. Feistel, K. and M. Blum, *Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo*. *Dev Dyn*, 2006. 235(12): p. 3348-58.
67. Johnson, K.A. and J.L. Rosenbaum, *Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, 1992. 119(6): p. 1605-11.
68. Rosenbaum, J.L. and G.B. Witman, *Intraflagellar transport*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(11): p. 813-25.

69. Kozminski, K.G., et al., *A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(12): p. 5519-23.
70. Pugacheva, E.N., et al., *HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium*. Cell, 2007. 129(7): p. 1351-63.
71. Rieder, C.L., C.G. Jensen, and L.C. Jensen, *The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line*. J Ultrastruct Res, 1979. 68(2): p. 173-85.
72. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(12): p. 938-47.
73. Janke, C., K. Rogowski, and J. van Dijk, *Polyglutamylolation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series*. EMBO Rep, 2008. 9(7): p. 636-41.
74. Wheatley, D.N., *Primary cilia in normal and pathological tissues*. Pathobiology, 1995. 63(4): p. 222-38.
75. Pickett-Heaps, J.D., *Aspects of spindle evolution*. Ann N Y Acad Sci, 1975. 253: p. 352-61.
76. Takeda, S., et al., *Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A-/- mice analysis*. J Cell Biol, 1999. 145(4): p. 825-36.
77. Pazour, G.J., et al., *Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella*. J Cell Biol, 2000. 151(3): p. 709-18.
78. Praetorius, H.A. and K.R. Spring, *Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium*. J Membr Biol, 2001. 184(1): p. 71-9.
79. Kiprilov, E.N., et al., *Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery*. J Cell Biol, 2008. 180(5): p. 897-904.
80. Krieger, J., et al., *Probing olfactory receptors with sequence-specific antibodies*. Eur J Biochem, 1994. 219(3): p. 829-35.
81. Elias, R.V., et al., *Temporal kinetics of the light/dark translocation and compartmentation of arrestin and alpha-transducin in mouse photoreceptor cells*. Mol Vis, 2004. 10: p. 672-81.
82. Calvert, P.D., et al., *Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors*. Trends Cell Biol, 2006. 16(11): p. 560-8.
83. Trivedi, D., et al., *Live-cell imaging evidence for the ciliary transport of rod photoreceptor opsin by heterotrimeric kinesin-2*. J Neurosci, 2012. 32(31): p. 10587-93.
84. Gong, Z., et al., *Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in Drosophila*. J Neurosci, 2004. 24(41): p. 9059-66.
85. Low, S.H., et al., *Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease*. Dev Cell, 2006. 10(1): p. 57-69.
86. Cardenas-Rodriguez, M. and J.L. Badano, *Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. 151C(4): p. 263-80.
87. Christensen, S.T., et al., *The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair*. Curr Top Dev Biol, 2008. 85: p. 261-301.
88. Gerdes, J.M. and N. Katsanis, *Ciliary function and Wnt signal modulation*. Curr Top Dev Biol, 2008. 85: p. 175-95.
89. Huangfu, D., et al., *Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins*. Nature, 2003. 426(6962): p. 83-7.
90. Simons, M., et al., *Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways*. Nat Genet, 2005. 37(5): p. 537-43.

91. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(10): p. 769-76.
92. Germino, G.G., *Linking cilia to Wnts*. Nat Genet, 2005. 37(5): p. 455-7.
93. Corbit, K.C., et al., *Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium*. Nature, 2005. 437(7061): p. 1018-21.
94. Varjosalo, M. and J. Taipale, *Hedgehog: functions and mechanisms*. Genes Dev, 2008. 22(18): p. 2454-72.
95. Haycraft, C.J., et al., *Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation*. Development, 2007. 134(2): p. 307-16.
96. Meyers, E.N. and G.R. Martin, *Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH*. Science, 1999. 285(5426): p. 403-6.
97. Boon, M., et al., *Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease*. Eur J Pediatr, 2012.
98. Panizzi, J.R., et al., *CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms*. Nat Genet, 2012. 44(6): p. 714-9.
99. Skeik, N. and F.I. Jabr, *Kartagener syndrome*. Int J Gen Med. 4: p. 41-3.
100. Leigh, M.W., et al., *Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome*. Genet Med, 2009. 11(7): p. 473-87.
101. Ibanez-Tallon, I., et al., *Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation*. Hum Mol Genet, 2004. 13(18): p. 2133-41.
102. Supp, D.M., et al., *Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice*. Nature, 1997. 389(6654): p. 963-6.
103. Marszalek, J.R., et al., *Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(9): p. 5043-8.
104. D'Angelo, A. and B. Franco, *The dynamic cilium in human diseases*. Pathogenetics, 2009. 2(1): p. 3.
105. Badano, J.L., et al., *The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. 7: p. 125-148.
106. Baker, K. and P.L. Beales, *Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. 151C(4): p. 281-95.
107. Moyer, J.H., et al., *Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice*. Science, 1994. 264(5163): p. 1329-33.
108. Lehman, J.M., et al., *The Oak Ridge Polycystic Kidney mouse: modeling ciliopathies of mice and men*. Dev Dyn, 2008. 237(8): p. 1960-71.
109. Nauli, S.M., et al., *Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells*. Nat Genet, 2003. 33(2): p. 129-37.
110. Lina, F. and L.M. Satlinb, *Polycystic kidney disease: the cilium as a common pathway in cystogenesis*. Curr Opin Pediatr, 2004. 16(2): p. 171-6.
111. Fliegauf, M., T. Benzing, and H. Omran, *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(11): p. 880-93.
112. Zerres, K., et al., *Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen*. Nat Genet, 1994. 7(3): p. 429-32.
113. Onuchic, L.F., et al., *PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats*. Am J Hum Genet, 2002. 70(5): p. 1305-17.
114. Ward, C.J., et al., *The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein*. Nat Genet, 2002. 30(3): p. 259-69.
115. Ward, C.J., et al., *Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia*. Hum Mol Genet, 2003. 12(20): p. 2703-10.
116. Germino, G.G., et al., *Positional cloning approach to the dominant polycystic kidney disease gene, PKD1*. Kidney Int Suppl, 1993. 39: p. S20-5.

117. *The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium.* Cell, 1994. 78(4): p. 725.
118. Delmas, P., *Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors.* Pflugers Arch, 2005. 451(1): p. 264-76.
119. Hildebrandt, F., et al., *A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1.* Nat Genet, 1997. 17(2): p. 149-53.
120. Saunier, S., et al., *A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis.* Hum Mol Genet, 1997. 6(13): p. 2317-23.
121. Mollet, G., et al., *Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes.* Hum Mol Genet, 2005. 14(5): p. 645-56.
122. Mochizuki, T., et al., *Cloning of inv, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development.* Nature, 1998. 395(6698): p. 177-81.
123. Omran, H., et al., *Identification of a new gene locus for adolescent nephronophthisis, on chromosome 3q22 in a large Venezuelan pedigree.* Am J Hum Genet, 2000. 66(1): p. 118-27.
124. Olbrich, H., et al., *Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis.* Nat Genet, 2003. 34(4): p. 455-9.
125. Bergmann, C., et al., *Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia.* Am J Hum Genet, 2008. 82(4): p. 959-70.
126. Otto, E., et al., *A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution.* Am J Hum Genet, 2002. 71(5): p. 1161-7.
127. Mollet, G., et al., *The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin.* Nat Genet, 2002. 32(2): p. 300-5.
128. Otto, E.A., et al., *Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin.* Nat Genet, 2005. 37(3): p. 282-8.
129. Sayer, J.A., et al., *The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4.* Nat Genet, 2006. 38(6): p. 674-81.
130. Hildebrandt, F., M. Attanasio, and E. Otto, *Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy.* J Am Soc Nephrol, 2009. 20(1): p. 23-35.
131. Zhang, F., et al., *Characterization of Glis2, a novel gene encoding a Gli-related, Kruppel-like transcription factor with transactivation and repressor functions. Roles in kidney development and neurogenesis.* J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10139-49.
132. Attanasio, M., et al., *Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis.* Nat Genet, 2007. 39(8): p. 1018-24.
133. Otto, E.A., et al., *NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis.* J Am Soc Nephrol, 2008. 19(3): p. 587-92.
134. Otto, E.A., et al., *Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11).* J Med Genet, 2009. 46(10): p. 663-70.
135. Schaefer, E., et al., *Mutations in SDCCAG8/NPHP10 Cause Bardet-Biedl Syndrome and Are Associated with Penetrant Renal Disease and Absent Polydactyly.* Mol Syndromol, 2011. 1(6): p. 273-281.
136. Wolf, M.T., et al., *Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis.* Kidney Int, 2007. 72(12): p. 1520-6.
137. Hildebrandt, F. and W. Zhou, *Nephronophthisis-associated ciliopathies.* J Am Soc Nephrol, 2007. 18(6): p. 1855-71.

138. Seeman, T., et al., *Polycystic kidney and hepatic disease with mental retardation is nephronophthisis 11 caused by MKS3/TMEM67 mutations*. *Pediatr Nephrol*, 2010. 25(11): p. 2375-6.
139. Dawe, H.R., et al., *The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation*. *Hum Mol Genet*, 2007. 16(2): p. 173-86.
140. Kyttala, M., et al., *MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome*. *Nat Genet*, 2006. 38(2): p. 155-7.
141. Roume, J., et al., *A gene for Meckel syndrome maps to chromosome 11q13*. *Am J Hum Genet*, 1998. 63(4): p. 1095-101.
142. Morgan, N.V., et al., *A novel locus for Meckel-Gruber syndrome, MKS3, maps to chromosome 8q24*. *Hum Genet*, 2002. 111(4-5): p. 456-61.
143. Smith, U.M., et al., *The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat*. *Nat Genet*, 2006. 38(2): p. 191-6.
144. Frank, V., et al., *Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome*. *Hum Mutat*, 2008. 29(1): p. 45-52.
145. Baala, L., et al., *Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2007. 81(1): p. 170-9.
146. Delous, M., et al., *The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome*. *Nat Genet*, 2007. 39(7): p. 875-81.
147. Tallila, J., et al., *Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle*. *Am J Hum Genet*, 2008. 82(6): p. 1361-7.
148. Dawe, H.R., et al., *Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton*. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 15): p. 2716-26.
149. Parisi, M.A., et al., *The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2004. 75(1): p. 82-91.
150. Gorden, N.T., et al., *CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290*. *Am J Hum Genet*, 2008. 83(5): p. 559-71.
151. Dixon-Salazar, T., et al., *Mutations in the AHI1 gene, encoding jouberin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria*. *Am J Hum Genet*, 2004. 75(6): p. 979-87.
152. Valente, E.M., et al., *Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome*. *Nat Genet*, 2006. 38(6): p. 623-5.
153. Baala, L., et al., *The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2007. 80(1): p. 186-94.
154. Arts, H.H., et al., *Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome*. *Nat Genet*, 2007. 39(7): p. 882-8.
155. Cantagrel, V., et al., *Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2008. 83(2): p. 170-9.
156. Saar, K., et al., *Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity*. *Am J Hum Genet*, 1999. 65(6): p. 1666-71.
157. Duldulao, N.A., S. Lee, and Z. Sun, *Cilia localization is essential for in vivo functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion*. *Development*, 2009. 136(23): p. 4033-42.
158. Hildebrandt, F. and E. Otto, *Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease?* *Nat Rev Genet*, 2005. 6(12): p. 928-40.
159. Stoetzel, C., 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*, 2007. 80: p. 1-11.

160. Ansley, S.J., et al., *Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome*. *Nature*, 2003. 425: p. 628-633.
161. Badano, J.L., et al., *Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2*. *Am J Hum Genet*, 2003. 72: p. 650-658.
162. Dammermann, A. and A. Merdes, *Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1*. *J Cell Biol*, 2002. 159(2): p. 255-66.
163. Zimmerman, W. and S.J. Doxsey, *Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles*. *Traffic*, 2000. 1(12): p. 927-34.
164. Blacque, O.E., et al., *Loss of C. elegans BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport*. *Genes Dev*, 2004. 18(13): p. 1630-42.
165. Jin, H., et al., *The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia*. *Cell*, 2010. 141(7): p. 1208-19.
166. Gerdes, J.M., et al., *Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response*. *Nat Genet*, 2007.
167. Cardenas-Rodriguez, M., et al., *Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet-Biedl syndrome*. *Hum Genet*, 2013. 132(1): p. 91-105.
168. Badano, J.L., et al., *Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome*. *Nature*, 2006. 439: p. 326-330.
169. Badano, J.L. and N. Katsanis, *Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission*. *Nat Rev Genet*, 2002. 3: p. 779-789.
170. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. *Genome Biol*, 2004. 5(10): p. R80.
171. Smyth, G., *Limma: linear models for microarray data*. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (ed. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry and W. Huber). New York: Springer., 2005: p. 397-420.
172. Falcon, S. and R. Gentleman, *Using GOstats to test gene lists for GO term association*. *Bioinformatics*, 2007. 23(2): p. 257-8.
173. Nguyen Ba, A.N., et al., *NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction*. *BMC Bioinformatics*, 2009. 10: p. 202.
174. la Cour, T., et al., *Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals*. *Protein Eng Des Sel*, 2004. 17(6): p. 527-36.
175. Thisse, C. and B. Thisse, *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. *Nat Protoc*, 2008. 3(1): p. 59-69.
176. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. *Nature*, 2004. 431(7010): p. 873-8.
177. Schwartz, Y.B., et al., *Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, 2006. 38(6): p. 700-5.
178. Jürgens, G., *A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila*. *Nature*, 1985. 316: p. 153-155
179. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. *Nature*, 1978. 276: p. 565-570.
180. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. *Nat Rev Genet*, 2007. 8: p. 9-22.
181. Robbins, J., et al., *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence*. *Cell*, 1991. 64(3): p. 615-23.
182. Nigg, E.A., *Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation*. *Nature*, 1997. 386(6627): p. 779-87.
183. Wagstaff, K.M. and D.A. Jans, *Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms*. *Traffic*, 2009. 10(9): p. 1188-98.

184. Wiza, C., et al., *Proline-rich Akt substrate of 40-kDa contains a nuclear export signal*. Cell Signal, 2013.
185. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. 90(6): p. 1051-60.
186. Fukuda, M., et al., *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. Nature, 1997. 390(6657): p. 308-11.
187. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(16): p. 9112-7.
188. Holaska, J.M. and B.M. Paschal, *A cytosolic activity distinct from crm1 mediates nuclear export of protein kinase inhibitor in permeabilized cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(25): p. 14739-44.
189. Corbit, K.C., et al., *Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms*. Nat Cell Biol, 2008. 10(1): p. 70-6.
190. Katsanis, N., *Ciliary proteins and exencephaly*. Nat Genet, 2006. 38(2): p. 135-6.
191. Fischer, E., et al., *Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease*. Nat Genet, 2006. 38(1): p. 21-3.
192. Zaghoul, N.A. and N. Katsanis, *Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy*. J Clin Invest, 2009. 119(3): p. 428-37.
193. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. 441(7091): p. 349-53.
194. Bracken, A.P., et al., *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. Genes Dev, 2006. 20(9): p. 1123-36.
195. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. 276(5688): p. 565-70.
196. Chan, C.S., L. Rastelli, and V. Pirrotta, *A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression*. EMBO J, 1994. 13(11): p. 2553-64.
197. Saurin, A.J., et al., *A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins*. Nature, 2001. 412(6847): p. 655-60.
198. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. 111(2): p. 185-96.
199. Ketel, C.S., et al., *Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes*. Mol Cell Biol, 2005. 25(16): p. 6857-68.
200. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. 8(1): p. 9-22.
201. Bienvenu, F., et al., *Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen*. Nature, 2010. 463(7279): p. 374-8.
202. Gherman, A., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia*. Nat Genet, 2006. 38(9): p. 961-2.
203. Harris, P.C. and V.E. Torres, *Polycystic Kidney Disease*. Annu Rev Med, 2009. 60: p. 321-337.
204. Simons, M. and G. Walz, *Polycystic kidney disease: cell division without a c(1)ue?* Kidney Int, 2006. 70: p. 854-864.
205. Tan, P.L., et al., *Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(44): p. 17524-9.
206. Christophorou, N.A., et al., *Activation of Six1 target genes is required for sensory placode formation*. Dev Biol, 2009. 336(2): p. 327-36.

207. Micalizzi, D.S., et al., *The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling*. J Clin Invest, 2009. 119(9): p. 2678-90.
208. Hilton, L.K., M.C. White, and L.M. Quarmby, *The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 389(1): p. 52-6.
209. Nurnberger, J., R.L. Bacallao, and C.L. Phillips, *Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2002. 13(9): p. 3096-106.
210. Yoder, B.K., X. Hou, and L.M. Guay-Woodford, *The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13(10): p. 2508-16.
211. Giorgio, G., et al., *Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex*. Mol Biol Cell, 2007. 18(11): p. 4397-404.
212. Sorokin, A.V., E.R. Kim, and L.P. Ovchinnikov, *Nucleocytoplasmic transport of proteins*. Biochemistry (Mosc), 2007. 72(13): p. 1439-57.
213. Zaghoul, N.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 U S A, 2010. 107(23): p. 10602-7.

Anexos

ANEXO 1

Diseño de oligonucleótidos

Primers de clonado

RNF2SalIF ACGTGTGACGTCTCAGGCTGTGCAGACAA

RNF2NotIR ACGTGCGGCCGCTCATTGTGCTCCTTTGTAGG

Primers de secuenciación

pMyr 5' ACTACTAGCAGCTGTAATAC

pMyr 3' CGTGAATGTAAGCGTGACAT

pCMVF GATCCGGTACTAGAGGAACTGAAAAAC

pCMVR TTTATGCTCCGGCTCGTAT

Primers para silenciamiento

BBS7hs1Fwd

GATCCCCGAAACAAACCTCACTGAAATCAAGAGATTTCAAGTGGGTTTGTTTCTTTTA

BBS7hs1Rev

AGCTTAAAAGAAACAAACCTCACTGAAATCTCTTGAATTTCAAGTGGGTTTGTTTCGGG

Bbs7mm1Fwd

GATCCCCGAAATTCGAAATGACAAATCAAGAGATTTGTCATTTTGAATTTTCTTTTA

Bbs7mm1Rev

AGCTTAAAAGGAAATTCGAAATGACAAATCTCTTGAATTTGTCATTTTGAATTTTCTTTTA

RNF2hs1F

GATCCCCGAAATTTGGTCAGTGAGAAATCAAGAGATTTCTCACTGACCAATTCCTTTTA

RNF2hs1R

AGCTTAAAAGGAAATTTGGTCAGTGAGAAATCTCTTGAATTTCTCACTGACCAATTCCTTTTA

RNF2hs2F

GATCCCCGGCTAGAGCTTGATAATAATTCAAGAGATTATTATCAAGCTCTAGCCTTTTTA

RNF2hs2R

AGCTTAAAAAGGCTAGAGCTTGATAATAATCTCTTGAATTATTATCAAGCTCTAGCCGGG

RNF2hs3F

GATCCCCTGGCAATTGATCCAGTAATTTCAAGAGAATTACTGGATCAATTGCCATTTTTA

RNF2hs3R

AGCTTAAAAATGGCAATTGATCCAGTAATTCTCTTGAAATTACTGGATCAATTGCCAGGG

Primers para RT-PCR

hBBS7intF GCGGTGACTCTGGAGAAGAC

hBBS7intR GACCTGTAACCCAGCCTGAA

mBBS7intF TCGTCTTAGAGGTGCGGACT

mBBS7intR CACCACCCAGGAGTGAECTT

RNF2intF GTCTCAGGCTGTGCAGACAA

RNF2intR TTGCCACTTCTAAGGGCTGT

hGAPDHintF ACAGTCAGCCGCATCTTCTT

hGAPDHintR TTGATTTTGGAGGGATCTCG

mGAPDHintF TGTCCTACCCCAATGTGT

mGAPDHintR TGTGAGGGAGATGCTCAGTG

CCND1intF CCCTCGGTGTCCTACTTCAA

CCND1intR GGGGATGGTCTCCTTCATCT

Cdx2intF AGCCAAGTGAAAACCAGGAC

Cdx2intR AAGGGCTCTGGGACACTTCT

FOXA2intF CTACGCCAACATGAACTCCA

FOXA2intR GGCACCTTCAGGAAACAGTC

β cat int F CCCACTAATGTCCAGCGTTT

β cat int R AATCCACTGGTGAACCAAGC

GSK3 β int F CTGTGTGTTGGCTGAGCTGT

GSK3 β int R GTGGTGTAGTCGGGCAGTT

hFGFR1intF GAAGTTCAAATGCCCTTCCA

hFGFR1intR TCGATGTGCTTTAGCCACTG

hFGFR2intF CTTCTCTCGTTCCCCAAAT

hFGFR2intR AATCCCATCTGCACACTTCC

hFGFR3intF CTGAAAGACGATGCCACTGA

hFGFR3intR ACCTGGTAGGCACAGGACAC

hFGF2intF GTGCTAACCGTTACCTGGCTAT

hFGF2intR TGTGGCCATTAAAATCAGCTC

hFGF7intF GACATGGATCCTGCCAACTT

hFGF7intR AATCCAACTGCCACTGTCC

Para genes blanco de RNF2

BCL11AintF GATAAGCCACCTTCCCCTTC

BCL11AintR GCTGCTGGGCTCATCTTTAC

CDX2intF ATGCACAGGGTGTGGTATGA

CDX2intR AGACCAACAACCCAAACAGC

DLX2intF CTTTGCGGATGACCTCATTT

DLX2intR TAAAAAGGAGGGGTTGCTGA

FOXL2intF TTTGTTGGGCCTTCAAAAAG

FOXL2intR TCCCCAAACAACAAGCTAC

FOXQ1intF TGTGGCATTTCAGGTATGA

FOXQ1intR CTTGCTTCAAGGCAGTGGT

HAND1intF AAGAGAACCAGACGCAGGAA

HAND1intR GGCAGGATGAACAAACACCT

HoxB8intF CTGGCTTCTCTCTGGCTTC

HoxB8intR TAACTCTCCGCCCTTTTCA

LEF1intF TGGCAGCCCTATTTCAGTTT

LEF1intR ATGACAGTTTTGGGCAAAGG

POU3F2intF GCTGGAGTTCAGAGAATGTGTC

POU3F2intR GCTGGAGTTCAGAGAATGTGTC

SIX1intF AGGCCATCATCTGAACCAAG

SIX1intR GCAAAAGAGCTCCTGTCCTG

TBX15intF GGCAGGAAATATCCCCTCAT
TBX15intR TGCCCCCTTTTTTCATATTCA

Cebadores para experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

HoxB8 prom F_1 TGAAGTGGCATCCCTTCTTC
HoxB8 prom R_1 GGACAGAGAAGCCTCCAAAA

HoxB8 prom F_2 TGGTCTGCGAAGGTATTTGA
HoxB8 prom R_2 AACACCCAGGGAGAGAGAGG

promPOU3F2_F TTGCTAGCGGTATCCACGTA
promPOU3F2_R CCCTGCTCTCTCCAGCTCT

promSIX1_F_350pb GACCCTGGTCTGCTCTTGAA
promSIX1_F GCGACTCCCCTTAGGTGATA
promSIX1_R GGAAGAGGAAAGGTGGGAAG

promDLX2_F GGCAGTCTGTTTGACCTG
promDLX2_R CACCTAGCAACAGCCAATCA

promCDX2_F TCCAACCATTGGTGTCTGTG
promCDX2_R TTCTTTCTCCCACCTCCTT

promBCL11A_F_350pb CTGCCACCCCTTTCTTCTCT
promBCL11A_F TGGCTTGTCTGCTGCTCTTT
promBCL11A_R AACGTCAGGAGTCTGGATGG

promFOXL2_F AGAGCGAGTACCGGCAGAT
promFOXL2_R GGCGAGTTCATCTCCAAGTC

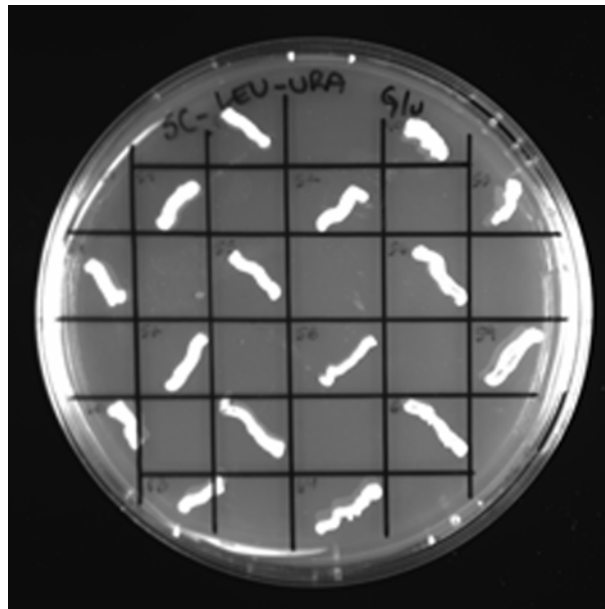
promFOXQ1_F ACATCATCCGGCACCATT
promFOXQ1_R GGGCTTAGAAGGCTTTCTCTG

promLEF1_F	GCTGTGACTCCCCGAGACT
promLEF1_R	AAGGAGGAGGAGCAGAAGATG
promTBX15_F	CAGCACCAGAACTTCCAA
promTBX15_R	GAATCAGCTCTCCACCTTG
promHAND1_F	CCGTCCTGTGCCTCAAGTA
promHAND1_R	CACTCTAGTCCGCCAGCAG

ANEXO 2

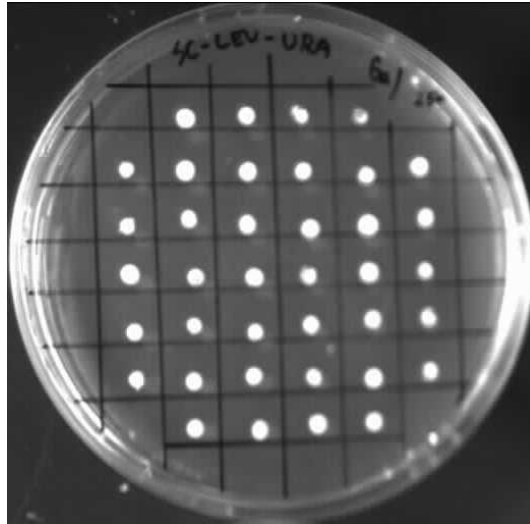
Ensayo doble híbrido en levaduras CDC25

1. Construir el vector pSOS con el gen de la proteína a utilizar como bait.
2. Transformar levaduras con pSOS/bait y con pSOS ev como control, plaquear en medio SC-LEU Glu a 25°C.
3. Crecer 3 colonias transformadas con el bait y una con ev en medio líquido.
4. Western blot, elegir la colonia que exprese mejor la proteína bait.
5. Transformar las levaduras seleccionadas con una librería clonada en el vector pMyr realizando los cálculos correspondientes para obtener 1.000.000 de transformantes, plaquear en medio SC-LEU-URA Glu a 25°C.
6. Replicar las colonias en placas SC-LEU-URA Gal e incubar a 37° (sistema de réplica con tela).
7. Repicar las colonias que van apareciendo en placas SC-LEU-URA Glu a 37°C de la siguiente manera para aumentar y aislar los clones positivos:



8. Plaquear las levaduras control (pSOS/MafB-pMyr/MafB, pSOS/Col-pMyr/MafB, pSOS/MafB-pMyr/ev, pSOS/ev-pMyr/ev) en SC-LEU-URA Glu a 25°C para crecerlas.

9. Poner todas las colonias positivas y los controles en una placa de 96 pocillos diluidas en 50µl de H₂O estéril y plaquear réplicas en 4 condiciones:
- SC-LEU-URA Glu a 25°C
 - SC-LEU-URA Glu a 37°C
 - SC-LEU-URA Gal a 25°C
 - SC-LEU-URA Gal a 37°C



10. Las colonias que crecen en SC-LEU-URA Gal a 37°C que no crecen en SC-LEU-URA Glu a 37°C (positivos) crecerlos en medio líquido.
11. Extraer los plásmidos.
12. Transformar bacterias con los plásmidos extraídos de las levaduras y plaquear en LB CAM, que selecciona las bacterias que incorporaron el plásmido pMyr.
13. Purificar los plásmidos de las bacterias por miniprep.
14. Transformar los distintos tipos de levaduras para confirmar la interacción:
- CDC25 plaquear en SC-URA
 - CDC25 pSOS ev plaquear en SC-LEU-URA
 - CDC25 pSOS/bait plaquear en SC-LEU-URA
15. Plaquear réplicas en 4 condiciones diferentes:
- SC-LEU-URA Glu a 25°C
 - SC-LEU-URA Glu a 37°C
 - SC-LEU-URA Gal a 25°C
 - SC-LEU-URA Gal a 37°C
16. Las colonias que crecen en SC-LEU-URA Gal a 37°C y que no crecen en SC-LEU-URA Glu a 37°C son las que presentan la interacción positiva.
17. Identificar los interactores de la proteína bait por secuenciación.

ANEXO 3

SDS-PAGE

- 150ml de acrilamida 30% (30:08) 45g de acrilamida + 1,2g de bisacrilamida
- Gel separador 10ml:

	6%	8%	10%
H ₂ O	5.3ml	4.6ml	4ml
Acrilamida 30%	2ml	2.7ml	3.3ml
Tris-HCl 1.5M pH=8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml
SDS 10%	100µl	100µl	100µl
PSA 10%	100µl	100µl	100µl
Temed	8µl	6µl	4µl

- Gel concentrador 5%, 3ml

H ₂ O	2.1ml
Acrilamida 30%	500µl
Tris-HCl 1M pH=6.8	380µl
SDS 10%	30µl
PSA 10%	30µl
Temed	3µl

- Buffer TGS 10X

Buffer TGS 10X	200ml	600ml
TRIS	6,04g	18,12g
Glicina	18,8g	56,4g
SDS	1g	3g

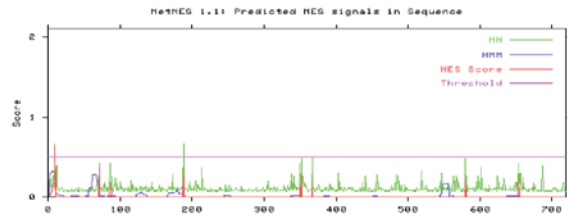
- Laemmli buffer 4X

Azul: Laemmli Buffer 4X	100ml
Tris-HCl pH=6.8, 3g en	50ml
Glicerol	40ml
SDS	5g
Azul de bromofenol	5mg
β-mercaptoetanol	10ml

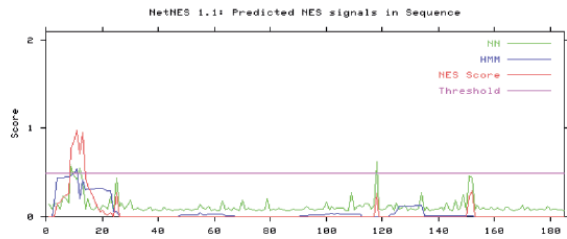
ANEXO 4

Análisis *in silico* de las proteínas BBS3-BBS16 mostrando las señales de exportación nuclear, NES.

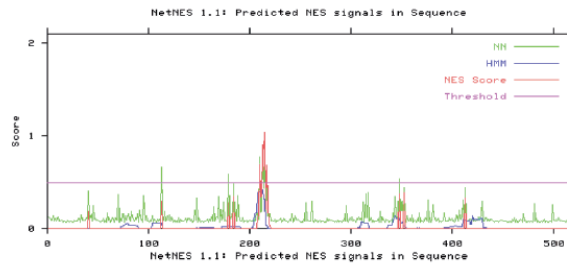
BBS2:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-9-K	0.090	0.317	0.114	-
	Sequence-10-L	0.654	0.320	0.636	Yes
	Sequence-11-R	0.107	0.037	0.000	-



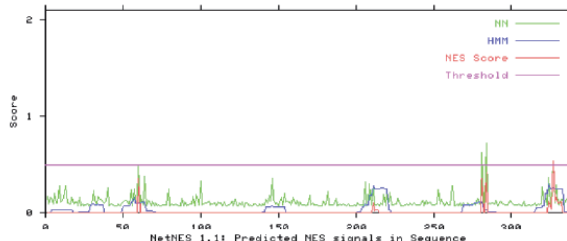
BBS3:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-8-S	0.163	0.459	0.261	-
	Sequence-9-V	0.570	0.464	0.759	Yes
	Sequence-10-L	0.462	0.495	0.854	Yes
	Sequence-11-L	0.428	0.543	0.969	Yes
	Sequence-12-G	0.558	0.203	0.704	Yes
	Sequence-13-L	0.411	0.414	0.955	Yes
	Sequence-14-K	0.092	0.311	0.438	-



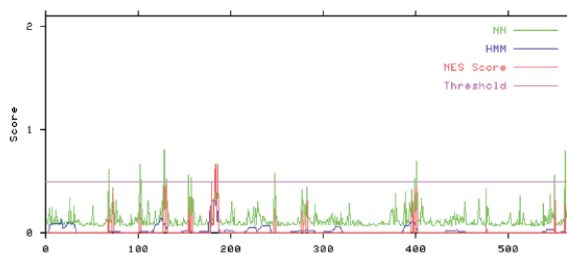
BBS4:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-209-G	0.097	0.388	0.135	-
	Sequence-210-L	0.775	0.401	0.695	Yes
	Sequence-211-L	0.180	0.418	0.332	-
	Sequence-212-Y	0.188	0.418	0.350	-
	Sequence-213-L	0.878	0.419	0.905	Yes
	Sequence-214-Q	0.431	0.318	0.861	Yes
	Sequence-215-L	0.906	0.319	1.041	Yes
	Sequence-216-G	0.077	0.041	0.209	-
	Sequence-217-I	0.522	0.041	0.688	Yes
	Sequence-218-Y	0.166	0.001	0.243	-



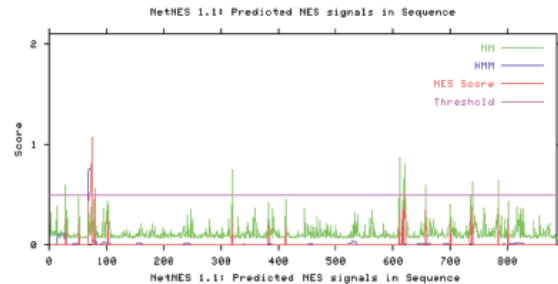
BBS5:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-326-K	0.109	0.252	0.036	-
	Sequence-327-L	0.537	0.254	0.538	Yes
	Sequence-328-K	0.100	0.249	0.117	-



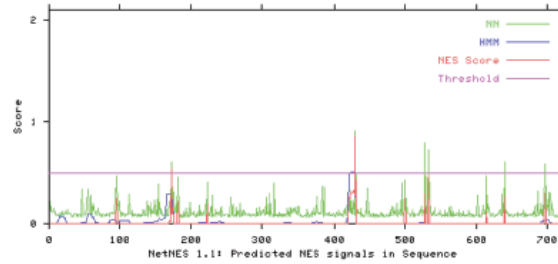
BBS6:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-182-F	0.092	0.303	0.082	-
	Sequence-183-L	0.568	0.305	0.587	Yes
	Sequence-184-L	0.460	0.306	0.666	Yes
	Sequence-185-T	0.124	0.206	0.108	-
	Sequence-186-I	0.659	0.206	0.638	Yes
	Sequence-187-P	0.098	0.004	0.029	-



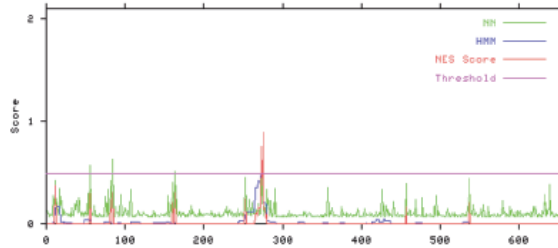
BBS9:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-69-L	0.092	0.743	0.449	-
	Sequence-70-L	0.321	0.756	0.509	Yes
	Sequence-71-E	0.123	0.756	0.519	Yes
	Sequence-72-V	0.153	0.759	0.537	Yes
	Sequence-73-D	0.104	0.759	0.541	Yes
	Sequence-74-L	0.660	0.769	1.073	Yes
	Sequence-75-R	0.130	0.043	0.000	-
	Sequence-619-R	0.115	0.007	0.000	-
	Sequence-620-L	0.801	0.007	0.501	Yes
	Sequence-621-Q	0.119	0.000	0.098	-



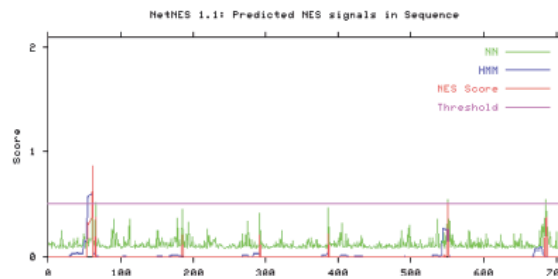
BBS10:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-171-E	0.092	0.289	0.021	-
	Sequence-172-L	0.602	0.289	0.538	Yes
	Sequence-173-L	0.129	0.242	0.101	-
	Sequence-429-D	0.084	0.509	0.272	-
	Sequence-430-L	0.914	0.509	0.849	Yes
	Sequence-431-N	0.071	0.005	0.000	-



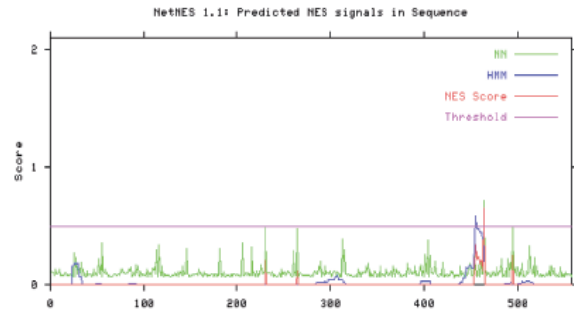
BBS11:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-272-E	0.101	0.417	0.161	-
	Sequence-273-L	0.441	0.551	0.756	Yes
	Sequence-274-T	0.201	0.549	0.377	-
	Sequence-275-L	0.638	0.558	0.887	Yes
	Sequence-276-Q	0.079	0.209	0.137	-



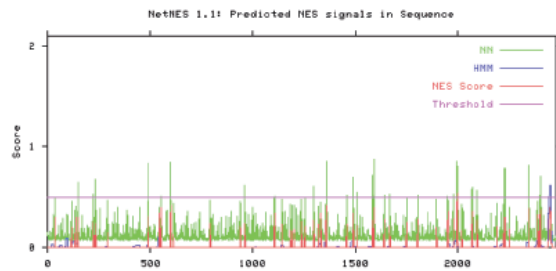
BBS12:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-61-D	0.173	0.590	0.373	-
	Sequence-62-L	0.559	0.590	0.865	Yes
	Sequence-63-T	0.071	0.027	0.000	-
	Sequence-551-H	0.074	0.244	0.011	-
	Sequence-552-I	0.530	0.244	0.509	Yes
	Sequence-553-L	0.156	0.021	0.000	-



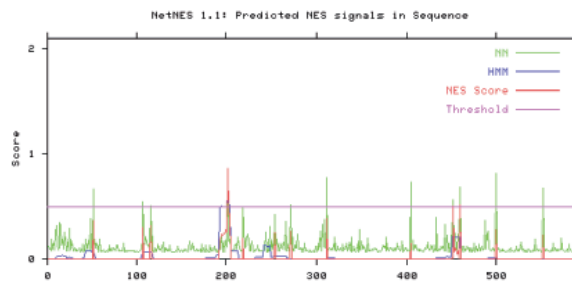
MKS1:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-463-R	0.089	0.374	0.117	-
	Sequence-464-I	0.709	0.376	0.658	Yes
	Sequence-465-P	0.076	0.002	0.000	-



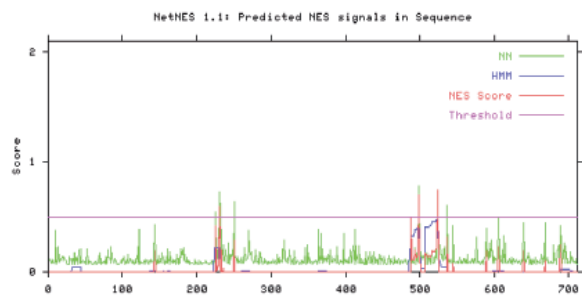
CEP290:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-1997-E	0.080	0.006	0.000	-
	Sequence-1998-N	0.801	0.006	0.539	Yes
	Sequence-1999-D	0.091	0.006	0.134	-



C2orf86:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-201-S	0.115	0.498	0.255	-
	Sequence-202-L	0.694	0.564	0.859	Yes
	Sequence-203-I	0.170	0.527	0.422	-
	Sequence-451-A	0.078	0.215	0.000	-
	Sequence-452-L	0.564	0.222	0.502	Yes
	Sequence-453-D	0.075	0.209	0.074	-
	Sequence-454-K	0.248	0.209	0.109	-
	Sequence-455-G	0.078	0.209	0.098	-
	Sequence-456-E	0.090	0.209	0.047	-
	Sequence-457-L	0.236	0.211	0.080	-
	Sequence-458-A	0.090	0.211	0.000	-
	Sequence-459-L	0.688	0.212	0.511	Yes
	Sequence-460-A	0.091	0.004	0.000	-

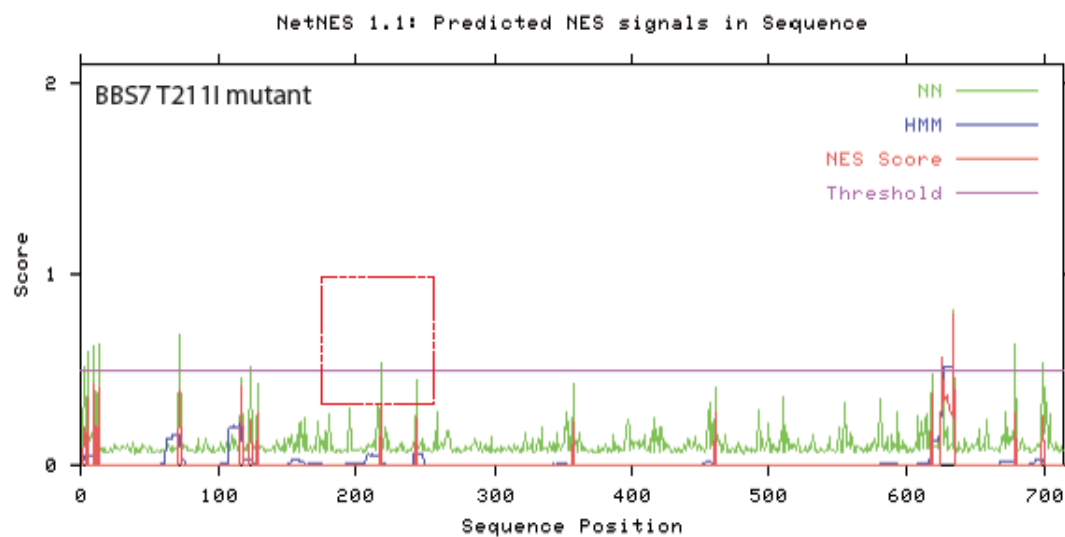
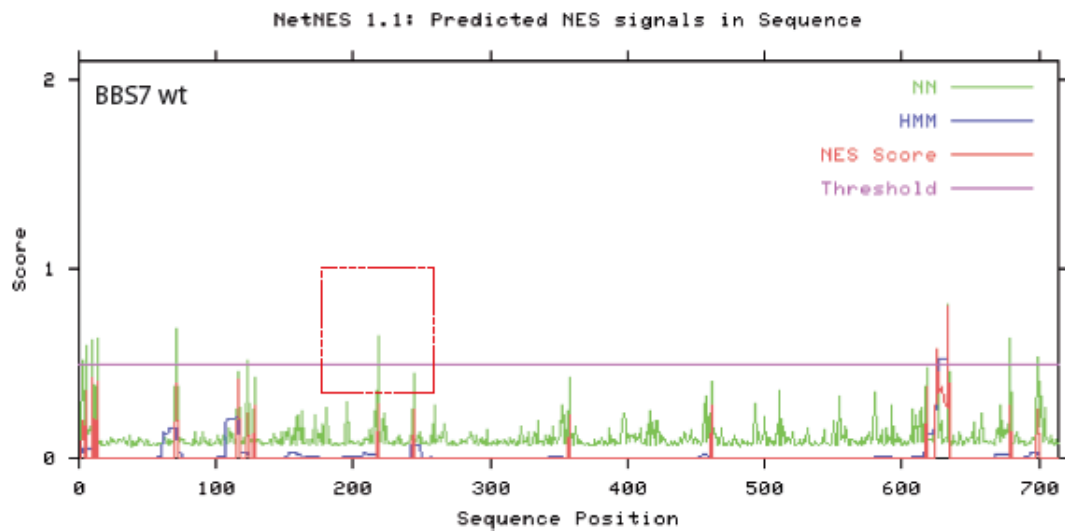


SDCCAG8:	Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
	Sequence-229-K	0.078	0.216	0.051	-
	Sequence-230-L	0.728	0.217	0.597	Yes
	Sequence-231-T	0.079	0.002	0.000	-
	Sequence-497-R	0.088	0.391	0.145	-
	Sequence-498-I	0.785	0.396	0.705	Yes
	Sequence-499-E	0.085	0.209	0.091	-
	Sequence-523-R	0.108	0.470	0.210	-
	Sequence-524-L	0.601	0.491	0.746	Yes
	Sequence-525-T	0.094	0.103	0.000	-



ANEXO 5

Análisis *in silico* de las proteínas BBS7 wt y BBS7 T211I mostrando una disminución en la señal de exportación nuclear (NES) correspondiente al pico centrado en el AA 218.



Cystic diseases of the kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms

Cecilia Gascue · Nicholas Katsanis · Jose L. Badano

Received: 3 August 2010 / Revised: 15 September 2010 / Accepted: 15 October 2010
© IPNA 2010

Abstract Ciliary dysfunction has emerged as a common factor underlying the pathogenesis of both syndromic and isolated kidney cystic disease, an observation that has contributed to the unification of human genetic disorders of the cilium, the ciliopathies. Such grouping is underscored by two major observations: the fact that genes encoding ciliary proteins can contribute causal and modifying mutations across several clinically discrete ciliopathies, and the emerging realization that an understanding of the clinical pathology of one ciliopathy can provide valuable insight into the pathomechanism of renal cyst formation elsewhere in the ciliopathy spectrum. In this review, we discuss and attempt to stratify the different lines of proposed cilia-driven mechanisms for cystogenesis, ranging from mechano- and chemo-sensation, to cell shape and polarization, to the transduction of a variety of signaling cascades. We evaluate both common trends and differences across the models and discuss how each proposed mechanism can contribute to the development of novel therapeutic paradigms.

Keywords Ciliopathies · Pleiotropic disorders · Disease modules · Paracrine signaling

C. Gascue · J. L. Badano
Institut Pasteur de Montevideo,
Mataojo 2020,
Montevideo, CP 11400, Uruguay

N. Katsanis (✉)
Center for Human Disease Modeling,
Duke University Medical Center,
Box 3709, Durham, NC 27710, USA
e-mail: katsanis@cellbio.duke.edu

Introduction

Cystic diseases of the kidney are a significant contributor to renal malformations and a common cause of end stage renal disease (ESRD). This classification encompasses a number of human disorders that range from conditions in which cyst formation is either the sole or the main clinical manifestation, to pleiotropic syndromes where cyst formation is but one of the observed pathologies, exhibits variable penetrance, and can sometimes be undetectable until later in life or upon necropsy (Table 1; [1]). Importantly, although the different cystic kidney disorders are clinically discrete entities, an extensive body of data fueled by a combination of mutation identification in humans and studies in animal models suggests a common thread, where virtually all known renal cystic disease-associated genes encode proteins necessary for aspects of ciliary function [2, 3]. Expanding from that observation, it is now becoming apparent that most—if not all—disorders of the cilium have a cystogenic component, which has in turn placed kidney cyst formation as a hallmark feature of the ciliopathies [4, 5].

Primary cilia, motile cilia, and flagella are evolutionary conserved organelles that extend from the apical plasma membrane. Although cilia and flagella do demonstrate underappreciated structural and architectural diversity across phyla and tissue types [6], their fundamental organization is rigorously conserved and defined by a microtubule core (axoneme) that is organized from a basal body, which is a structure composed of nine microtubule triplets derived from the mother centriole of the centrosome. Along this microtubule core, multiprotein complexes and molecular motors are organized for transporting, both in (anterograde) and out (retrograde) of the cilium, the different components needed for the formation, mainte-

Table 1 Cystic diseases of the kidney: their causal genes, encoded proteins, localization, and proposed function

Disease	Main features	Genes involved	Corresponding protein	Protein localization	Postulated functions
Autosomal recessive PKD (ARPKD)	Renal cyst, enlarged kidneys, hepatic fibrosis	<i>PKHD1</i>	Fibrocystin/polyductin (FPC)	Cilia and secreted	Calcium response; proliferation/differentiation
Autosomal dominant PKD (ADPKD)	Renal, hepatic, pancreatic and brain cysts	<i>PKD1, PKD2</i>	Polycystin 1 (PC1) Polycystin 2 (PC2)	Cilia, Golgi apparatus, focal adhesions	Calcium response; proliferation/differentiation
Nephronophthisis (NPHP) and Senior Løken Syndrome (SNLS)	Renal fibrosis, renal cysts, tubular atrophy, retinal dystrophy (in SNLS)	<i>NPHP1–NPHP11</i>	Nephrocystin-1, 2/inversin, 3, 4, 5, 6/CEP290, 7/GLIS2, 8/RPGRIP1L, 9/NEK8, 11/Meckelin	Cilia, basal bodies, centrosomes, focal adhesions.	Cell–cell and cell–matrix adhesion; actin cytoskeleton; cell division; Wnt and Shh signaling
Joubert syndrome (JS)	NPHP and cerebellar ataxia	<i>AH11, NPHP1, CEP290, JBTS6/TMEM67, RPGRIP1L, ARL13B, CC2D2A, INPP5E, JBTS2/TMEM216</i>	Joubertin, Nephrocystin, CEP290, Meckelin, RPGRIP1L, ARL13B, CC2D2A, INPP5E, TMEM216	Cilia, basal bodies, centrosomes, cell junctions	Ciliogenesis, Sonic Hedgehog signaling
Bardet–Biedl syndrome (BBS)	Renal cysts, obesity, polydactyly, retinal dystrophy, mental retardation	<i>BBS1–12, MKS1, CEP290, FRITZ, SDCCAG8</i>	BBS1–12, MKS1, CEP290, FRITZ, SDCCAG8	Centrosomes, basal bodies	Pericentriolar organization, ciliogenesis, Wnt signaling
Meckel–Gruber syndrome (MKS)	Occipital meningoencephalocele, cystic kidneys, liver fibrosis, polydactyly	<i>MKS1, MKS3/TMEM67, NPHP3, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A, MKS2/TMEM216</i>	MKS1, meckelin, nephrocystin 3, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A, TMEM216	Centrosomes, cilia, plasma membrane	Basal body localization, ciliogenesis, Hedgehog signaling
Oral–facial–digital syndrome 1 (OFD1)	Malformations of face, oral cavity and digits, renal cysts, polydactyly	<i>OFD1</i>	OFD1	Cilia, basal bodies, centrosomes, nucleus	Ciliogenesis, L-R asymmetry, possibly gene regulation
Short-Rib Polydactyly (incl. Jeune Asphyxiating Thoracic Dystrophy)	Renal cysts, shortened bones, polydactyly, situs inversus	<i>DYN2CH1, IFT80</i>	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain, IFT80	Chondrocyte cilia, basal bodies	Intraflagellar transport, Hedgehog signaling
Uromodulin-associated kidney diseases (MCKD2, FJHN, GCKD)	Renal cysts, fibrosis, hypertension, hyperuricemia,	<i>UMOD, MCKD1, MCKD2</i>	Uromodulin	Cilia, basal bodies, centrosomes, secreted	Unknown ciliary role

PKD, Polycystic kidney disease; MCKD2, medullary cystic kidney disease type 2; FJHN, familial juvenile hyperuricemic nephropathy; GCKD, glomerulocystic kidney disease

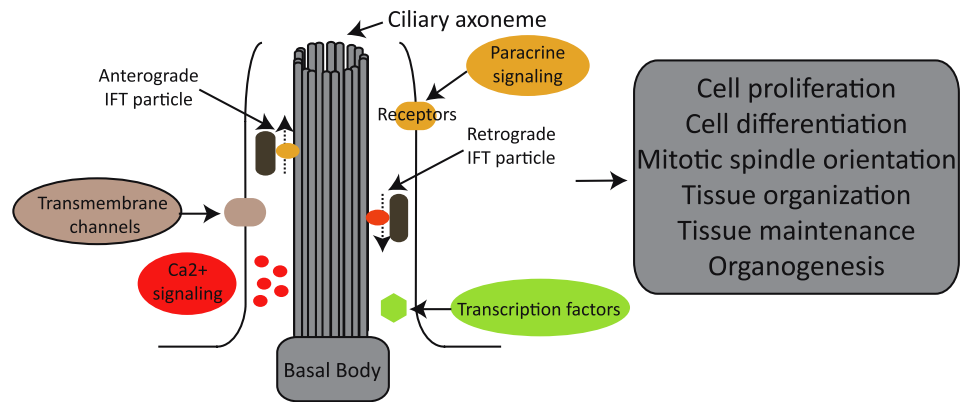
nance, and function of this complex organelle (Fig. 1). This process is known as intraflagellar transport (IFT) and was described originally in the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* (for extensive reviews on the topic see, for example [7, 8]). Given its key role in maintaining ciliary function, it is therefore not surprising that alterations in different components of the IFT machinery have been shown to cause the renal phenotype observed in different human conditions and animal models of kidney cystic disease [4, 5, 9].

A flurry of observations during the past decade have expanded our appreciation of cilia; transitioning from the classical models of motile cilia and their necessity for fluid movement or cellular propulsion, we now recognize that primary, sensory cilia are critical for cell–environment

interactions. Discoveries driven primarily by phenotypic observations in both invertebrates and vertebrates (including humans) have shown that primary cilia are important for mechano- and chemo-sensation as well as for the signal transduction of short- and long-range paracrine signals, such as Wnt, Sonic Hedgehog (Shh), and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) [9–13]. Moreover, a number of additional receptors have been localized to subsets of both sensory and motile cilia, suggesting that additional signaling mechanisms will likely be assigned to these organelles. For example, it has been shown that the somatostatin receptor type 3 (Sstr3) and the melanin-concentrating hormone receptor 1 (Mchr1) do localize to cilia in neurons, thus providing an important insight into the feeding behavioral defects and obesity that characterize a

Fig. 1 The cilium: basic structure and function. Cilia are formed by a microtubule core (axoneme) that is organized from a basal body. Along the axoneme, intraflagellar transport (IFT) particles are transported in (anterograde) and out (retrograde) of the cilium. The cilium concentrates and organizes a number of channels, receptors, and effectors, therefore playing a critical role in, for example, Ca^{2+} and paracrine signaling, ultimately regulating cellular, tissue, and organ homeostasis

Primary cilia: basic structure and function



number of ciliopathies [14]. Consequently, our deeper understanding of the complex nature of this organelle is contributing towards a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of ciliopathies, including the cystogenic process. In this review, we highlight how cilia have been linked to a number of renal cystic disorders and describe how our deeper understanding of the etiology of this group of disorders is impacting their genetic dissection. Finally, we discuss how such knowledge might help the development of successful therapeutic interventions, highlighted by some early successes and new possibilities.

Cystic diseases of the kidney and the link to primary cilia

Polycystic kidney disease

Polycystic kidney disease (PKD) is a heterogeneous group of disorders characterized by the abnormal proliferation and differentiation of epithelial cells in the kidney, resulting in the formation of fluid-filled cysts that can affect both the structure and function of the organ, often leading to ESRD [15]. PKD is divided in two major forms according to the pattern of inheritance and disease presentation. Autosomal dominant PKD (ADPKD) is the most common form of hereditary cystic kidney disease, with an estimated prevalence of between 1:400 and 1:1000 individuals irrespective of ethnicity, and is caused by mutations in *PKD1* and *PKD2*, which encode polycystin 1 (PC1) and 2 (PC2), respectively [16–18]. Autosomal recessive PKD (ARPKD) presents in early childhood, is characterized by liver fibrosis and renal cysts, and affects 1:20,000 live births; it is caused by mutations in *PKHD1*, encoding the protein polyductin or fibrocystin [19, 20].

The first links between the pathogenesis of PKD and ciliary dysfunction were provided by the observation that

lov-1, the closest *Caenorhabditis elegans* homolog of *PKD1*, localizes to primary cilia in sensory neurons in the nematode and by the characterization of the Oak Ridge polycystic kidney (*orpk*) mouse model of ARPKD, in which a hypomorphic mutation in *Tg737* results in bilateral polycystic kidneys and liver lesions [21, 22]. A key observation arose when *Tg737*, which encodes the protein termed polaris, was found to encode the mouse ortholog of the *Chlamydomonas* IFT88, a protein that localizes to both basal bodies and cilia and which is necessary for ciliogenesis [23, 24]. In agreement with a postulated causal role of defective ciliary function in the *tg737/Ift88* mutant, it was shown that both motile and primary cilia in *orpk* mice are shorter than normal. Furthermore, complete *Tg737/Ift88* nulls lack cilia and present with a lethal phenotype that includes defective establishment of the left–right axis of symmetry, neural tube defects, and growth arrest during embryogenesis [25]. Importantly, all of these defects have been associated with other ciliary mutants (for extensive reviews, see [4–6, 9]). The protein product of *PKHD1*, polyductin/fibrocystin, localizes to primary cilia and basal bodies and has been postulated to be a receptor mediating the differentiation of collecting duct cells [20, 26]. Furthermore, it has been shown that polyductin/fibrocystin physically interacts with PC2 and is able to regulate renal tubular formation by affecting PC2 expression and function [27, 28]. More recently, it has been shown that mutant *Pkhd1* mice present biliary duct cilia that are significantly shorter than those of the controls and that mutant animals present with liver and pancreatic cysts and renal tubular dilation [29].

The characterization of the proteins altered in ADPKD further support the central role of the cilium in the pathogenesis of PKD (reviewed in [30]). Briefly, PC1 is thought to be a G protein-coupled receptor (GPCR), while PC2 is a cation ion channel. These two proteins have been shown to interact, forming a Ca^{2+} channel that localizes to

the primary cilium in renal epithelial cells [31–36]. Importantly, the ciliary localization of the polycystins appears to be necessary for their proposed role in Ca^{2+} signaling in response to mechanical cues in the lumen of the renal tubules (see section on [Mechanosensation, shear stress and cystogenesis](#)).

Nephronophthisis and Joubert syndrome

Nephronophthisis (NPHP) (OMIM 256100) is characterized by corticomedullary cysts and interstitial fibrosis and is the most frequent cause of ESRD in children and young adults. To date, ten genes (*NPHP1–9*, *NPHP11/TMEM67*) have been shown to cause NPHP, while mutations in *XPNPEP3* cause an NPHP-like nephropathy ([37–39] and references within). Importantly, the characterization of the different NPHP proteins has been instrumental in developing the unifying theory of cystogenesis based on ciliary dysfunction. One of the first observations supporting this concept came from the characterization of nephrocystin 1 and inversin, the protein products of *NPHP1* and *NPHP2*, respectively, in which the two proteins were shown to interact and colocalize with β -tubulin at the primary cilium of renal epithelial cells [40]. In all studies carried out since, the characterizations of all NPHP-related proteins have further supported the critical role of the cilium in the pathogenesis of this condition, providing important insight into the role of this organelle during cystogenesis (reviewed in [38]). For example, studies on inversin have not only made significant contributions to a unified concept of the ciliary-driven cystogenic mechanisms, but they have also provided some of the early clues that have linked ciliary function with paracrine signaling and, in particular, with the transduction of canonical and non-canonical (planar cell polarity) Wnt signaling, pathways that are critical for renal development and maintenance (see the [Kidney morphogenesis/maintenance and cystogenesis: Wnt signaling](#) section). Likewise, the characterization of *NPHP7* implicated Shh signaling in the pathogenesis of cystic kidney disease, given that the gene encodes the transcription factor Gli-similar protein 2 (GLIS2) [41] (see the [Hedgehog signaling in the pathogenesis of cystic kidney disease](#) section).

A related disorder is Joubert syndrome (JS) (OMIM 213300), a recessive disease characterized by cerebellar vermis hypoplasia, hypotonia, mental retardation, irregular breathing, and eye movement abnormalities. In addition, JS patients might present additional clinical features, such as retinal dystrophy, cystic dysplasia, and nephronophthisis, encompassing what is known as Joubert syndrome and related disorders (JSRD). Nine genes have been causally linked to JS (*INPP5E*, *AH11*, *NPHP1*, *CEP290*, *TMEM67*, *RPGRIP1L*, *ARL13B*, *CC2D2A*, and *TMEM216*), all of which encode basal body/ciliary proteins ([42–44] and references within).

Bardet–Biedl and Meckel–Gruber syndromes

Ciliary dysfunction can also cause highly pleiotropic syndromes where cystic kidney disease is a characteristic feature. Bardet–Biedl syndrome (BBS) (OMIM 209900) is characterized by obesity, polydactyly, retinal degeneration, mental retardation, and renal malformations that include the formation of cysts [45]. A total of 16 BBS genes have been identified to date (*BBS1–12*, *MKS1*, *NPHP6/CEP290*, *FRITZ/C2ORF86*, *SDCCAG8*) ([46–49] and references within). Importantly, the vast majority of BBS proteins tested to date localize to centrosomes and basal bodies, while some have also been observed in the cilium and play a role during ciliogenesis [50–56].

At the severe end of the phenotypic spectrum of the cystic diseases of the kidney lies Meckel–Gruber syndrome (MKS) (OMIM 249000), a perinatal lethal condition characterized by occipital encephalocoele, hepatic fibrosis, polydactyly, cleft palate, neural tube defects, and kidney cysts [57]. To date, seven MKS genes (*MKS1*, *MKS3/TMEM67*, *CEP290*, *RPGRIP1L*, *MKS6/CC2D2A*, *NPHP3*, and *TMEM216/MKS2*) have been identified [44, 58–63]. It has been shown that *MKS1*, *MKS3/TMEM67*, *CEP290*, and *RPGRIP1L/MKS5* localize to the basal body of cilia [59, 64, 65]. *MKS1* and *MKS3/TMEM67* have been proposed to be important for correctly positioning the basal body underneath the cellular membrane—albeit this has been shown only in cell-based models—and are required for ciliogenesis both in vitro and in vivo [64, 66]. Also, mutations in *MKS6/CC2D2A* lead to the absence of cilia in fibroblasts from affected patients [62]. Interestingly, these observations in MKS, together with the lethality of the complete *Tg737* nulls described earlier, support the notion that the complete lack of these organelles is incompatible with life, an observation that is not surprising given the plethora of biological functions in which they participate and the ubiquitous presence of these organelles in the vast majority of cell types of the human body (for a list of ciliated cell types, see <http://www.bowserlab.org/primarycilia/ciliumpage2.htm>).

A common cellular defect and a shared genetic basis

As described above, defects in different genes affecting the same cellular organelle can result in a spectrum of human conditions that share, to a different degree, a given set of phenotypes. Consequently, the same or similar phenotypes can be caused by mutations in more than one gene. At the level of individual syndromes, this phenomenon is observed in the form of genetic heterogeneity, a characteristic of most ciliopathies (Table 1), and is usually considered to be a major contributor of inter-familial phenotypic variability. Interestingly, not only can different genes cause the

same phenotype, but mutations in different loci can also collaborate to modulate disease presentation. Importantly, several human disorders, including the ciliopathies, are also characterized by a significant intra-familial variability regarding disease presentation and progression. Although the impact of the environment and other stochastic factors cannot be ignored, oligogenicity and the interaction between different alleles are likely determinant factors of the final phenotypic outcome, thus further complicating our ability to predict disease presentation from genotype. In BBS, it has been demonstrated that although the disease segregates in the majority of families in a seemingly autosomal recessive fashion, in some cases mutations in more than one BBS gene, or second site modifiers, appear to collaborate to affect both the penetrance and expressivity of the disease [51, 67–69]. Furthermore, NPHP has also been found to behave as an oligogenic trait since mutations in more than one gene have been identified segregating in a given family [70].

Interestingly, the genetic interactions described above are not restricted to individual disorders but appear to span ciliopathies in general (Table 2). One example involves BBS and MKS, where it has been reported that mutations in *BBS2*, *BBS4*, and *BBS6* were found in MKS-like fetuses [71]. More recently, it has been shown that mutations in three MKS genes, *MKS1*, *MKS3/TMEM67*, and *CEP290* can either cause or modulate the severity of the BBS phenotype [47]. *CEP290* has not only been identified as a causal gene in MKS, but it has also been shown to cause NPHP (*NPHP6*), JS, and BBS ([47, 58, 65, 72, 73]; for other examples, see Table 2 and [9, 74]). Moreover, mutations in the ciliary gene *AH11*, which causes JS, can act as second site modifier to increase the risk of retinal degeneration in NPHP patients [75]. In addition, alleles in ciliary genes can have a modifier effect across a range of ciliopathies, further complicating the genetic dissection of this group of disorders. It was recently shown that a polymorphic A229T coding variant of *RPGRIP1L*, a gene mutated in MKS, is associated with photoreceptor loss and, hence, with the retinal phenotype in multiple ciliopathies [76].

Why can defects in a given gene result in more than one disease? In the case of BBS–MKS, important sources of insight have come from the *in vivo* analysis of the pathogenic effect of MKS mutations associated with BBS. Interestingly, it has been shown that these mutations are likely hypomorphs, whereas the mutations causing MKS are complete nulls [47]. Similarly, hypomorphic mutations in *MKS3/TMEM67* can cause an NPHP-like phenotype and have been reported in NPHP patients [39, 63]. Therefore, it is not only the mutated gene, but also the number of genes and the combination of mutant alleles that appears to determine the final phenotype and, thus, its “classification”

into one or other clinical entity. Importantly, dissecting these complex genetic interactions and evaluating the effect of the different mutant alleles that participate in them will likely be a necessary step towards generating accurate genotype–phenotype correlations that could be used for diagnostic and prognostic purposes in the clinic.

Cystogenic mechanisms

Primary cilia have been implicated in a number of biological processes that range from mechano- and chemo-sensation to the transduction of several paracrine signaling pathways. Therefore, the realization that ciliary dysfunction is intimately related to the pathogenesis of cystic kidney disease provides an entry point to understand the pathomechanisms underlying cyst formation. Driven by an improved understanding of the role(s) of cilia in the development and tissue maintenance, defects in several physiological processes have been put forth as plausible cystogenic candidates.

Mechanosensation, shear stress, and cystogenesis

Primary cilia can act as mechano-sensory structures, sensing shear stress and signaling into the interior of the cell to regulate proliferation and differentiation through Ca^{2+} (Fig. 2a). It has been shown that the bending of primary cilia by an extracellular fluid flow causes an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration through the activation of ion channels located on the axonemal membrane. The initial Ca^{2+} influx induces Ca^{2+} release from intracellular stores, and the signal is spread to adjacent cells through gap junctions [77]. Interestingly, PC1 and PC2, the proteins mutated in ADPKD, have been shown to heterodimerize and to be required in this process: the extracellular domain of PC1 has been postulated to sense mechanical forces, such as fluid flow, thus changing its

Table 2 Genetic interaction between cystic diseases of the kidney

Mutated gene	NPHP	MKS	JS	BBS	SLSN
<i>AH11</i>	✓		✓		
<i>NPHP1</i>	✓		✓		✓
<i>NPHP3</i>	✓	✓			
<i>NPHP4</i>	✓				✓
<i>NPHP5</i>	✓				✓
<i>NPHP6</i>	✓	✓	✓	✓	
<i>NPHP8</i>	✓	✓	✓		
<i>MKS1</i>		✓		✓	
<i>CC2D2A</i>		✓	✓		
<i>TMEM67</i>	✓	✓	✓	✓	
<i>TMEM216</i>		✓	✓		

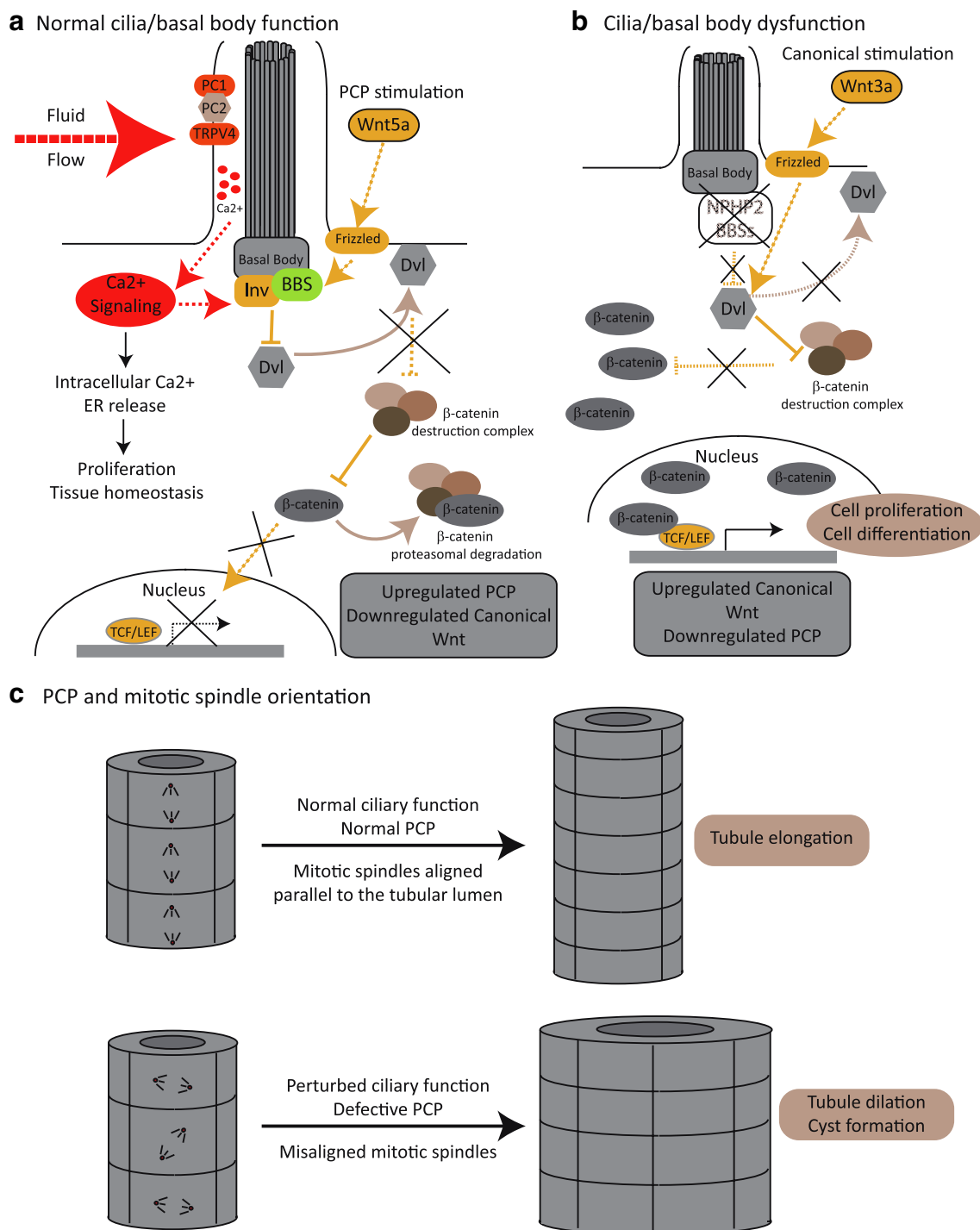


Fig. 2 Primary cilia: mechano-sensors and Wnt transducers. **a** PC1, PC2, and TRPV4 form a Ca²⁺ channel that localizes to the primary cilium and which upon a mechanical stimulus, such as fluid flow, initiate a Ca²⁺ signaling cascade that regulates cell proliferation. Functional cilia are also needed to maintain the tight balance between canonical and noncanonical [planar cell polarity (PCP)] Wnt signaling. In the presence of a functional cilium, and upon PCP stimulation and Ca²⁺ signaling, basal bodies proteins, such as the BBSs and inversin (*Inv*)/NPHP2, mediate the degradation and/or re-localization of Disheveled (*Dvl*) to the cellular membrane. In this scenario, *Dvl* is no longer able to suppress the β-catenin destruction complex, and β-catenin is therefore degraded by the proteasome and

is unable to act as a transcriptional activator. **b** When cilia and/or basal body function is compromised, canonical Wnt signals (for example, Wnt 3a) are not antagonized, *Dvl* is able to repress the β-catenin destruction complex, and β-catenin accumulates in the nucleus and drives the expression of TCF–LEF responsive genes. **c** The non-canonical PCP Wnt pathway is required for providing positional information to cells allowing the correct alignment of their mitotic spindles with respect to the lumen of the renal tubule. Upon ciliary dysfunction, the PCP signal is defective, and cell division orients randomly. Therefore, under normal ciliary function, cell division in the renal tubules results in tubular elongation, while ciliary dysfunction results in tubule dilation, facilitating cystogenesis

conformation to activate PC2 and, thereby, allowing for Ca^{2+} entry [13, 32, 35]. Importantly, cilia-mediated Ca^{2+} signaling is not restricted to the renal epithelium. In the embryonic node, the left–right axis of symmetry is established through the activity of a group of ciliated cells generating a leftward fluid flow (nodal flow) that is sensed and transduced into an asymmetric Ca^{2+} signal in a process that requires PC2 [78, 79]. The flow hypothesis also links fluid flow sensing with the regulation of cilia-dependent signal transduction, given that inversin is upregulated by fluid flow, leading to the down-regulation of the canonical Wnt signaling and the upregulation of the non-canonical planar cell polarity pathway, thus favoring cell differentiation over proliferation, a balance clearly lost during cystogenesis [80] (Fig. 2a; see following section). However, a model based exclusively on fluid flow cannot fully reconcile different lines of evidence from both in vitro and in vivo experiments.

PC2 interacts not only with PC1 but also with TRPV4 and TRPC1, where the association of PC2 with TRPV4 appears to be required to form a mechano- and thermo-sensitive channel [35, 81–83]. Depletion of TRPV4 in mice does not lead to cystic kidney disease although it does abolish flow-induced Ca^{2+} signaling in renal epithelial cells, suggesting that flow sensing might not be sufficient to fully explain cystogenesis [81]. Likewise, cilia-independent factors might also be important during cystogenesis. For example, trans-epithelial pressure can result in Ca^{2+} release independently from the presence of cilia in Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells [84]. Further levels of complexity regarding the physiology of the kidney and the role of the polycystins, both in normal tissue as well as during cystogenesis, has come from two independent studies demonstrating that cystogenesis is influenced significantly by the time of inactivation [85, 86]. Conditional mutants of *Ift88*, or of the anterograde IFT molecular motor protein Kif3A, in which the gene is ablated in adult animals, present with a mild cystic phenotype by 6 months after inactivation and progress to a more severe phenotype after 1 year. In contrast, ablation of these genes on embryonic day 17.5 (E17.5) results in cyst formation in the first 2 weeks of life [86]. Similarly, using a conditional *Pkd1* mouse model, it has been shown that inactivation of the gene before postnatal day 13 (P13) results in rapid progression of the disease, with animals showing severe cystic kidneys within 3 weeks. However, ablating *Pkd1* at P14 or later results in the formation of cysts only 5 months after the inactivation event [85]. Therefore, the renal tissue appears to have different requirements for the activity of the cilium during development and adulthood, and cilia-mediated sensing of fluid flow might not be the sole driver of cystogenesis [85, 86]. Interestingly, PC1 expression appears to accompany changes in proliferation rates in

young versus older kidneys, with high levels of PC1 observed at around E15.5, subsequently decreasing by 2 weeks after birth; these changes accompany the rapid growth, high tubulogenesis rate, and ongoing tissue morphogenesis characteristic of developing kidneys [87].

Kidney morphogenesis/maintenance and cystogenesis: Wnt signaling

The Wnt signaling pathway plays an important role regulating both the development and maintenance of the kidney. During organogenesis, activated Wnt signaling is required for the induction of the metanephric mesenchyme to develop the proximal portion of the nephron, regulating cell proliferation and differentiation [88–91]. The Wnts are secreted proteins which, upon binding to the Frizzled receptor, can activate different signaling cascades with different consequences for cell homeostasis. The final outcome depends largely on the specific Wnt molecule but also on the activity of Disheveled (Dvl), a protein that represses the degradation of β -catenin, the major effector of the canonical Wnt pathway.

It has been shown that the cellular localization of Dvl is a major factor in determining which Wnt cascade is activated. To activate the canonical pathway, Dvl represses the β -catenin destruction complex (composed of GSK3 β , axin, and APC), leading to the accumulation of nuclear β -catenin and allowing the expression of TCF–LEF1 responsive genes that control cell proliferation and differentiation [11, 92]. However, when Dvl is localized to the plasma membrane, it is no longer able to prevent β -catenin degradation, and noncanonical Wnt signaling pathways, particularly the planar cell polarity (PCP) pathway, can therefore be activated [11, 93]. PCP is required to provide positional information that allows cells to properly polarize, migrate, and orient themselves in the plane of the epithelium. Consequently, this signaling pathway plays an important role in maintaining the correct organization of tissues and organs [93].

NPHP2 encodes for the basal body protein inversin, which is mutated in the *inv/inv* mouse model of cystic kidney disease and has been shown to target Dvl for degradation [80, 94]. Therefore, in the absence of inversin, Dvl is free to repress the β -catenin destruction complex, thus leading to an upregulation of canonical Wnt signaling and also defective PCP [80]. Importantly, the different Wnt signaling cascades are tightly controlled and balanced between each other. Similarly, studies in BBS have shown that the depletion of different BBS proteins leads to defective PCP with the concomitant stabilization of β -catenin and thus upregulation of canonical signaling [95, 96], although in the context of that disorder, targeting of β -catenin to the proteasome has been proposed as a possible biochemical cause of this phenotype.

In a simplistic model, the canonical pathway can be visualized acting mostly in favor of cell proliferation, whereas the noncanonical cascades, and particularly PCP, appear to have the converse effect, leading to cell differentiation. During cystogenesis, there is a clear loss of balance between opposing, but non-equal forces. In this context, the presence of functional cilia appears to be necessary to suppress canonical Wnt signaling while favoring the PCP pathway (Fig. 2a). Mutations in *Kif3a* in both cells and mice lead to increased Wnt canonical signaling, while a kidney conditional mutation in *Pkd2* resulted in a cystic phenotype and upregulated β -catenin [95, 97, 98]. Transgenic mice in which an oncogenic form of β -catenin is over-expressed develop kidney cysts in all parts of the nephron [99]. Interestingly, in vitro experiments using kidney cells in a chamber showed that the expression of inversin is upregulated by fluid flow, whereas β -catenin levels were mildly decreased [80]. It has been speculated that the beginning of fluid flow during early embryogenesis might trigger a switch in Wnt signaling in the kidney that both terminates the pro-proliferation canonical pathway and favors the pro-differentiation PCP cascade, thereby allowing terminal differentiation of epithelial cells and the correct morphogenesis of the organ [91]. However, this view of cystogenesis being driven by over-activation of canonical Wnt signaling is likely a simplification. For example, it has been shown recently that midgestation embryos and mouse embryonic fibroblasts bearing mutations in different components of the IFT machinery retain normal canonical Wnt activity and the ability to switch to noncanonical signaling [100], perhaps intimating that the requirement for cilia-mediated processes likely changes at different time-points during development and adult life. Additional evidence supporting this notion has come from studies by Lancaster and colleagues in mice bearing homozygous null mutations in *Ahil*, a gene mutated in JS which encodes the protein Joubertin (Jbn). These authors showed that Jbn is a basal body/ciliary protein that regulates and promotes canonical Wnt signaling in the adult kidney by facilitating the nuclear translocation of β -catenin [101]. Furthermore, *Ahil*^{-/-} mice, which present with an NPHP-like phenotype, show impaired renal injury repair, a process that has been shown to trigger cystogenesis [102] and which relies on intact canonical Wnt signaling. Based on these data, the authors suggested that a tight regulation of Wnt signaling is needed for maintaining kidney homeostasis and the balance between proliferation and differentiation during tubular regeneration after injury. In this model, it is the loss of this fine regulation—rather than a simple over-activation of canonical Wnt signaling or a down-regulation of PCP—that leads to cyst formation [101].

In addition to misregulation of canonical Wnt signaling, the loss of PCP provides an attractive mechanistic explanation to cyst formation. During cell division, epithelial

cells in the renal tubules have been shown to orient their mitotic spindles parallel to the axis of the tubule; this arrangement is lost in different models of PKD, such as kidney-specific *HNF1 β* deficient mice and pck rats where *Pkhd1* is mutated. According to this model, under normal PCP signaling, the net result of cell division is tubular elongation, whereas ciliary dysfunction and aberrant PCP result in tubular dilation (Fig. 2c; [103]). Supporting the role of PCP in this phenomenon, mouse mutants for the PCP gene *Fat4* display neural tube defects and defective organization in the inner ear but also perturbed oriented cell divisions in the renal epithelium, resulting in dilated tubules and cystic kidney disease. Moreover, further perturbation of the pathway through the introduction of additional mutations in core PCP genes, such as *Vangl2* and *Fjx1*, resulted in a more severe presentation of the cystic phenotype [104].

More recently, it has been shown that homozygous mice for a hypomorphic allele of *Wnt9b*, which is required for PCP in the collecting ducts and proximal tubules of the kidney, present with perturbed PCP, random mitotic spindle orientation, and tubule dilation [105]. Interestingly, an analysis of the cell shape in the renal tubules revealed that normally these epithelial cells appear elongated in the axis perpendicular to the lumen, suggesting that they are subjected to organized cell migration, such as convergent and extension, which is yet another PCP-dependent process [93, 105, 106]. It has also been shown recently that whereas conditional inactivation of *Pkd1* or *Pkd2* in the kidney does affect oriented cell division in dilated but not in pre-cystic tubules, mutations in *Pkhd1* result in defective cell division orientation but no cyst formation. These data support the notion that although the loss of oriented cell division is altered during cyst formation, this event might not be sufficient or even required to initiate cystogenesis [107].

Hedgehog signaling in the pathogenesis of cystic kidney disease

Another important signaling pathway that has been shown to depend heavily on a functioning cilium is sonic hedgehog (Shh) (see [108–113]). Shh binds and inactivates the Patched 1 receptor (Ptc1), which in turn releases Smoothed (Smo), enabling it to block the processing of the transcription factor Gli3 into its repressor form GliR. Consequently, Shh binding enables Gli3-mediated gene regulation (reviewed in [114]). It has been shown that ciliary localization of different cascade components is required for the correct processing of Gli. Shh activation leads to the relocation of Smo into the cilium, and this is required for its activity [108, 109]. Ptc1 also localizes to the ciliary membrane and appears to inhibit Smo by impeding its accumulation in the ciliary compartment, and Gli1, Gli2, and Gli3 also localize to the cilium (Fig. 3; [110, 113]).

Shh signaling plays an important role during morphogenesis, patterning, and growth of different tissues and organs, and thus defects in this cascade can readily explain several phenotypes characteristic of the ciliopathies, such as neural tube defects, polydactyly, and craniofacial defects (for some reviews see [6, 9, 74, 115]). In addition, different lines of evidence are implicating Shh signaling to the cystic phenotype. For example, *ARL13b*, a gene mutated in JS, a ciliopathy characterized by brain malformations but also the formation of cysts in the kidney, among other features, was originally identified as a cystogenic zebrafish mutant, *scorpion* (*sco*) and was shown to play a role in ciliogenesis [43, 116, 117]. A null mutation in *Arl13b* has been reported in the mouse hennin (*hnn*) mutant, which presents defects in cilia structure and perturbed Shh signaling [118]. It has also recently been shown that *Mks1* is required for ciliogenesis and Shh signaling in the mouse [66], while the identification of *NPHP7* further supports the role of Shh in the etiology of cystic kidney disease since the gene encodes for the transcription factor Gli-similar protein 2 (GLIS2) [41].

Despite these associative observations, the role of Shh during cystogenesis is not well understood. Shh signaling, together with Wnt, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), and TGFβ, have been implicated in several morphogenetic processes, such as the epidermal to mesenchymal transition (EMT) ([119] and references therein). Notably, the kidney phenotype in, for example, NPHP and BBS is characterized by increased fibrosis, a feature that might be explained—at least in part—by deregulated EMT as a consequence of defective Shh signaling. Supporting this possibility, differential gene

expression analysis of NPHP7/Glis2 mutants shows an upregulation of genes favoring EMT [41].

Cell proliferation and cystic kidney disease

The formation of cysts is characterized by the deregulation of the balance between cell proliferation and differentiation, and cilia appear to play a role in maintaining this balance through sensing the extracellular milieu, responding to mechanical cues, and modulating different signaling cascades. In addition to Wnt and Shh, platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRα), a pathway intimately linked to cell cycle regulation, has also been shown to depend on the cilium (reviewed in [10]). Also, the cilium and different ciliary proteins appear to have an active role in cell cycle regulation. Cilia are postmitotic structures, and thus both ciliogenesis and ciliary disassembly are tightly regulated with cell division (reviewed in [120]). For example, mutations in *Nek1* and *Nek8/NPHP9*, members of the family of NIMA-related protein kinases postulated to coordinate ciliary function with the cell cycle, result in cystic kidney disease [121–123].

Importantly, several ciliary proteins appear to control cell proliferation, likely through cilia-independent mechanisms. While polaris is required for the formation and maintenance of cilia, it has also been demonstrated that this protein can remain associated with the centrosome throughout the cell cycle, even in the absence of cilia, and regulate the G1–S transition. Over-expression of polaris in non-ciliated cells leads to cell cycle arrest through a mechanism that involves the inhibition of Che1, which normally counteracts the activity of the negative cell cycle regulator retinoblastoma (Rb) [124]. As mentioned earlier, the polycystins also play an important role during cilia-mediated mechanosensation and Ca²⁺ signaling and can modulate cell proliferation and differentiation. In addition, PC1 is subjected to proteolytic cleavage, releasing its cytoplasmic C-terminal tail, which is then translocated into the nucleus to regulate gene transcription mediated by the signal transducer and activator of transcription protein 6 (STAT6), a process that is inhibited by mechanical stimuli and appears to be mis-regulated due to ciliary dysfunction [125, 126]. Also, PC1 can regulate the expression of p21, a tumor suppressor that inhibits cyclin-dependent kinases, leading to cell cycle arrest, whereas depletion of PC1 results in the acceleration of the G1–S transition, leading to increased cell proliferation [127, 128]. Additionally, it has also been shown that PC1 can regulate the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway, providing yet another mechanism by which to regulate cell proliferation and differentiation [129, 130]. Therefore, the polycystins represent a clear example of the complexity underlying the biological role(s) of the cilium and the proteins that compose it and highlight the

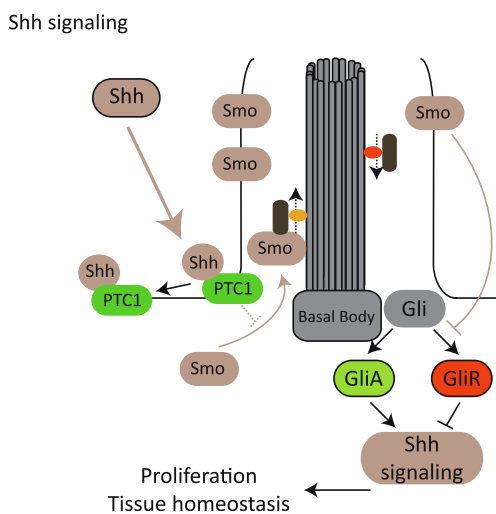


Fig. 3 Primary cilia and sonic hedgehog (*Shh*) transduction. Binding of Shh to Patched 1 receptor (*PTC1*) results in the re-localization of Smoothened (*Smo*) into the ciliary compartment, thus inhibiting the formation of GliR (repressor) and favoring the processing of Gli into GliA, the activator that drives the expression of different target genes

need for further work to fully understand their biological role(s) in the context of cystic kidney disease.

Although cilia are post-mitotic structures, it is not clear whether re-absorption of cilia precede cycling or whether it is a consequence of cells engaging in the cell cycle. To start understanding this issue, mutations that unlink the ciliary and mitotic spindle roles of a given ciliary protein will be extremely useful. One example of such mutations has recently been reported for BBS4, where a leucine to proline substitution at position 327 of BBS4 (L327P) leads to the mislocalization of BBS4 from the pericentriolar region in postmitotic cells while retaining the centriolar localization to the mitotic spindles of dividing cells. Interestingly, this mutant behaves as a dominant negative in an *in vivo* rescue assay, interfering with the correct transduction of the Wnt signaling pathway in a manner that is similar to the inhibition of wild-type BBS4, suggesting that its main effect is a consequence of its absence from the basal body of cilia in post-mitotic cells [131]. Further studies will be required to address the behavior of this type of mutant with regards to cell cycle regulation.

Concluding remarks

Remarkable progress has been made towards gaining an understanding of the genetic, cellular, and molecular basis of the ciliopathies/cystic diseases of the kidney. These data highlight the complexity of the cilium, an organelle that not only participates in multiple biological processes but also likely acts as a relaying center in which different signals and pathways are integrated to correctly process and interpret the different stimuli to which cells are subjected. In this context, it is not surprising that a single mechanism is likely not sufficient to explain the different types of disease presentation, progression, and outcome that characterize the different renal cystic disorders. However, and despite current limitations, this increased body of knowledge is already translating into different examples of successful therapeutic interventions in different animal models of cystic disease. For example, rapamycin, a drug that inhibits mTOR signaling, has been used to slow cyst progression and rescue renal function in different mouse, rat, and zebrafish models of cystic kidney disease [130, 132–134]. Furthermore, treatment with rapamycin for immune suppression after renal transplantation in ADPKD patients has shown promising results in reducing renal volume [130]. However, mTOR signaling is not only involved in cyst formation but is required for a number of biological processes and, therefore, its inhibition is likely to produce undesired secondary effects that need to be carefully evaluated (for an *in-depth* review on the topic, see [135]). In another example and due to the characteristic

misregulation in cell proliferation during cystogenesis, Bukanov and colleagues decided to test the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine in two animal models of PKD, the *jck* and the *cpk* mouse [136]. Importantly, administration of roscovitine does ameliorate the cystic phenotype in these animals as well as in zebrafish models [133, 136]. More recently, the Src inhibitor SKI-606 has also been used to treat renal cyst formation in mouse and rat models of ARPKD [137]. Despite these advances, however, the challenge ahead is to fully dissect the biological role(s) of cilia and ciliary proteins in the pathogenesis of the different phenotypes that characterize the ciliopathies, including but also extending beyond the kidney. Undoubtedly, this will be necessary to continue exploring novel therapeutic venues with an increasing level of efficacy and specificity.

Acknowledgments First of all we apologize to all those scientists whose contribution on ciliary biology and the process of cystogenesis could not be properly cited in this manuscript due to space limitations. JLB is supported by the Genzyme Renal Innovations Program (GRIP), JLB and CG by PEDECIBA and ANII–Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Programa de Apoyo Sectorial a la Estrategia Nacional de Innovación–INNOVA URUGUAY, DCI–ALA/2007/19.040, and NK by the National Institutes of Health grants HD04260, DK072301, and DK075972. NK is the George W. Brumley Professor.

References

1. Beales PL, Parfrey PS, Katsanis N (2004) The Bardet-Biedl and Alstrom Syndromes. In: Maher E, Saggarr-Malik A (eds) Genetics of renal disease. Oxford University Press, Oxford, pp 361–398
2. Hildebrandt F, Otto E (2005) Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nat Rev Genet* 6:928–940
3. Wainick T, Germino G (2003) From cilia to cyst. *Nat Genet* 34:355–356
4. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emergent class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:125–148
5. Fliegauf M, Benzing T, Omran H (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:880–893
6. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137:32–45
7. Pedersen LB, Rosenbaum JL (2008) Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr Top Dev Biol* 85:23–61
8. Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:813–825
9. Cardenas-Rodriguez M, Badano JL (2009) Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:263–280
10. Christensen ST, Pedersen SF, Satir P, Veland IR, Schneider L (2008) The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol* 85:261–301

11. Gerdes JM, Katsanis N (2008) Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr Top Dev Biol* 85:175–195
12. Haycraft CJ, Serra R (2008) Cilia involvement in patterning and maintenance of the skeleton. *Curr Top Dev Biol* 85:303–332
13. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33:129–137
14. Barbari NF, Lewis JS, Bishop GA, Askwith CC, Mykityn K (2008) Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4242–4246
15. Wilson PD (2004) Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350:151–164
16. Consortium TEPKD (1994) The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77:881–894
17. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos S, Veldhuisen B, Saris J, Renolds D, Cai Y, Gabow P, Pierides A, Kimberling W, Breuning M, Deltas C, Peters D, Somlo S (1996) PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272:1339–1342
18. Torres VE, Harris PC (2009) Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 76:149–168
19. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, Bergmann C, Senderek J, Esquivel E, Zeltner R, Rudnik-Schoneborn S, Mrug M, Sweeney W, Avner ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S, Germino GG (2002) PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* 70:1305–1317
20. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC (2002) The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30:259–269
21. Barr MM, Sternberg PW (1999) A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature* 401:386–389
22. Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, Schrick JJ, Avner ED, Sweeney WE, Godfrey VL, Cacheiro NL, Wilkinson JE, Woychik RP (1994) Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264:1329–1333
23. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG (2000) *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151:709–718
24. Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK (2001) Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 12:589–599
25. Murcia NS, Richards WG, Yoder BK, Mucenski ML, Dunlap JR, Woychik RP (2000) The Oak Ridge Polycystic Kidney (ork) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* 127:2347–2355
26. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashtiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 12:2703–2710
27. Kim I, Fu Y, Hui K, Moeckel G, Mai W, Li C, Liang D, Zhao P, Ma J, Chen XZ, George ALJ, Coffey RJ, Feng ZP, Wu G (2008) Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol* 19:455–468
28. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, Roberts KA, Zhou J (2007) Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol* 27:3241–3252
29. Woollard JR, Punyashtiti R, Richardson S, Masyuk TV, Whelan S, Huang BQ, Lager DJ, vanDeursen J, Torres VE, Gattone VH, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ (2007) A mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease with biliary duct and proximal tubule dilatation. *Kidney Int* 72:328–336
30. Zhou J (2009) Polycystins and primary cilia: primers for cell cycle progression. *Annu Rev Physiol* 71:83–113
31. Gonzalez-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaut MA, Cantiello HF (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1182–1187
32. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408:990–994
33. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in ORPK mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* 12:R378–R380
34. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG (1997) PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16:179–183
35. Tsiokas L, Kim E, Arnould T, Sukhatme VP, Walz G (1997) Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6965–6970
36. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM (2002) The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13:2508–2516
37. O'Toole JF, Liu Y, Davis EE, Westlake CJ, Attanasio M, Otto EA, Seelow D, Nurnberg G, Becker C, Nuutinen M, Kärrpää M, Ignatius J, Uusimaa J, Pakanen S, Jaakkola E, van den Heuvel LP, Fehrenbach H, Wiggins R, Goyal M, Zhou W, Wolf MT, Wise E, Helou J, Allen SJ, Murga-Zamalloa CA, Ashraf S, Chaki M, Heeringa S, Chernin G, Hoskins BE, Chaib H, Gleeson J, Kusakabe T, Suzuki T, Isaac RE, Quarmby LM, Tennant B, Fujioka H, Tuominen H, Hassinen I, Lohi H, van Houten JL, Rotig A, Sayer JA, Rolinski B, Freisinger P, Madhavan SM, Herzer M, Madignier F, Prokisch H, Nurnberg P, Jackson PK, Khanna H, Katsanis N, Hildebrandt F (2010) Individuals with mutations in *XPNPEP3*, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J Clin Invest* 120:791–802
38. Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E (2009) Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol* 20:23–35
39. Otto EA, Tory K, Attanasio M, Zhou W, Chaki M, Paruchuri Y, Wise EL, Utsch B, Wolf MT, Becker C, Nürnberg G, Nürnberg P, Nayir A, Saunier S, Antignac C, Hildebrandt F (2009) Hypomorphic mutations in Meckelin (*MKS3/TMEM67*) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J Med Genet* 46:663–670
40. Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F (2003) Mutations in *INVS* encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 34:413–420
41. Attanasio M, Uhlenhaut NH, Sousa VH, O'Toole JF, Otto E, Anlag K, Klugmann C, Treier AC, Helou J, Sayer JA, Seelow D,

- Nürnberg G, Becker C, Chudley AE, Nürnberg P, Hildebrandt F, Treier M (2007) Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis. *Nat Genet* 39:1018–1024
42. Edvardson S, Shaag A, Zenvirt S, Erlich Y, Hannon GJ, Shanske AL, Gomori JM, Ekstein J, Elpeleg O (2010) Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. *Am J Hum Genet* 86:93–97
 43. Parisi MA (2009) Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:326–340
 44. Valente EM, Logan CV, Mougou-Zerelli S, Lee JH, Silhavy JL, Brancati F, Iannicelli M, Travaglini L, Romani S, Illi B, Adams M, Szymanska K, Mazzotta A, Lee JE, Tolentino JC, Swistun D, Salpietro CD, Fede C, Gabriel S, Russ C, Cibulskis K, Sougnez C, Hildebrandt F, Otto EA, Held S, Diplas BH, Davis EE, Mikula M, Strom CM, Ben-Zeev B, Lev D, Sagie TL, Michelson M, Yaron Y, Krause A, Boltshauser E, Elkhartoufi N, Roume J, Shalev S, Munnich A, Saunier S, Inglehearn C, Saad A, Alkindy A, Thomas S, Vekemans M, Dallapiccola B, Katsanis N, Johnson CA, Attié-Bitach T, Gleeson JG (2010) Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nat Genet* 42:619–625
 45. Zaghoul NA, Katsanis N (2009) Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119:428–437
 46. Kim SK, Shindo A, Park TJ, Oh EC, Ghosh S, Gray RS, Lewis RA, Johnson CA, Attie-Bittach T, Katsanis N, Wallingford JB (2010) Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* 329:1337–1340
 47. Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfarhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40:443–448
 48. Otto EA, Hurd TW, Airik R, Chaki M, Zhou W, Stoetzel C, Patil SB, Levy S, Ghosh AK, Murga-Zamalloa CA, van Reeuwijk J, Letteboer SJF, Sang L, Giles RH, Liu Q, Coene KLM, Estrada-Cuzcano A, Collin RWJ, McLaughlin HM, Held S, Kasanuki JM, Ramaswami G, Conte J, Lopez I, Washburn J, MacDonald J, Hu J, Yamashita Y, Maher ER, Guay-Woodford L, Neumann HPH, Obermüller N, Koenekoop RK, Bergmann C, Bei X, Lewis RA, Katsanis N, Lopes V, Williams DS, Lyons RH, Dang CV, Brito DA, Bettencourt Dias M, Zhang X, Cavalcoli JD, Nürnberg G, Nürnberg P, Pierce EA, Jackson P, Antignac C, Saunier S, Roepman R, Dollfus H, Khanna H, Hildebrandt F (2010) Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat Genet* 42:840–850
 49. Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghoul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravet TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2007) Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1–11
 50. Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628–633
 51. Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, May-Simera H, Lawson S, Lewis RA, Beales PL, Dietz HC, Fisher S, Katsanis N (2006) Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439:326–330
 52. Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, Moore SJ, Badano JL, May-Simera H, Compton DS, Green JS, Lewis RA, van Haelst MM, Parfrey PS, Baillie DL, Beales PL, Katsanis N, Davidson WS, Leroux MR (2004) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 36:989–993
 53. Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462–470
 54. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N, Dutcher SK (2004) Comparative genomic identification of conserved flagellar and basal body proteins that includes a novel gene for Bardet-Biedl syndrome. *Cell* 117:541–552
 55. Loktev AV, Zhang Q, Beck JS, Searby CC, Scheetz TE, Bazan JF, Slusarski DC, Sheffield VC, Jackson PK, Nachury MV (2008) A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell* 15:854–865
 56. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, Slusarski DC, Scheller RH, Bazan JF, Sheffield VC, Jackson PK (2007) A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129:1201–1213
 57. Alexiev BA, Lin X, Sun CC, Brenner DS (2006) Meckel-Gruber syndrome: pathologic manifestations, minimal diagnostic criteria, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 130:1236–1238
 58. Baala L, Audollent S, Martinovic J, Ozilou C, Babron MC, Sivanandamoorthy S, Saunier S, Salomon R, Gonzales M, Rattenberry E, Esculpavit C, Toutain A, Moraine C, Parent P, Marcorelles P, Dauge MC, Roume J, Le Merrer M, Meiner V, Meir K, Menez F, Beaufrière AM, Francannet C, Tantau J, Sinico M, Dumez Y, MacDonald F, Munnich A, Lyonnet S, Gubler MC, Génin E, Johnson CA, Vekemans M, Encha-Razavi F, Attié-Bitach T (2007) Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 81:170–179
 59. Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, Golzio C, Lacoste T, Besse L, Ozilou C, Moutkine I, Hellman NE, Anselme I, Silbermann F, Vesque C, Gerhardt C, Rattenberry E, Wolf MT, Gubler MC, Martinovic J, Encha-Razavi F, Boddaert N, Gonzales M, Macher MA, Nivet H, Champion G, Berthélémy JP, Niaudet P, McDonald F, Hildebrandt F, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Rüther U, Schneider-Maunoury S, Attié-Bitach T, Saunier S (2007) The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet* 39:875–881
 60. Kytälä M, Tallila J, Salonen R, Kopra O, Kohlschmidt N, Paavola-Sakki P, Peltonen L, Kestilä M (2006) MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat Genet* 38:155–157
 61. Smith UM, Consugar M, Tee LJ, McKee BM, Maina EN, Whelan S, Morgan NV, Goranson E, Gissen P, Lillquist S, Aligianis IA, Ward CJ, Pasha S, Punyashthiti R, Malik Sharif S, Batman PA, Bennett CP, Woods CG, McKeown C, Bucourt M, Miller CA, Cox P, Algazali L, Trembath RC, Torres VE, Attie-Bitach T, Kelly DA, Maher ER, VHN G, Harris PC, Johnson CA (2006) The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet* 38:191–196
 62. Tallila J, Jakkula E, Peltonen L, Salonen R, Kestilä M (2008) Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an

- important piece to the ciliopathy puzzle. *Am J Hum Genet* 82:1361–1367
63. Bergmann C, Fliegauf M, Brühlle NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, Schermer B, Schmieding I, Kispert A, Kränzlin B, Nürnberg G, Becker C, Grimm T, Girschick G, Lynch SA, Kelehan P, Senderek J, Neuhaus TJ, Stallmach T, Zentgraf H, Nürnberg P, Gretz N, Lo C, Lienkamp S, Schäfer T, Walz G, Benzing T, Zerres K, Omran H (2008) Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet* 82:959–970
 64. Dawe HR, Smith UM, Cullinane AR, Gerrelli D, Cox P, Badano JL, Blair-Reid S, Sriram N, Katsanis N, Attie-Bitach T, Afford SC, Copp AJ, Kelly DA, Gull K, Johnson CA (2007) The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet* 16:173–186
 65. Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nürnberg G, Kennedy MA, Becker C, Hennies HC, Helou J, Attanasio M, Fausett BV, Utsch B, Khanna H, Liu Y, Drummond I, Kawakami I, Kusakabe T, Tsuda M, Ma L, Lee H, Larson RG, Allen SJ, Wilkinson CJ, Nigg EA, Shou C, Lillo C, Williams DS, Hoppe B, Kemper MJ, Neuhaus T, Parisi MA, Glass IA, Petry M, Kispert A, Gloy J, Ganner A, Walz G, Zhu X, Goldman D, Nürnberg P, Swaroop A, Leroux MR, Hildebrandt F (2006) The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* 38:674–681
 66. Weatherbee SD, Niswander LA, Anderson KV (2009) A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 18:4565–4575
 67. Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellani C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N (2003) Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12:1651–1659
 68. Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187–1199
 69. Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256–2259
 70. Hoefele J, Wolf MT, O'Toole JF, Otto EA, Schultheiss U, Déschenes G, Attanasio M, Utsch B, Antignac C, Hildebrandt F (2007) Evidence of oligogenic inheritance in nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol* 18:2789–2795
 71. Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, Brahimi N, Etchevers H, Detrait E, Esculpavit C, Audollent S, Goudefroye G, Gonzales M, Tantau J, Loget P, Joubert M, Gaillard D, Jeanne-Pasquier C, Delezoide AL, Peter MO, Plessis G, Simon-Bouy B, Dollfus H, Le Merrer M, Munnich A, Encha-Razavi F, Vekemans M, Attie-Bitach T (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 76:493–504
 72. Frank V, den Hollander A, Brühlle NO, Zonneveld MN, Nürnberg G, Becker C, Du Bois G, Kendziorra H, Roosing S, Senderek J, Nürnberg P, Cremers FP, Zerres K, Bergmann C (2008) Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum Mutat* 29:45–52
 73. Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Group IISRDS, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG (2006) Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet* 38:623–625
 74. Sharma N, Berbari NF, Yoder BK (2008) Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases. *Curr Top Dev Biol* 85:371–427
 75. Louie CM, Caridi G, Lopes VS, Brancati F, Kispert A, Lancaster MA, Schlossman AM, Otto EA, Leitges M, Gröne HJ, Lopez I, Gudiseva HV, O'Toole JF, Vallespin E, Ayyagari R, Ayuso C, Cremers FP, den Hollander AI, Koenekeop RK, Dallapiccola B, Ghiggeri GM, Hildebrandt F, Valente EM, Williams DS, Gleeson JG (2010) AHI1 is required for photoreceptor outer segment development and is a modifier for retinal degeneration in nephronophthisis. *Nat Genet* 42:175–180
 76. Khanna H, Davis EE, Murga-Zamalloa CA, Estrada-Cuzcano A, Lopez I, den Hollander A, Zonneveld MN, Othman MI, Waseem N, Chakarova CF, Maubaret C, Diaz-Font A, Macdonald I, Muzny DM, Wheeler DA, Morgan M, Lewis LR, Logan CV, Tan PL, Beer MA, Inglehearn CF, Lewis RA, Jacobson SG, Bergmann C, Beales PL, Attie-Bitach T, Johnson CA, Otto EA, Bhattacharya SS, Hildebrandt F, Gibbs RA, Koenekeop RK, Swaroop A, Katsanis N (2009) A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet* 41:739–745
 77. Praetorius HA, Spring KR (2001) Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* 184:71–79
 78. McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003) Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114:61–73
 79. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95:829–837
 80. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Kronig C, Schermer B, Benzing T, Cabello OA, Jenny A, Mlodzik M, Polok B, Driever W, Obara T, Walz G (2005) Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signalling pathways. *Nat Genet* 37:537–543
 81. Kottgen M, Buchholz B, Garcia-Gonzalez MA, Kotsis F, Fu X, Doerken M, Boehlke C, Steffl D, Tauber R, Wegierski T, Nitschke R, Suzuki M, Kramer-Zucker A, Germino GG, Watnick T, Prenen J, Nilius B, Kuehn EW, Walz G (2008) TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J Cell Biol* 182:437–447
 82. Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP (1999) Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3934–3939
 83. Zhang P, Luo Y, Chasan B, Gonzalez-Perrett S, Montalbetti N, Timpanaro GA, Cantero Mdel R, Ramos AJ, Goldmann WH, Zhou J, Cantiello HF (2009) The multimeric structure of polycystin-2 (TRPP2): structural-functional correlates of homo- and hetero-multimers with TRPC1. *Hum Mol Genet* 18:1238–1251
 84. Praetorius HA, Frøkiaer J, Leipziger J (2005) Transepithelial pressure pulses induce nucleotide release in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F133–F141
 85. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG (2007) A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med* 13:1490–1495
 86. Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, Croyle MJ, van Groen T, Wyss JM, Nagy TR, Kesterson RA, Yoder BK (2007) Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 17:1586–1594

87. Geng L, Segal Y, Pavlova A, Barros EJ, Löhning C, Lu W, Nigam SK, Frischauf AM, Reeders ST, Zhou J (1997) Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol* 272:F451–F459
88. Bacallao RL, McNeill H (2009) Cystic kidney diseases and planar cell polarity signaling. *Clin Genet* 75:107–117
89. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781–810
90. McNeill H (2009) Planar cell polarity and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 20:2104–2111
91. Simons M, Walz G (2006) Polycystic kidney disease: cell division without a c(1)ue? *Kidney Int* 70:854–864
92. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22:2308–2341
93. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367–377
94. Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H, Hirokawa N (1999) Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice. *Mol Cell* 4:459–468
95. Gerdes JM, Liu Y, Zaghoul NA, Leitch CC, Lawson SS, Kato M, Beachy PA, Beales PL, DeMartino GN, Fisher S, Badano JL, Katsanis N (2007) Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39:1350–1360
96. Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135–1140
97. Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gaulden J, Singla V, Chen MH, Chuang PT, Reiter JF (2008) Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* 10:70–76
98. Kim I, Ding T, Fu Y, Li C, Cui L, Li A, Lian P, Liang D, Wang DW, Guo C, Ma J, Zhao P, Coffey RJ, Zhan Q, Wu G (2009) Conditional mutation of *Pkd2* causes cystogenesis and upregulates beta-catenin. *J Am Soc Nephrol* 20:2556–2569
99. Saadi-Kheddouci S, Berrebi D, Romagnolo B, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Kahn A, Vandewalle A, Perret C (2001) Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene* 20:5972–5981
100. Ocbina PJ, Tuson M, Anderson KV (2009) Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* 4:e6839
101. Lancaster MA, Louie CM, Silhavy JL, Sintasath L, Decambre M, Nigam SK, Willert K, Gleeson JG (2009) Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nat Med* 15:1046–1054
102. Patel V, Li L, Cobo-Stark P, Shao X, Somlo S, Lin F, Igarashi P (2008) Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet* 17:1578–1590
103. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, Yaniv M, Pontoglio M (2006) Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38:21–23
104. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, Quaggin SE, Harrison R, Mount R, McNeill H (2008) Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet* 40:1010–1015
105. Karner CM, Chirumamilla R, Aoki S, Igarashi P, Wallingford JB, Carroll TJ (2009) Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat Genet* 41:793–799
106. Solnica-Krezel L (2005) Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol* 15:R213–R228
107. Nishio S, Tian X, Gallagher AR, Yu Z, Patel V, Igarashi P, Somlo S (2010) Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation. *J Am Soc Nephrol* 21:295–302
108. Aanstad P, Santos N, Corbit KC, Scherz PJ, Trinh LA, Salvenmoser W, Huisken J, Reiter JF, Stainier DY (2009) The extracellular domain of smoothed regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol* 19:1034–1039
109. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437:1018–1021
110. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1:e53
111. Huangfu D, Liu A, Rakeem AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426:83–87
112. Ko HW, Norman RX, Tran J, Fuller KP, Fukuda M, Eggenschwiler JT (2010) Broad-minded links cell cycle-related kinase to cilia assembly and hedgehog signal transduction. *Dev Cell* 18:237–247
113. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317:372–376
114. Varjosalo M, Taipale J (2008) Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* 22:2454–2472
115. Quinlan RJ, Tobin JL, Beales PL (2008) Modeling ciliopathies: primary cilia in development and disease. *Curr Top Dev Biol* 84:249–310
116. Cantagrel V, Silhavy JL, Bielas SL, Swistun D, Marsh SE, Bertrand JY, Audollent S, Attié-Bitach T, Holden KR, Dobyns WB, Traver D, Al-Gazali L, Ali BR, Lindner TH, Caspary T, Otto EA, Hildebrandt F, Glass IA, Logan CV, Johnson CA, Bennett C, Brancati F, Group IJSRDS, Valente EM, Woods CG, Gleeson JG (2008) Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 83:170–179
117. Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, Cole DG, Miller MS, Hopkins N (2004) A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* 131:4085–4093
118. Caspary T, Larkins CE, Anderson KV (2007) The graded response to sonic hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* 12:767–778
119. Katoh Y, Katoh M (2008) Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med* 22:271–275
120. Santos N, Reiter JF (2008) Building it up and taking it down: the regulation of vertebrate ciliogenesis. *Dev Dyn* 237:1972–1981
121. Liu S, Lu W, Obara T, Kuida S, Lehoczyk J, Dewar K, Drummond IA, Beier DR (2002) A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 129:5839–5846
122. Upadhya P, Birkenmeier EH, Birkenmeier CS, Barker JE (2000) Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:217–221
123. Otto EA, Trapp ML, Schultheiss UT, Helou J, Quarmby LM, Hildebrandt F (2008) NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol* 19:587–592
124. Robert A, Margall-Ducos G, Guidotti JE, Brégerie O, Celati C, Bréchet C, Desdouets C (2007) The intraflagellar transport

- component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J Cell Sci* 120:628–637
125. Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hiesberger T, Igarashi P, Bennett AM, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Somlo S, Caplan MJ (2004) Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* 114:1433–1443
 126. Low SH, Vasanth S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, Kane ME, Obara T, Weimbs T (2006) Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell* 10:57–69
 127. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG (2002) PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109:157–168
 128. Kim H, Bae Y, Jeong W, Ahn C, Kang S (2004) Depletion of PKD1 by an antisense oligodeoxynucleotide induces premature G1/S-phase transition. *Eur J Hum Genet* 12:433–440
 129. Lieberthal W, Levine JS (2009) The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 20:2493–2502
 130. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG, Weimbs T (2006) The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5466–5471
 131. Zaghoul NA, Liu Y, Gerdes JM, Gascue C, Oh EC, Leitch CC, Bromberg Y, Binkley J, Leibel RL, Sidow A, Badano JL, Katsanis N (2010) Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10602–10607
 132. Tao Y, Kim J, Schrier RW, Edelstein CL (2005) Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16:46–51
 133. Tobin JL, Beales PL (2008) Restoration of renal function in zebrafish models of ciliopathies. *Pediatr Nephrol* 23:2095–2099
 134. Wahl PR, Serra AL, Le Hir M, Molle KD, Hall MN, Wüthrich RP (2006) Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 21:598–604
 135. Torres VE, Boletta A, Chapman A, Gattone V, Pei Y, Qian Q, Wallace DP, Weimbs T, Wüthrich RP (2010) Prospects for mTOR inhibitor use in patients with polycystic kidney disease and hamartomatous diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:1312–1329
 136. Bukanov NO, Smith LA, Klinger KW, Ledbetter SR, Ibraghimov-Beskrovnaya O (2006) Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 444:949–952
 137. Sweeney WEJ, von Vigier RO, Frost P, Avner ED (2008) Src inhibition ameliorates polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 19:1331–1341

Epistasis between *RET* and *BBS* mutations modulates enteric innervation and causes syndromic Hirschsprung disease

Loïc de Pontual^{a,1}, Norann A. Zaghoul^{b,1}, Sophie Thomas^{a,1}, Erica E. Davis^b, David M. Mcgaughey^b, Hélène Dollfus^c, Clarisse Baumann^d, Seneca L. Bessling^b, Candice Babarit^a, Anna Pelet^a, Cecilia Gascue^e, Philip Beales^f, Arnold Munnich^{a,f,g}, Stanislas Lyonnet^{a,f,g}, Heather Etchevers^a, Tania Attie-Bitach^{a,g}, Jose L. Badano^e, Andrew S. McCallion^{b,h}, Nicholas Katsanis^{b,i,j,k,2}, and Jeanne Amiel^{a,f,2}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U781, 6 Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants-Malades, AP-HP, 75743 Paris, France; ^bFacult e de M edicine, Université Paris Descartes, 75270 Paris, France; ^cMcKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, ^dDepartment of Molecular and Comparative Pathology, ^eDepartment of Molecular Biology and Genetics, and ^fWilmer Eye Institute, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205; ^gService de Génétique Médicale, Hôpital de Haute-Pierre, F-67098 Strasbourg, France; ^hService de Génétique Médicale, Hôpital Robert Debr e, 75935 Paris, France; ⁱInstitut Pasteur de Montevideo, CP11400 Montevideo, Uruguay; ^jMolecular Medicine Unit, Institute of Child Health, University College London, London WC1N 1EH, United Kingdom; and ^kCenter for Human Disease Modeling, Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27708

Edited by Jeremy Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, and approved June 19, 2009 (received for review February 3, 2009)

Hirschsprung disease (HSCR) is a common, multigenic neurocristopathy characterized by incomplete innervation along a variable length of the gut. The pivotal gene in isolated HSCR cases, either sporadic or familial, is *RET*. HSCR also presents in various syndromes, including Shah-Waardenburg syndrome (WS), Down (DS), and Bardet-Biedl (BBS). Here, we report 3 families with BBS and HSCR with concomitant mutations in BBS genes and regulatory *RET* elements, whose functionality is tested in physiologically relevant assays. Our data suggest that BBS mutations can potentiate HSCR predisposing *RET* alleles, which by themselves are insufficient to cause disease. We also demonstrate that these genes interact genetically in vivo to modulate gut innervation, and that this interaction likely occurs through complementary, yet independent, pathways that converge on the same biological process.

Bardet-Biedl | neural crest cells | genetic interaction | zebrafish

Hirschsprung disease (HSCR, MIM 164761) is the most common (1/5,000 live births) form of structural intestinal obstruction. It is defined by the absence of neural crest (NC)-derived enteric ganglia along a variable length of the bowel, invariably involving the recto-anal junction. This phenotype has been attributed to defects in migration, proliferation, and/or survival of the NC cells (NCC) that normally give rise to all neurons and supporting cells of the enteric nervous system (ENS), defining HSCR as a neurocristopathy. HSCR is also a useful model oligogenic disorder; it displays non-Mendelian modes of inheritance with low, sex-dependant penetrance in isolated HSCR cases. Although oligogenic multiplicative models have been proposed, mutations in the *RET* proto-oncogene have emerged as pivotal (1–4). Almost all HSCR patients harbor either a heterozygous mutation in the *RET* coding sequence or, more frequently, a hypomorphic allele in a conserved noncoding element in intron 1 that acts as a spatially restricted transcriptional enhancer (4–6).

In addition to HSCR, some 30% of patients also exhibit other congenital anomalies as the result of chromosomal rearrangements [mostly Down syndrome (DS)], monogenic Mendelian disorders regardless of the mode of inheritance, or undiagnosed associations (6). In such cases, penetrance for the HSCR trait is 5 to 70%, suggesting additional predisposing genetic factor(s). Interestingly, alleles at the *RET* locus can have a role in modifying the risk of HSCR to be associated with several HSCR predisposing syndromes [congenital central hypoventilation, DS, Waardenburg (WS) type IV due to *EDNRB* mutations, and Bardet-Biedl (BBS)], but not all (Mowat-Wilson and Waardenburg type IV due to *SOX10* mutations) (6–8). These observations are suggestive of *RET*-dependent

and *RET*-independent HSCR cases (9); consistent with *RET* acting as a modifier gene in some HSCR predisposing syndromes, no correlation between the genotype for the syndrome disease causing gene and the HSCR trait could be drawn in monogenic HSCR syndromes (9, 10).

Surprisingly, the greatest *RET* dependence has been observed in the group of patients with both BBS and HSCR. No interactions between *RET* and BBS proteins are known; also, whereas *RET* is a cell-surface tyrosine kinase receptor essential for enteric neuron population of the gut (11), BBS is a ciliopathy caused by mutations in at least 14 genes (ref. 12 and references therein), with all BBS proteins examined to date localizing in the basal body and the ciliary axoneme where they likely affect various signaling processes (13). Nonetheless, despite any obvious biochemical or subcellular links between *RET* and the BBS proteins, a zebrafish model of BBS was shown recently to manifest a Shh-dependent defect in the migration of neural crest cells with concomitant defects in the innervation of the ENS (14), suggesting that the observed enrichment of *RET* hypomorphic alleles in BBS-HSCR patients might underlie a synthetic interaction at a higher level of systems organization.

Here, we report 2 families and 1 sporadic case with BBS and HSCR, each with variations at both a *BBS* locus and *RET*. Using both in vitro and in vivo models, we show that each individual variation has deleterious effects. Importantly, the interaction of these genetic lesions is tissue dependent, modulating the extent of intestinal aganglionosis during the development of the zebrafish ENS.

Results

BBS Mutations in BBS+HSCR Patients. To investigate a possible genetic interaction between BBS and HSCR, we searched for BBS patients also diagnosed with HSCR. We found 2 informative BBS families, one of Caucasian origin (F1), and one of

Author contributions: L.d.P., N.A.Z., S.T., H.D., C. Baumann, P.B., A.M., S.L., H.E., T.A.-B., A.S.M., N.K., and J.A. designed research; L.d.P., N.A.Z., S.T., E.E.D., D.M.M., H.D., C. Baumann, S.L.B., C. Babarit, A.P., C.G., and J.L.B. performed research; C.G. and J.L.B. contributed new reagents/analytic tools; L.d.P., N.A.Z., S.T., E.E.D., D.M.M., H.D., C. Baumann, C.G., A.M., S.L., H.E., T.A.-B., J.L.B., A.S.M., N.K., and J.A. analyzed data; and N.A.Z., A.S.M., N.K., and J.A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹L.d.P., N.A.Z., and S.T. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: katsanis@jhmi.edu or jean.ne.amiel@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0901219106/DCSupplemental.

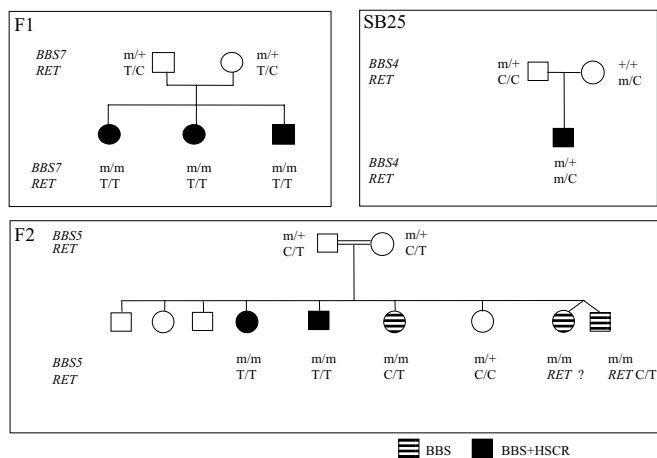


Fig. 1. *RET* and *BBS* mutations found in BBS+HSCR cases. Segregation of *BBS* and *RET* mutations in 2 BBS families with BBS±HSCR and 1 BBS+HSCR sporadic case (SB25).

Moroccan origin (F2) (Fig. 1). F1 had 3 sibs, all affected with short segment HSCR as confirmed by histological criteria that included absence of enteric plexuses and increased acetylcholinesterase histochemical staining in nerve fibers. F2 consisted of consanguineous parents ($f = 1/16$) of 5 BBS sibs, 2 of which also had confirmed HSCR. We also identified a third sporadic case (SB25) born to healthy unrelated parents of Caucasian origin and presenting both BBS and HSCR (Fig. 1).

To determine the genetic lesion contributing to these cases, we first investigated all known BBS loci. We found all affected sibs in F1 to harbor 2 heterozygous missense mutations in *BBS7*; a paternal c.691T>C, p.W230R, and a maternal c.1512 G>A, p.R504K. Both mutations altered a conserved amino acid and were not found in 250 control chromosomes. In F2, all 5 sibs had a homozygous 1-bp deletion in exon 15 (c.1909-1910delT) of *BBS5*, causing a frameshift (p.K41fsX52). Both parents were heterozygous for the mutation, which was also not detected in controls. Last, the sporadic case SB25 bore a heterozygous missense *BBS4* mutation (1372 C>T; S457I), which was inherited from the father and not found in 195 controls.

Genotyping of *RET* in Patients. Previous reports have shown that BBS patients with HSCR are more frequent carriers of a *RET* hypomorphic allele than expected from population frequency (9). Therefore, we hypothesized that the BBS+HSCR patients in our families might also have a *RET* variant. To test this possibility, we sequenced the patients for mutations in *RET*. The 3 F1 sibs were homozygous for the common intronic hypomorphic T allele; both parents were heterozygous. In F2, only the 2 BBS+HSCR, but not the other 3 BBS-only patients were homozygous for the same *RET* allele. Last, the sporadic SB25 case was WT for the intron 1 allele, but had a novel, maternally inherited heterozygous 11-bp deletion (del AAGCAACTGCC). This deletion lies 106-bp downstream of the known intron 1 hypomorphic allele, maps within the highly conserved enhancer region, and was not found in over 800 control chromosomes (Fig. 1; Fig. S1).

Functional Assessment of BBS and *RET* Mutations. Our genetic data provide strong evidence that the *BBS5* and *BBS7* alleles in families F1 and F2 are sufficient to cause BBS. By contrast, the pathogenic potential of the *BBS4* S457I allele cannot be established unequivocally, despite its absence from ethnically matched controls. Therefore, we investigated the (non)neutrality of this allele using an established zebrafish BBS model. We

have reported previously that suppression of Bbs proteins results in Wnt-dependent gastrulation movement defects in zebrafish (15, 16), which can be rescued by coinjection of WT human mRNA. This system has enabled us establish the pathogenic potential of several novel BBS-causing alleles (12).

Therefore, we suppressed endogenous *bbs4* and evaluated the ability of a 457I-encoding *BBS4* message to rescue the phenotype. Approximately 63% of embryos injected with *bbs4* morpholino (MO) had broadened somites, kinked notochords, and shortened body axes (Fig. 2*A* and *B*). The observed phenotypes not only fully recapitulated our previous observations (15), but were also shown to be specific to the MO, because coinjection of mRNA encoding WT human *BBS4* efficiently rescued the morphant phenotypes (Fig. 2*B*). By contrast, embryos injected with 457I were indistinguishable from embryos injected with *bbs4* MO alone ($n = 96$ embryos, scored blind to injection mixture), suggesting that the introduction of the 457I residue results in functionally null protein (Fig. 2*A* and *B*); expression of 457I-encoding mRNA alone yielded modest phenotypes, indicating that this allele does not act in a dominant-negative fashion (Fig. 2*B*). To validate the pathogenic nature of this mutation further, we investigated the cellular localization of the 457I protein in ciliated mammalian cells. Previous studies have established the reproducible localization of BBS4 near the 2 centrioles by overexpression of tagged protein in transformed cell lines (17, 18). Upon transient transfection of a BBS4-MYC construct, we observed a similar localization pattern (Fig. 2*C*). However, expression of a BBS4 S457I mutant protein resulted in complete mislocalization of the protein (Fig. 2*C*), with the mutant protein forming apparent intracellular aggregates away from the pericentriolar region (visualized by γ -tubulin staining), providing further evidence that the mutation is a likely null.

Next, we turned our attention to the *RET* alleles in our patients. Although the functional significance of the intronic HSCR predisposing allele in *RET* is known, the pathogenic potential of the 11-bp deletion within intron 1 is highly suggestive, but not conclusive. We have shown previously that the multispecies conserved sequence (MCS) within intron 1 (MCS + 9.7) acts as an enhancer element, and contains the previously described hypomorphic allele (5); the 11-bp deletion is 106 bp downstream of this SNP. To investigate the function of the deletion, we constructed pD*Sma-RET* vectors with luciferase under the control of an SV40 promoter and the MCS + 9.7 enhancer plus a 1215-bp encompassing region either with (WT) or without (Δ 11bp) the 11-bp sequence, and assayed relative luciferase activity in SK-N-SH neuroblastoma cells or HeLa cells. The WT *RET* enhancer sequence significantly decreased reporter gene expression ($P = 0.001$) compared with the promoter alone, and also as compared with MCS + 9.7, suggesting that it contains a putative transcription repressor-binding site. However, the vector harboring the 11-bp deletion significantly derepresses reporter gene expression compared with WT ($P = 0.05$) to a level statistically indistinguishable from the promoter alone (NS), suggesting specific disruption of the repressor element binding motif (Fig. 3). Reporter assays conducted in HeLa cells produced similar results. These findings suggest that deletion of 11 bp within the intronic enhancer results in defects in transcriptional regulation in vitro, although they do not abolish the effect of this genomic segment, raising the possibility that Δ 11bp represents a mild allele. Together, these results suggest that the individual *BBS* and *RET* mutations identified in the sporadic case of BBS and HSCR are likely detrimental to gene function. Among putative consensus binding sites encompassing the 11-bp deletion, only the zinc finger transcription factor *SNAIL* is expressed in hNCC. However, ChIP experiments in SK-N-SH cells did not detect an interaction with this protein, suggesting that potentially novel components are associated with the observed suppression regulatory element.

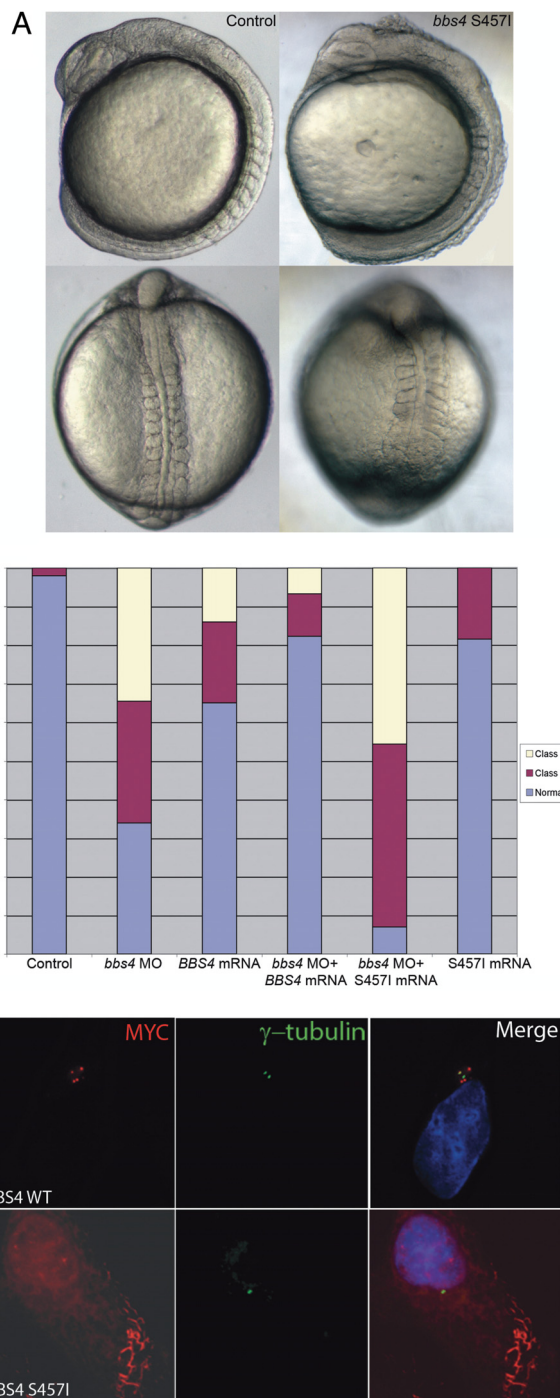


Fig. 2. In vivo assessment of the pathogenic potential of *BBS4* S457I variant. (A) Zebrafish embryos coinjected with a MO against *bbs4* and mRNA expressing the S457I variant exhibited defects, including short body axes, broad somites, wider and kinked notochords, and detachment of cells along the dorsal axis. (B) Compared to rescue with WT *BBS4* mRNA, rescue with the mutated mRNA produced an increase in the proportion of both moderately (Class I) and severely (Class II) affected embryos, but injection of S457I mRNA alone does not produce severe defects, suggesting that the variant is functionally null. (C) HeLa cells transfected with either WT or S457I mutant *BBS4* protein (red). WT protein localizes to the basal body (γ -tubulin, green), but mutant protein completely mislocalizes to form cytoplasmic aggregates.

Genetic Interaction of BBS and RET in Vivo. Our data are consistent with previous studies, in which a higher-than-expected frequency of *RET* hypomorphic alleles were found in BBS-HSCR patients,

and suggest that this property is not restricted to a specific BBS gene (9), not least because *BBS4*, *BBS5*, and *BBS7* are 3 of the least commonly mutated BBS genes (13). To test this possibility in vivo, we assayed the effects of suppression of each of Ret and Bbs proteins on enteric neuron migration in the developing zebrafish gut. As shown previously, suppression of *ret* by MO injection results in a reduction of enteric neurons populating the proximal and distal hindgut, as labeled by in situ hybridization with a *phox2b* riboprobe (Fig. 4 B and I) (19). Likewise, and consistent with recent data for *bbs8*, suppression of either *bbs4*, *bbs5*, or *bbs7* also results in a reduction of enteric neuron migration, although not as severe (Fig. 4 C, E, G, and I). However, coinjection of *ret* MO with any of the 3 *bbs* genes tested resulted in a significantly greater decrease in the enteric neurons in the hindgut, with phenotypic synthesis particularly prominent in the distal hindgut (Fig. 4 D, F, H, and I). The increased severity is greater than a mere additive effect, suggesting an epistatic interaction between *ret* and *bbs* function. These findings indicate that suppression of *ret* in addition to loss of *bbs* function results in more severe defects in ENS development than with loss of these genes independently.

NCCs as Likely Sites of Epistasis. The finding that *ret* and *bbs* genes interact genetically to produce enteric neuron defects suggests the possibility that these genes function in overlapping pathways to regulate ENS development. Several lines of evidence support this conjecture: the role of RET signaling in NCC migration is well established (20, 21), whereas suppression of *bbs8* has been shown to result in similar defects, potentially in a Shh-dependent fashion (14). Also, transcriptional profiling of NCC cells demonstrated the presence of mRNA message for several BBS proteins, as well as mRNA for genes encoding numerous ciliary and basal body proteins (Table S1; Fig. S2 A and B). Last, immunocytochemistry using antiacetylated α -tubulin revealed a clear presence of monocilia and basal bodies, respectively, in these cells (Fig. S2 C and D). To confirm that the ciliated NCCs are, in fact, those that will contribute to enteric innervation, we performed immunofluorescence using either anti-RET or anti-SOX9 and observed expression of both proteins in NCCs positive for antiacetylated tubulin staining (Fig. S2D).

Given these findings, one possibility is that RET signaling functions through the cilium, because several other paracrine receptors are known to localize there or to indirectly require the primary cilium for signal transduction (22). However, RET immunofluorescence has never detected the protein in the ciliary axoneme, suggesting that the observed genetic interaction between RET and the BBS proteins might occur at a higher level of systems organization. To test this possibility we attempted to rescue the enteric neuron phenotype of RET knock-down by coinjecting *BBS4* mRNA in embryos injected with *ret* MO; we did not observe any amelioration of the gut innervation defect (Fig. 4I), suggesting that *BBS4* is not downstream of RET and supporting the notion that the 2 pathways likely converge at the same endpoint.

Discussion

Here, we have described 3 families segregating BBS in concert with HSCR. Mutation detection in affected individuals revealed mutations in *BBS4*, *BBS5*, and *BBS7*, consistent with their phenotypic presentation. Also, each affected was also homozygous for the common *RET* intronic hypomorphic allele or, in one instance, harbored a novel heterozygous 11-bp deletion that was absent from control chromosomes. We verified the functional potential of all novel alleles identified, integrating in vitro and in vivo approaches to determine their impact. These data led us to posit that interactions between RET and either *BBS4*, 5, or 7 in each instance would explain the coexpression of BBS and HSCR phenotypes. We have

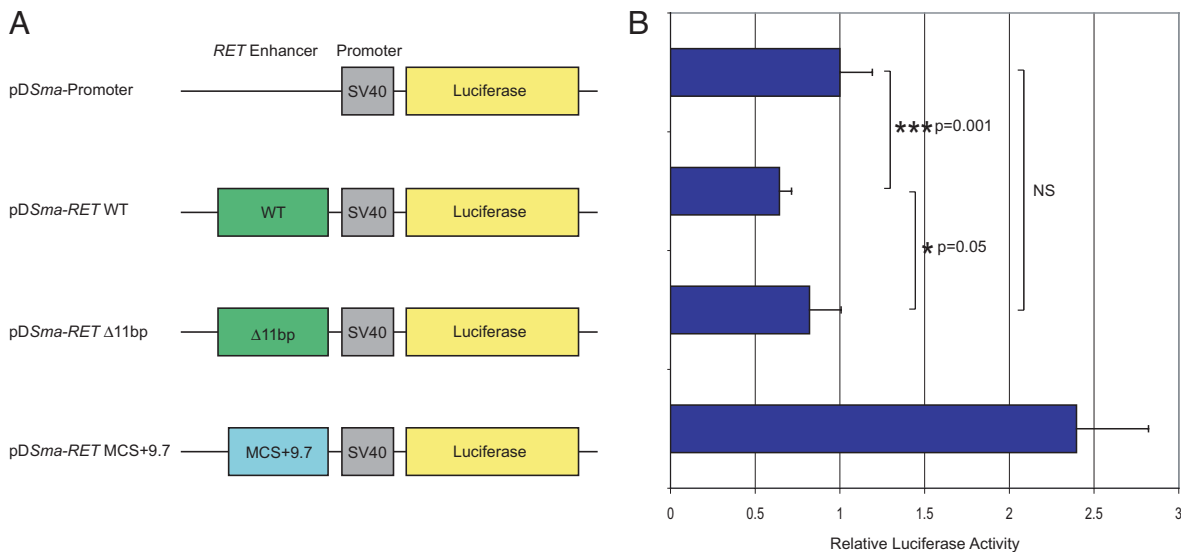


Fig. 3. Deletion in the *RET* regulatory sequence perturbs reporter gene expression in vitro. (A) Schematic representation of vectors used to assay the effect of the 11-bp deletion on reporter gene expression in vitro. WT or mutated ($\Delta 11$ bp) *RET* enhancer sequence (green) was placed upstream of an SV40 promoter (gray) driving firefly luciferase expression (yellow). The pDSma-*RET* MCS + 9.7, described previously (5), was used as a positive control. (B) Relative luciferase activity of pDSma-*RET* vectors (depicted in A) in SK-N-SH neuroblastoma cells. Cells were lysed 48 h posttransfection, and relative luciferase activity was normalized to values obtained from the promoter alone (pDSma-Promoter). The WT *RET* enhancer sequence significantly decreases reporter gene expression ($P = 0.001$) compared with promoter alone, suggesting that it contains a putative transcription repressor-binding site. However, the vector harboring the 11-bp deletion significantly derepresses reporter gene expression compared with WT ($P = 0.05$) to a level statistically indistinguishable (NS) from the promoter alone, suggesting specific disruption of the repressor element binding motif. Assays were performed in triplicate wells and repeated thrice.

used nonallelic, noncomplementation through MO-based approaches in zebrafish to test these observations.

We have demonstrated that pairwise compound reduction in *RET* and each independent BBS protein product (BBS4, 5, or 7), which independently yield mild intestinal aganglionosis, severely exacerbates the observed enteric defects, with particular prominence in the distal hindgut. Interestingly this synergy in mutational effect appears to be tissue dependent, not resulting in an overt worsening of other associated phenotypes (e.g., convergence extension) suggesting that the pleiotropic activities of these genes may only be amenable to interaction with each other in a cell type dependent manner. As with other systems in the vertebrate organism, nervous system development relies on a delicate balance of interactions. Importantly, our data also illuminate interrelated roles for these BBS loci and *RET* in buffering the effects of genetic variation during ENS development, and between their mutant alleles in the copresentation of BBS and HSCR phenotypes. Interestingly, HSCR has been recurrently reported in association with other ciliopathies, namely Jeune and Joubert syndromes (23, 24).

Complex inheritance is underlined by a requirement for the combined influence of alleles at >1 locus in the transmission and expression of a phenotype; homeostatic genetic networks minimize the consequence of variation. Both BBS and HSCR are models of such traits, requiring the interaction of multiple genes for disease expression.

Just as interactions between different *BBS* loci explain the risk of BBS in subsets of families, interactions between *RET* and other loci can also explain disease risk in subsets of isolated and syndromic HSCR cases/families (1–3, 7, 12, 25, 26). Many of the genes implicated in these disorders display markedly pleiotropic effects when evaluated independently and occasionally these effects can coincide.

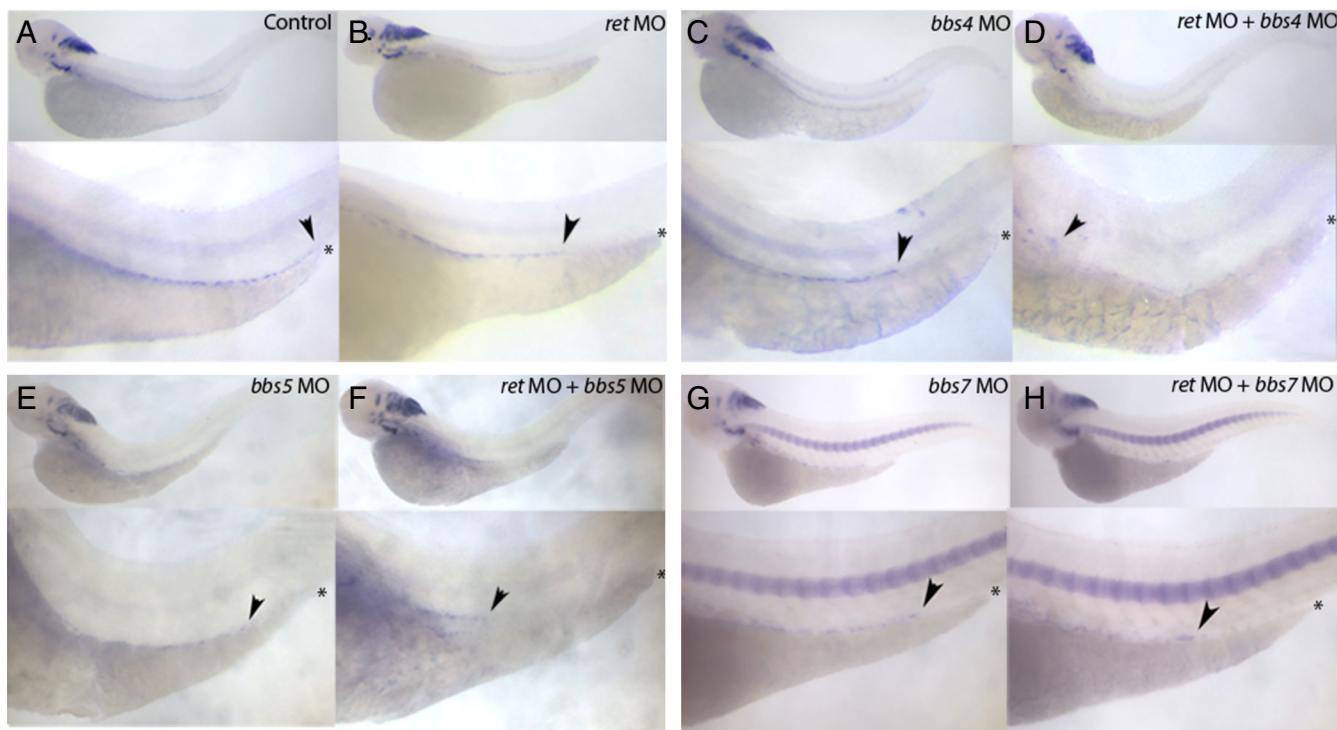
The interaction of genes involved in the same biochemical system and the observation of their failure to complement each other (intrinsic noncomplementation) is well established (3, 27, 28). However, there is no evidence to suggest that *RET*-

mediated receptor tyrosine kinase signaling, and its role in neuronal precursor proliferation (21), directly intersects the role of BBS proteins in the development and function of ciliated cells and their proposed role in cell migration (13). Thus, their observed synergy is unlikely to arise from biochemical interaction, but rather from extrinsic noncomplementation raising predisposition to a common phenotype. Importantly, intrinsic noncomplementation is the commonly recognized basis of both HSCR and BBS. Although it cannot at this stage be distinguished definitively, we speculate that the syndromic copresentation of BBS and HSCR observed here, as well as similar interactions between HSCR and WS, support a model of extrinsic noncomplementation, where perturbations in unrelated biochemical signaling cascades converge at the same biological process (namely, neuronal migration and specification).

Materials and Methods

Patient Genotyping and Sequencing. Blood samples were obtained with informed consent, and DNA was extracted according to standard protocols. Genotyping the *BBS1-12* loci was performed by using fluorescent microsatellite markers (available on request). Mutation screening of *RET* and *BBS* genes have been described elsewhere (29), and intronic primers designed for *BBS* genes are available on request. Direct sequencing on both strands was performed using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and was analyzed on an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems). Also, patients were genotyped for SNP rs2435357 lying in the intron 1 of the *RET* gene. Of note, variable allelic frequencies are observed according to ethnicity and range from $<5\%$ in South Africa to $\approx 50\%$ in Asia. The European Caucasian population has been thoroughly investigated in France, Italy, Spain, the Netherlands, and Germany, allowing approximation of the frequency of the T HSCR predisposing allele to $\approx 25\%$ in the Caucasian population (30).

Luciferase Reporter Assay. SK-N-SH or HeLa cells were plated in 24-well plates at a density of 10^5 cells/well, and were transfected at $\approx 60\%$ confluence with FuGENE6 transfection reagent (Roche) according to manufacturer's instructions, using a 2:1 ratio of pDSma vector and pRLSV40 *Renilla* luciferase control vector (Promega), respectively. At 48 h posttransfection, cells were lysed and assayed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), and a



Expression of *phox2b* in hindgut Neurons

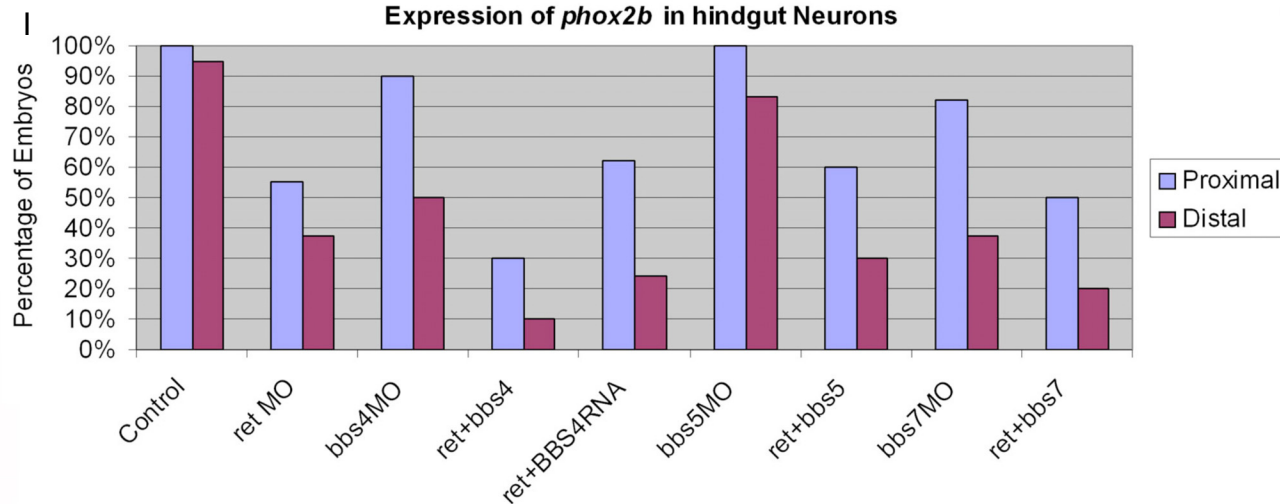


Fig. 4. Genetic interaction of *Ret* and *Bbs* in zebrafish. (A) Migration of enteric neurons in 4-day-old embryos normally proceeds along the developing hindgut to reach the anus (asterisks). Embryos injected with MO against either (B) *ret* or (C) *bbs4*, (E) *bbs5*, or (G) *bbs7* exhibit premature termination of enteric neuron migration (arrowhead). This defect is exacerbated in embryos injected with a combination of *ret* MO and either (D) *bbs4*, (F) *bbs5*, or (H) *bbs7* MO. (I) The extent of the defect was quantified by assessment of the presence of *phox2b* expression in the proximal hindgut (somites 4–9) or the distal hindgut (somites 10 and beyond) as previously described (31).

Tecan microplate reader equipped with the XFluor4GENiosPro macro. Assays were performed on triplicate wells, and were repeated at least twice. Relative luciferase activity was normalized to values obtained from the promoter alone (pD*Sma*-Promoter).

Zebrafish Embryo Manipulation and MO Injection. Embryos were injected with a previously described and validated oligonucleotide MO against *bbs4* to suppress translation of the endogenous protein, resulting in phenotypes consistent with PCP defects including shortened body axes, broad notochords, and widened somites (15, 16). They were subsequently coinjected with mRNA encoding WT human *BBS4* or the S457I variant of *BBS4*. Embryos were classified as normal, moderately (Class I), and severely (Class II) affected according to phenotype.

In Situ Hybridization. Embryos were cultured for 4 days in embryo media at 28 °C, fixed in 4% Paraformaldehyde overnight at 4 °C, and stored at –20 °C

in 100% MeOH until in situ hybridization, which was carried out according to previously described protocols (15). Enteric neurons were labeled using a *phox2b* digoxigenin ripoprobe (31).

Human NC Isolation and Culture. Human embryos were collected from pregnancies legally terminated using the mifepristone protocol, in concordance with French bioethics law 2004-800 and with the approval of the Necker hospital ethics committee. Human NCCs were isolated from posterior hind-brain and thoracic-level neural tube and cultured as previously described (32) to 80% confluency on 8-well collagen I-coated slides (BD BioCoat).

Immunocytochemistry. Twenty-four hours after seeding, hNCC were starved in DMEM/F12 with 0.4 ng/mL FGF2 for a further 72 h. Cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde, then treated in 50 mM NH₄Cl 10 min, 0.3% Triton X-100 in PBS 15 min, followed by 1 h in a solution of 1% BSA, 0.1% Tween-20,

10% goat serum in PBS. Cells were then incubated with antiacetylated α -tubulin (TUBA4A; Sigma T6793), anti-RET (SC13104, 1:50; Santa Cruz), or anti-SOX9 (ab5535, 1:200; Chemicon) for 2 h at room temperature, and rinsed. SOX9 and RET were revealed using an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and TUBA4A with an Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (1:200 each; Invitrogen). The slides were mounted with Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen).

HeLa cells were grown on glass coverslips in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in 5% CO₂. Transient transfections of WT or mutant BBS4 constructs were carried out using calcium phosphate (Invitrogen), and cells processed 24 h later with anti-MYC mouse monoclonal and anti- γ -tubulin rabbit polyclonal antibodies (T3559; Sigma).

Microarray and RT-PCR. Total RNA from 5 human trunk NCCs were extracted using Rneasy Mini kit (Qiagen). Gene profiling was done using the Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip array. Hybridization data were analyzed with dChip software. Heat map was constructed using a list of 75 experimentally confirmed ciliary and basal body/centrosomal proteins de-

finied in ref. 33. Reverse transcription was performed using GeneAmp RNA PCR core kit (Applied Biosystems), and PCR amplifications were performed using 50 ng of cDNA and 35 amplification cycles. Primers are available on request. Affymetrix data are available from the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus under accession number GSE 14340.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the families and their referring clinical teams for participation, the Association Française de la Maladie de Hirschsprung for its support, Sophie Audollent for technical assistance, and the Johns Hopkins University Finz Center for husbandry and technical support with the zebrafish experiments. This work was supported by grants from the Association Nationale pour la Recherche, the Fondation pour la Recherche Médicale, and the National Institute of General Medical Sciences (A.S.M.), by National Institute of Child Health and Development Grant R01HD04260, by National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Disorders Grants R01DK072301 and R01DK075972, by the Macular Vision Research Foundation (N.K.), by a Visual Neuroscience Training Program fellowship (N.A.Z.), by and National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Disorders National Research Service Award Fellowship F32 DK079541 (to E.E.D.). A.S.M. and D.M. were supported by award GM071648 (to A.S.M.).

- Bolk S, et al. (2000) A human model for multigenic inheritance: Phenotypic expression in hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:268–273.
- Gabriel SB, et al. (2002) Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 31:89–93.
- McCallion AS, et al. (2003) Genomic variation in multigenic traits: Hirschsprung disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:373–381.
- Emison ES, et al. (2005) A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434:857–863.
- Grice EA, Rochelle ES, Green ED, Chakravarti A, McCallion AS (2005) Evaluation of the RET regulatory landscape reveals the biological relevance of a HSCR-implicated enhancer. *Hum Mol Genet* 14:3837–3845.
- Amiel J, et al. (2008) Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. *J Med Genet* 45:1–14.
- Carrasquillo MM, et al. (2002) Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 32:237–244.
- McCallion AS, Stames E, Conlon RA, Chakravarti A (2003) Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: Tissue-specific interaction between Ret and Ednrb. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1826–1831.
- de Pontual L, et al. (2007) Epistatic interactions with a common hypomorphic Ret allele in syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 28:790–796.
- de Pontual L, et al. (2006) Mutations of the RET gene in isolated and syndromic Hirschsprung's disease in human disclose major and modifier alleles at a single locus. *J Med Genet* 43:419–423.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380–383.
- Leitch CC, et al. (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40:443–448.
- Zaghloul NA, Katsanis N (2009) Mechanistic insights into Bardet-Biedl Syndrome: A model ciliopathy. *J Clin Invest* 119:428–437.
- Tobin JL, et al. (2008) Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6714–6719.
- Gerdes JM, et al. (2007) Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39:1350–1360.
- Ross AJ, et al. (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135–1140.
- Nachury MV, et al. (2007) A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129:1201–1213.
- Kim JC, et al. (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462–470.
- Heanue TA, Pachnis V (2008) Ret isoform function and marker gene expression in the enteric nervous system is conserved across diverse vertebrate species. *Mech Dev* 125:687–699.
- Chakravarti A, McCallion AS, Lyonnet S (2007) Hirschsprung Disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds Scriver CR, Beaudet AR, Valle D, Sly W (McGraw-Hill, New York), Chap 251, 8th Ed.
- McCallion AS (2008) RET, Hirschsprung disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *Inborn Errors of Development*, eds Epstein C, Erickson R, Wynshaw-Boris A (Oxford Univ Press, San Francisco), 2nd Ed.
- Davis EE, Brueckner M, Katsanis N (2006) The emerging complexity of the vertebrate cilium: New functional roles for an ancient organelle. *Dev Cell* 11:9–19.
- Aurora P, Wallis CE (1999) Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy) associated with Hirschsprung disease. *Clin Dysmorphol* 8:259–263.
- Ozyurek H, Kayacik OE, Gungor O, Karagoz F (2008) Rare association of Hirschsprung's disease and Joubert syndrome. *Eur J Pediatr* 167:475–477.
- Auricchio A, et al. (1999) Double Heterozygosity for a RET Substitution Interfering with Splicing and an EDNRB Missense Mutation in Hirschsprung Disease. *Am J Hum Genet* 64:1216–1221.
- Puffenberger EG, et al. (1994) A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79:1257–1266.
- Hartman JL, Garvik B, Hartwell L (2001) Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291:1001–1004.
- Kacser H, Burns JA (1981) The molecular basis of dominance. *Genetics* 97:639–666.
- Pelet A, et al. (2005) Homozygosity for a frequent and weakly penetrant predisposing allele at the RET locus in sporadic Hirschsprung disease. *J Med Genet* 42:e18.
- Chattopadhyay P, et al. (2003) Global survey of haplotype frequencies and linkage disequilibrium at the RET locus. *Eur J Hum Genet* 11:760–769.
- Elworthy S, Pinto JP, Pettifer A, Cancela ML, Kelsch RN (2005) Phox2b function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent. *Mech Dev* 122:659–669.
- Thomas S, et al. (2008) Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum Mol Genet* 17:3411–3425.
- Gherman A, Davis EE, Katsanis N (2006) The ciliary proteome database: An integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet* 38:961–962.

Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet–Biedl syndrome

Norann A. Zaghlool^a, Yangjian Liu^a, Jantje M. Gerdes^a, Cecilia Gascue^b, Edwin C. Oh^c, Carmen C. Leitch^a, Yana Bromberg^{d,e}, Jonathan Binkley^{f,g}, Rudolph L. Leibel^h, Arend Sidow^{f,g}, Jose L. Badano^b, and Nicholas Katsanis^{a,c,1}

^aMcKusick–Nathans Institute of Genetic Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205; ^bInstitut Pasteur de Montevideo, CP11400 Montevideo, Uruguay; and ^cCenter for Human Disease Modeling, Department of Cell Biology, Duke University, Durham, NC 27708; ^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biophysics, ^eColumbia University Center for Computational Biology and Bioinformatics, and ^hDivision of Molecular Genetics and Naomi Berrie Diabetes Center, Columbia University, New York, NY 10032; and Departments of ^fGenetics and ^gPathology, Stanford University Medical Center, Stanford, CA 94305

Edited* by Jeremy Nathans, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, and approved May 5, 2010 (received for review January 6, 2010)

Technological advances hold the promise of rapidly catalyzing the discovery of pathogenic variants for genetic disease. However, this possibility is tempered by limitations in interpreting the functional consequences of genetic variation at candidate loci. Here, we present a systematic approach, grounded on physiologically relevant assays, to evaluate the mutational content (125 alleles) of the 14 genes associated with Bardet–Biedl syndrome (BBS). A combination of *in vivo* assays with subsequent *in vitro* validation suggests that a significant fraction of BBS-associated mutations have a dominant-negative mode of action. Moreover, we find that a subset of common alleles, previously considered to be benign, are, in fact, detrimental to protein function and can interact with strong rare alleles to modulate disease presentation. These data represent a comprehensive evaluation of genetic load in a multilocus disease. Importantly, superimposition of these results to human genetics data suggests a previously underappreciated complexity in disease architecture that might be shared among diverse clinical phenotypes.

epistasis | ciliopathy | zebrafish | *in vivo* assays

Exome and whole-genome resequencing is likely to catalyze a paradigm shift in the identification of genetic lesions in patients (1). At the same time, even within the confines of the coding genome, such technologies pose an interpretive problem, in that the pathogenic candidacy of mutations can only be derived by narrow genetic models and limited computational predictive tools, both of which are likely to under- and misinterpret the effect of some mutations. Moreover, inter- and intrafamilial variability, a phenomenon prevalent in most genetic traits, remains a major confounding factor because both allelic variation at a single locus and second-site *trans* modifiers can exert a significant influence on penetrance and expressivity through additive and epistatic effects (2).

Bardet–Biedl Syndrome (BBS) is a useful model for dissecting epistasis because most of the 14 BBS genes can also contribute epistatic alleles (3–17). BBS is also a representative of the ciliopathy disease spectrum, a group of disorders characterized by defects in ciliary structure and/or ciliary signal output (18). Hallmarks of BBS include retinal degeneration, obesity, hypogonadism, polydactyly, renal dysfunction, and mental retardation (19).

We and others have shown that the zebrafish provides experimentally tractable and physiologically relevant models of important aspects of ciliary dysfunction (2, 15, 17, 20–23). Moreover, human mRNA for ciliopathy genes can rescue both morphant and mutant zebrafish phenotypes efficiently, providing a robust platform for interpretation of the pathological relevance of identified missense alleles, whose causal relation to the disorder cannot be proven definitively with genetic arguments alone (15, 17, 22, 23).

Here, we have integrated multiple independent *in vivo* assays, followed by *in vitro* validations, to interrogate aspects of the

functionality of each of 125 alleles and to determine their contribution to genetic disease as a function of total mutational load across all the known BBS genes.

Results

Modeling BBS Developmental Defects in Zebrafish. Injection of morpholino against each BBS gene results in gastrulation defects. We have shown previously that suppression of some BBS proteins in zebrafish causes gastrulation defects that include shortened body axes, longer somites, and broad and kinked notochords (14, 16, 17, 20, 21). These phenotypes are consistent with abnormal planar cell polarity (PCP) signaling (21, 22, 24, 25), which likely underlies several clinical phenotypes in patients who have BBS, including hearing defects (20), neural tube closure abnormalities (26), renal cyst formation (27), and possibly obesity and cognitive impairment (28). The fact that these observations are likely relevant to the etiopathology of BBS (20, 21, 23–25), and true for all seven *bbs* orthologues tested (*bbs1*, *bbs4*, *bbs6*, *bbs10*, *bbs12*, *mks1*, and *cep290*) as well for as the three BBS modifiers *mgc1203*, *mks3*, and *rpgr11*, suggested that they might represent useful assays for all BBS genes. We therefore designed translation-blocking morpholinos (MOs) against *bbs1–12* (and *SI Appendix, Table S1*) and injected each into WT embryos at varying concentrations to establish a survival curve (*SI Appendix, Table S3*) from which to derive the optimal working MO concentration (minimal cytotoxicity, maximal phenotype). Scoring of 8 to 10 somite stage embryos revealed that knockdown of each *bbs* gene results in defects similar to those described previously (Fig. 1A). These phenotypes were unlikely to be caused by nonspecific toxicity because they were fully reproduced by injection of splice-blocking MOs, for which efficient knockdown could be demonstrated by RT-PCR (*SI Appendix, Fig. S1 A–C and Table S3*). These effects were corroborated by quantification of the body axis shortening defect by *in situ* hybridization (*SI Appendix, Fig. S2*) and by quantification of defects in gastrulation movements (*SI Appendix, Fig. S3*).

Human BBS mRNA rescues morphant phenotypes. Given the high conservation between human and zebrafish *bbs* orthologues (*SI Appendix, Table S2*) and the previously reported rescue of *bbs11*, *mks1/bbs13*, and *cep290/bbs14* with human mRNAs (15, 17), we reasoned that expression of other human BBS proteins should

Author contributions: N.A.Z., E.C.O., J.L.B., and N.K. designed research; N.A.Z., Y.L., J.M.G., C.G., E.C.O., C.C.L., Y.B., J.B., A.S., and J.L.B. performed research; N.A.Z., Y.L., J.M.G., C.G., E.C.O., C.C.L., Y.B., J.B., R.L.L., A.S., J.L.B., and N.K. analyzed data; and N.A.Z., Y.L., E.C.O., R.L.L., J.L.B., and N.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: katsanis@cellbio.duke.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1000219107/-DCSupplemental.

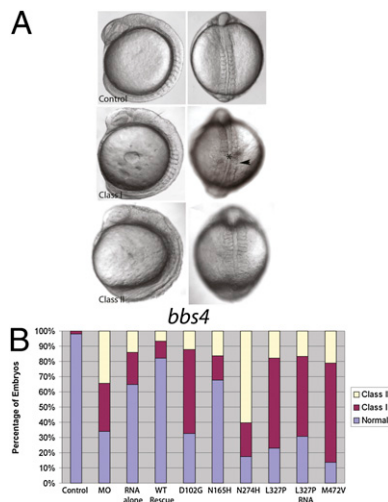


Fig. 1. Suppression of BBS4 produces specific defects. (A) Injection of MOs against individual *bbs* genes (*bbs4* shown here) into zebrafish embryos produces gastrulation defects, including a short body axis, a widened and kinked notochord (*), and broadened somites (arrowhead), which can be rescued by WT human mRNA. Coinjections of mutant mRNAs produce a spectrum of defects. (B) Whereas WT RNA rescues the MO phenotypes (WT RNA), coinjection of hypomorphic mutations (N165H) partially rescues the phenotype; however, null mutations (D102G, N274H, and M472V in BBS4) do not rescue, and dominant-negative mutations (L327P) exacerbate the phenotype and produce defects by injection of RNA alone.

also be able to rescue the morphant phenotypes. We therefore performed rescue experiments for each *bbs* MO (*bbs1–12*) with full-length human mRNA.

On scoring of nine (± 1) somite stage embryos, we found efficient rescue in each case [SI Appendix, Figs. S1–S4 and Table S4, and an online database (http://misc.ciliaproteome.org/bbs_mutations);], confirmed by quantification by in situ hybridization as well as scoring of epiboly movements, each of which was similar to uninjected controls (Figs. 2 and 3 and SI Appendix). To verify further the specificity of each BBS mRNA to rescue the corresponding *bbs* MO, we coinjected each *bbs* MO with a different BBS mRNA, and vice versa, and did not see any rescue (SI Appendix, Fig. S1D). Importantly, in comparison of blindly scored embryos, phenotypes among rescued embryo cohorts were consistently statistically improved from the MO cohort (SI Appendix, Table S4).

Rescue of gastrulation phenotypes yields a spectrum of severity. The rescue of *bbs* morphants with human mRNA for all BBS genes offered us the opportunity to test the effect of all nonsynonymous amino acid changes found in patients in the context of the human protein sequence. First, we engineered mutant constructs by introducing single nucleotide changes in each human gene ($n = 109$). We then assayed the efficiency of rescue of each construct by injecting WT embryos with either (i) a negative control, (ii) MO alone, (iii) MO plus a predetermined molar amount of WT human RNA, (iv) MO plus the same molar amount of mutant mRNA, (v) WT mRNAs alone, or (vi) mutant mRNAs alone. Each coinjection was scored as a comparison with the MO alone or with the WT rescue (*P* values in SI Appendix, Table S4).

Fourteen alleles showed no appreciable differences in rescue efficiency (SI Appendix, Fig. S4 and Table S5), suggesting that they were benign with respect to the function(s) assayed. For example, BBS6 R518H mRNA fully rescued the morphant phenotype (SI Appendix, Figs. S2–S4). By contrast, 15 alleles yielded phenotypes significantly improved from MO-injected embryos but worse than embryos coinjected with WT mRNA, suggesting that these alleles are functional hypomorphs, as exemplified by BBS4 N165H (Fig. 1). A third set of 45 alleles yielded no rescue, and they were

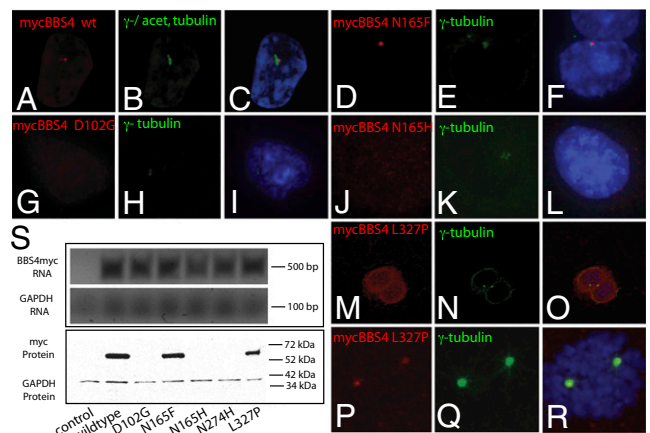


Fig. 2. In vitro validation of mutation effects. (A–C) Localization of myc-tagged WT BBS4 protein (red) in IMCD3 cells shows presence at the basal body, as indicated by colocalization with γ -tubulin and acetylated α -tubulin (green). (D–F) Introduction of an artificial N165F mutation in BBS4 has no observable effect on localization. Expression of the D102G mutant, characterized as null by in vivo scoring, is undetectable 2 d after transfection (G–I), whereas the hypomorphic N165H variant is expressed but mislocalized (J–L). The dominant-negative mutation L327P results in mislocalization in post-mitotic cells (M–O) but not in dividing cells (P–R). (S) Expression of MYC-tagged constructs 4 d after transfection is undetectable for null mutations (D102G, N274H, and N165H), although RT-PCR showed message in each case.

therefore scored as nulls (e.g., BBS4 D102G, N274H; Fig. 1). Finally, 35 alleles produced phenotypes significantly worse than MO alone and mutant mRNA produced phenotypes similar to or worse than MO alone, suggesting that these might be dominant-negative alleles (e.g., BBS4 L327P; Fig. 1). Importantly, we randomly assayed 26 mutations by epiboly tracking quantification and somite trunk length measurements and found full concordance across all assays, suggesting that scoring bias is unlikely to introduce false-positive results.

This systematic evaluation, in addition to our previously reported data for BBS13–14, MKS3, and RPGRIP1L (17, 23), enabled us to generate a complete allelic series for 125 nonsynonymous coding variants across all BBS-associated genes (Fig. 1 and SI Appendix, Fig. S4 and Table S5).

Sensitivity and specificity: Genetic validations. Segregation and population-based analysis or in vitro functional data for a subset of mutations found in patients who have BBS have provided strong evidence for pathogenicity, affording us the opportunity to test the sensitivity of our in vivo scoring. We therefore selected 49 alleles of known pathogenicity in humans and asked how they were scored in vivo (SI Appendix, Table S5). With the exception of the S329L allele in BBS10 (scored benign), 48 of 49 alleles were predicted correctly as pathogenic, suggesting that the in vivo assays have a sensitivity of 98%.

A similar approach can be implemented to test specificity. We selected 12 changes (BBS2¹²³IV; BBS6 C517R; BBS9 A455T; BBS10 D142N; BBS12 I170V, R235M, Q386R, and S429T; MKS1 L491I; MKS3 D261N; and L437V and RPGRIP1L G1025S) common in human populations (minor allele frequency >15%) and thereby found frequently in unaffected parents and siblings of patients, sometimes in homozygosity. We also tested a 13th allele, BBS4 N165F, an induced change that does not alter the properties of the protein (see below), and four BBS6 alleles (G52D, I339V, S511A, and R518H) that behaved indistinguishably from WT in cultured cells (29); 14 of 17 changes were benign in all three in vivo assays, suggesting a specificity of >82%.

In vitro assays. Phenotypes related to some of the BBS proteins have been observed in cultured cells (8–10, 29–34). Therefore, we asked whether some of the aberrant activity in zebrafish embryos could be explained by defective behavior in mammalian cells.

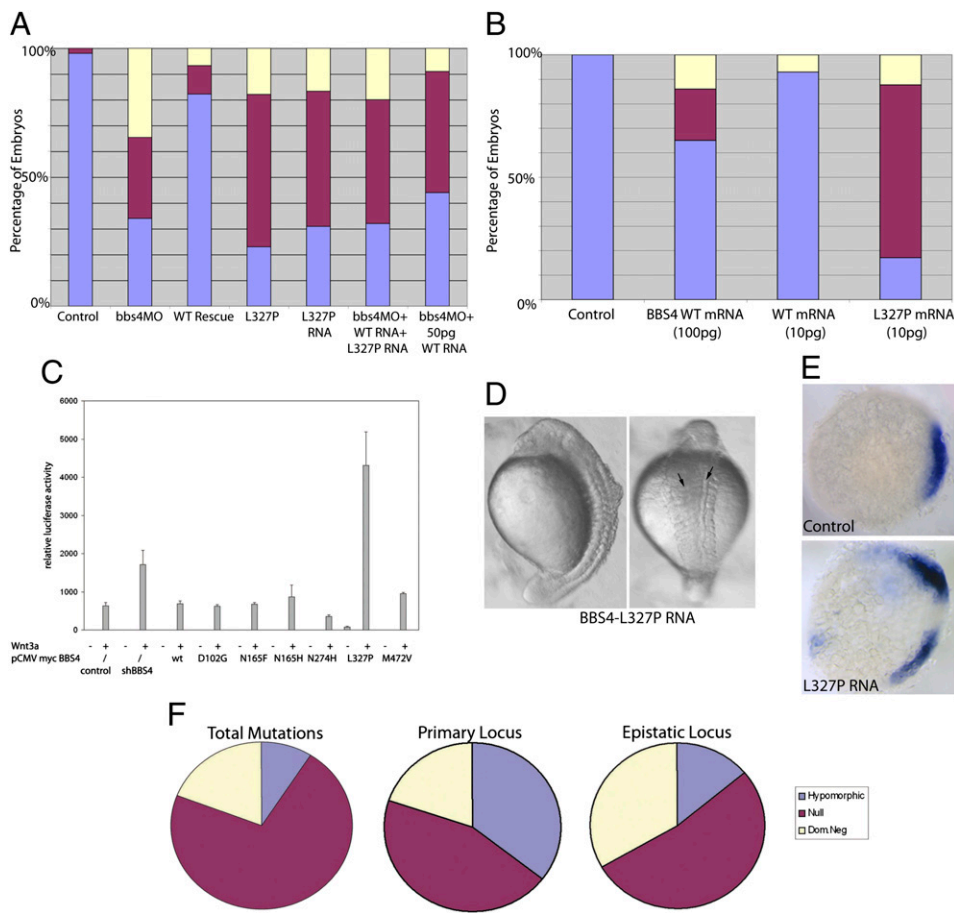


Fig. 3. The dominant-negative effect of BBS4 L327P. (A) Coinjection of 3 ng of *bbs4* MO and 100 pg of WT human mRNA rescues the morphant phenotype, and coinjection of 100 pg of L327P bearing *BBS4* mRNA produces defects similar to, or more severe than, MO alone. Introduction of equimolar amounts (50 pg each), however, of both WT and mutant mRNA attenuates the ability of 50 pg of WT mRNA alone to rescue partially the morphant phenotype. (B) Injection of a suboptimal dose (10 pg) of L327P mRNA produces significant phenotypes. (C) Overexpression of the dominant-negative BBS4 mutation L327P but not of the loss-of-function alleles activated canonical Wnt signaling by the Super TOP-Flash luciferase assay in a manner similar to *BBS4* suppression. Overexpression of L327P mRNA at a high concentration (300 pg) results in dorsalized embryos and double axes (arrows) (D) and ectopic *chordin* expression (E). (F) In the context of oligogenic inheritance, the primary (recessive) locus has a significantly increased likelihood of being hypomorphic ($P < 0.0001$), whereas the epistatic locus is more likely to be severe, with significant enrichment of dominant-negative lesions ($P = 0.0004$).

We focused initially on BBS4 because, in contrast to other BBS proteins, its localization near the two centrioles can be achieved reproducibly by overexpression of tagged protein in various transformed cell lines (31, 32). We engineered six *BBS4* missense mutations into an N-terminal MYC-tagged mammalian expression vector. Three were predicted to be null (D102G, N274H, and M472V), one was a hypomorph (N165H), one was dominant-negative (L327P), and one was the benign variant N165F. Subsequent to transfection into IMCD3 cells, we found our observations to be concordant with the *in vivo* assessments. Although the benign construct N165F showed a pattern of localization indistinguishable from that of WT (Fig. 2 A–F), each of the seven nonneutral mutations showed reproducible phenotypes present in >70% of transfected cells. The null D102G and N274H mutations were undetectable 48 h after transfection (Fig. 2 G–I and S), whereas the hypomorphic allele N165H was also degraded, albeit more slowly (96 h after transfection; Fig. 2 J–L and S). Finally, the dominant-negative allele L327P showed stability indistinguishable from that of WT (Fig. 2S) yet failed to colocalize with γ -tubulin in postmitotic cells (Fig. 2 M–O). Interestingly, we observed centriolar localization of L327P in the mitotic spindle of dividing cells, suggesting that this mutation exerts a specific postmitotic effect (Fig. 2 P–R). Expression of each construct was verified by RT-PCR and with a GFP cotransfection marker (SI Appendix, Figs. S2 and S6).

These observations were not unique to BBS4; we engineered mammalian expression constructs for a random set of 17 BBS mutations (14%). Even though most overexpressed WT proteins show a consistently diffuse cytoplasmic distribution, similar to previous reports (34), we were still able to evaluate differences between WT and mutant constructs. Several alleles predicted to be detrimental to protein function showed a localization pattern distinct from WT (SI Appendix, Fig. S6). Notably, we observed

several examples in which the mutation drove the localization of the protein to subcellular regions never seen with WT constructs. For example, WT BBS7 is detected throughout the cytoplasm but is largely excluded from the nucleus (SI Appendix, Fig. S6L). By contrast, we found mutants T211I and H323R in the nucleus of a significant proportion of cells (SI Appendix, Fig. S6 M and N).

We did find one discrepant result: the BBS6 T112A allele was benign in zebrafish, yet a T112A-expressing construct showed aberrant localization in the nucleus in mammalian cells (SI Appendix, Fig. S6). Although it is not clear which of the two assays is more informative, we concluded that, conservatively, our *in vivo* strategy has an accuracy rate when compared with *in vitro* mammalian cell data of 94% (comparable to the level of sensitivity observed across the three *in vivo* assays). Importantly, our observations from IMCD3 cells were fully corroborated by localization studies in ARP19 and hTERT human ciliated cells (online database).

Dominant-negative mutations. Our *in vivo* studies revealed 35 candidate dominant-negative alleles (28%). To examine this possibility, we performed two independent studies. We first revisited the *in vivo* zebrafish assay and reasoned that if these alleles were dominant-negative, the following two statements should be true: Injection of mRNA encoding dominant-negative alleles alone should phenocopy the morphant phenotype, and equimolar injection of dominant-negative and WT mRNA should attenuate the rescue effect of the WT message.

We found the first statement to be true for all dominant-negative alleles; injection of dominant-negative mRNA alone produced phenotypes similar to MO alone for each of the 35 mutations (Fig. 3A, SI Appendix, Fig. S7 A–E, and online database). This is true even at suboptimal concentrations, at which WT mRNA produces minimal defects (Fig. 3B and SI Appendix,

Fig. S7 F and G). Moreover, further testing suggested the second statement also to be true. For example, for *bbs4*, coinjection of MO and 100 pg of WT mRNA efficiently rescued the morphant phenotype. Coinjection of 100 pg of 327P mRNA with MO, however, gave rise to a significantly worse embryo phenotype than when MO alone was injected, as did injection of 100 pg of mutant mRNA alone. Further, whereas coinjection of *bbs4* MO and 50 pg of WT mRNA partially rescued the morphant phenotype, addition of 50 pg of 327P coding mRNA (for a total of 100 pg of mRNA) attenuated the ability of the WT mRNA to rescue the phenotype (Fig. 3A). We observed similar scenarios for all the alleles tested (SI Appendix, Fig. S7 A–E).

Seeking additional evidence, we turned to a mammalian cell-based biochemical assay. We have shown previously that suppression of *BBS4* leads to elevated canonical Wnt signaling activity, as monitored by the Super TOP-Flash luciferase assay, whereas overexpression of WT *BBS4* has no effect (21). If we have interpreted the zebrafish data correctly, the sole *BBS4* allele predicted to be dominant-negative, L327P, should transactivate the β -catenin reporter in a manner similar to the *BBS4*shRNA. We therefore expressed L327P as well as WT, four loss-of-function *BBS4* mutations (D102G, N165H, N274H, and M472V), and the artificial neutral variant N165F. Blinded analysis of the data correctly predicted L327P to be dominant-negative in three separate experiments (Fig. 3C). To determine if this effect can be replicated in vivo, we overexpressed L327P mRNA at a high concentration (300 pg) and observed dorsalization, including double axis formation in a small proportion of embryos (Fig. 3D), a hallmark of up-regulation of canonical Wnt signaling; consistently, these embryos exhibit ectopic expression of the canonical Wnt target gene, *chordin* (21), at mid-epiboly stages (Fig. 3E).

The discovery of a significant number of dominant-negative mutations is inconsistent with the conceptual notion of loss-of-function effects in recessive disease; that the observations are artifacts is unlikely because of their reproducibility across multiple repetitions and independent assays. We therefore asked whether genetic insights could be gleaned by examining the distribution of candidate dominant-negative alleles in the 218 patients and families in our cohort. We found that dominant-negative alleles account for a minority (18%) of all *BBS* alleles. However, we and others have reported numerous families in which a third *trans* mutation interacts genetically with recessive alleles at a primary locus to modulate disease penetrance and expressivity (34–37). When mapping the position of dominant-negative alleles (primary locus vs. epistatic locus), we found a significant increase of dominant-negative mutations in epistatic loci (33% in modifiers vs. 18% contribution to total mutations; $P = 0.0004$; Fig. 3F), suggesting that a majority of modifier phenomena are inherited dominantly. **Common variants in *BBS*.** Our functional assays were not restricted to rare or private mutations but encompassed all known allelism in *BBS* genes. Both in vivo tests and cell localization studies indicated that 7 of 14 alleles formally classified as polymorphisms (>1% population frequency) are also detrimental to protein function, and might therefore participate in the disease process (SI Appendix, Fig. S5 and Table S6). Given that most of these variants can be found in homozygosity in control individuals suggests that they are insufficient to cause disease. However, we wondered whether they might interact with strong mutations to potentiate *BBS*, as shown recently for one of them, the A229T allele in *RPGRIPL* (23).

These data suggested that population frequency of alleles is not necessarily an indicator of functionality, which led us to query the segregation of all nonsynonymous polymorphisms ($n = 18$) in our families. Not surprisingly, the seven benign SNPs segregated in patterns unrelated to the disease (SI Appendix, Fig. S5 and Table S6). For other alleles, however, the combination of in vivo data and segregation was potentially able to account for the transmission of the disorder in families. We and others have reported numerous pedigrees in which only one heterozygous pathogenic mutation has been found in any given *BBS* gene (4, 5, 7, 14, 16,

17, 38). The assumption has been that the second mutation might lie in a regulatory element. However, our data offer an alternative hypothesis, by which, for some families, the disease may be explained by nonallelic noncomplementation among rare and common alleles. Although most of these alleles were too infrequent in our cohort to perform formal genetic tests for this hypothesis, this was not the case for ¹²³IV in *BBS2* [13.3% in our controls ($n = 240$), 13% in Utah residents with ancestry from northern and western Europe (CEU) HapMap]. In Northern European family AR186, the patient was haploinsufficient for *BBS1* (with a bona fide loss-of-function Q128X mutation, as determined by the in vivo assay (Fig. 4 B and C), did not have an obvious deletion in the other allele (as judged by SNP heterozygosity at the ~1-kb level of resolution across the locus), and did not have any other candidate pathogenic alleles in *BBS1*. However, this patient was also homozygous for the ¹²³IV SNP in *BBS2*, a functional hypomorph (Fig. 4 A–C). Importantly, although the 123V allele might appear to be sufficient for pathogenesis in this family, the presence of 123V homozygotes in the general population (3% in our controls, 3.3% in CEU HapMap) argues that its combination with the *BBS1* nonsense allele might potentiate the disease state.

Because the ¹²³IV change is sufficiently frequent in Europeans, we were able to test whether the in vivo prediction of nonneutrality was true by asking whether the 123V allele of *BBS2* was enriched and overtransmitted in patients who have *BBS*. We observed both to be true: We found 123V in 55 (19.3%) of 284 chromosomes from Northern European patients who had *BBS* compared with 32 (13.3%) of 240 chromosomes from ethnically matched controls, which is a significant difference ($\chi^2 = 8.78$, $P = 0.003$), although transmission disequilibrium testing showed that of 25 informative trios analyzed (no parent homozygous for the minor allele and excluding the “discovery” family AR186), 123V was transmitted to the affected individual in 22 instances (88%; $P = 0.02$).

These data, although of modest numbers, are both consistent with the in vivo analyses and suggestive of an interaction between *BBS1* and *BBS2*. We therefore tested whether subeffective loss of *BBS2* can modulate the phenotype of *BBS1* loss of function. We found strong evidence that this is true: Injection of both *bbs1* and *bbs2* MOs produced phenotypes significantly more severe than injection of either MO alone, some of which, such as the near-complete loss of somite definition and loss of the eye field, were not observed in either single MO injection, even at higher concentrations (Fig. 4D).

Discussion

We used a broad and comprehensive in vivo analytic strategy validated by multiple independent in vitro and genetic tools to assess the functional consequences of nonsynonymous variants in *BBS* genes. The application of such comprehensive in vivo assays is not unique. For example, misexpression of human genes in *Drosophila* has been used to assess the pathogenic potential of the genes/alleles associated with cardiomyopathy (39–41). Advantages of our system include the use of a vertebrate that shares many developmental processes and anatomical features with humans and the assaying of a physiologically relevant phenotype of known significance to the syndrome in humans. We note that we are assaying only this aspect of the *BBS* phenotype and other components of the disorder that are PCP-independent might not be captured. Notably, however, our data were also consistent with all published observations of allele pathogenicity, suggesting that these assays are reasonable surrogates. We found 48 of 49 mutations predicted to be pathogenic from human genetic analysis to be such, whereas our interpretation of the *BBS1* M390R allele as a hypomorph is consistent with the M390R knock-in mouse model (42) and our prediction of *BBS11* P130S to be pathogenic is consistent with a previous report of failure of this allele to rescue melanosome transport (15). Further, our in vivo data for *BBS3* and *BBS6* are in agreement with two recent biochemical studies (29, 30).

dependent interaction of rare and common alleles can determine the phenotype. We speculate that such interactions are probably abundant across genetic disorders and that the presence and relative contribution of alleles with high minor allele frequency should be evaluated carefully in the context of additional rare variants.

Finally, the study of BBS mutations has benefited from a combination of strong evolutionary conservation and a priori understanding of some of the pathways involved in disease pathogenesis. Nonetheless, it is likely that this approach is conceptually feasible for a broad range of other clinical phenotypes. It will be important to develop experimental tools that can evaluate the impact of variation on the output of distinct disease mechanisms or, more broadly, on the phenotypic consequences of whole systems. The availability of large-scale resequencing will necessitate the development and application of bioassays such as those described here to assess the functional relevance of variants identified in individuals with phenotypes of interest.

Materials and Methods

MOs and Embryo Manipulations. MOs against zebrafish *bbs1–12* (*SI Appendix, Table S1*) and control MO were obtained from Gene Tools. One nanoliter of each solution was injected into WT zebrafish embryos at the one- to two-cell stage. Human WT and mutant mRNA for *BBS1–12* were transcribed in vitro with the SP6 Message Machine kit (Ambion). MO and mRNA concentrations (*SI Appendix, Table S3*) were determined based on the combination by which WT mRNA efficiently rescued the morphant phenotype. The same concentrations were used for rescue with mutant mRNA or injection of mRNA alone. Full dose–response curve data for each MO are available on request.

- Ng SB, et al. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461:272–276.
- Badano JL, et al. (2006) Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439:326–330.
- Slavotinek AM, et al. (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:15–16.
- Katsanis N, et al. (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67–70.
- Myktyyn K, et al. (2001) Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat Genet* 28:188–191.
- Nishimura DY, et al. (2001) Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum Mol Genet* 10:865–874.
- Myktyyn K, et al. (2002) Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435–438.
- Chiang AP, et al. (2004) Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *Am J Hum Genet* 75:475–484.
- Fan Y, et al. (2004) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 36:989–993.
- Ansley SJ, et al. (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628–633.
- Badano JL, et al. (2003) Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet* 72:650–658.
- Li JB, et al. (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117:541–552.
- Nishimura DY, et al. (2005) Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 77:1021–1033.
- Stoetzel C, et al. (2006) BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38:521–524 and correction (2006) 38:727.
- Chiang AP, et al. (2006) Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6287–6292.
- Stoetzel C, et al. (2007) Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1–11.
- Leitch CC, et al. (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40:443–448 and correction (2008) 40:927.
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: An emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:125–148.
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flintner FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: Results of a population survey. *J Med Genet* 36:437–446.
- Ross AJ, et al. (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135–1140.
- Gerdes JM, et al. (2007) Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39:1350–1360.
- Cantagrel V, et al.; International Joubert Syndrome Related Disorders Study Group (2008) Mutations in the cilia gene *ARL13B* lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 83:170–179.
- Khanna H, et al. (2009) A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. *Nat Genet* 41:739–745.
- Simons M, et al. (2005) Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37:537–543.
- Corbit KC, et al. (2008) Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* 10:70–76.
- Katsanis N (2006) Ciliary proteins and exencephaly. *Nat Genet* 38:135–136.
- Fischer E, et al. (2006) Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38:21–23.
- Zaghloul NA, Katsanis N (2009) Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119:428–437.
- Hirayama S, et al. (2008) MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations via CHIP-mediated ubiquitination. *Mol Biol Cell* 19:899–911.
- Kobayashi T, et al. (2009) Biochemical characterization of missense mutations in the Arf1/Arf-family small GTPase Arf6 causing Bardet-Biedl syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 381:439–442.
- Nachury MV, et al. (2007) A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129:1201–1213.
- Kim JC, et al. (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462–470.
- Kim JC, et al. (2005) MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci* 118:1007–1020.
- Badano JL, et al. (2003) Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12:1651–1659.
- Katsanis N, et al. (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256–2259.
- Katsanis N, et al. (2002) BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet* 71:22–29.
- Beales PL, et al. (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187–1199.
- Beales PL, et al. (2001) Genetic and mutational analyses of a large multiethnic Bardet-Biedl cohort reveal a minor involvement of BBS6 and delineate the critical intervals of other loci. *Am J Hum Genet* 68:606–616.
- Reiter LTPL, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114–1125.
- Chien SRL, Reiter LT, Bier E, Gribskov M (2002) Homophila: Human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 30:149–151.
- Wolf MJ, et al. (2006) *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1394–1399.
- Davis RE, et al. (2007) A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19422–19427.
- Croft JBMD, Chase CL, Swift M (1995) Obesity in heterozygous carriers of the gene for the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55:12–15.
- Kim LSGF, Fishman GA, Seiple WH, Szyk JP, Stone EM (2007) Retinal dysfunction in carriers of bardet-biedl syndrome. *Ophthalmic Genet* 28:163–168.
- Andersen KL, et al. (2005) Variation of the McKusick-Kaufman gene and studies of relationships with common forms of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:225–230.
- Di Fede G, et al. (2009) A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 323:1473–1477.

Direct role of Bardet–Biedl syndrome proteins in transcriptional regulation

Cecilia Gascue¹, Perciliz L. Tan², Magdalena Cardenas-Rodriguez¹, Gabriela Libisch³, Tamara Fernandez-Calero⁴, Yangfan P. Liu², Soledad Astrada⁵, Carlos Robello^{3,6}, Hugo Naya⁴, Nicholas Katsanis² and Jose L. Badano^{1,*}

¹Human Molecular Genetics Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, CP 11400, Uruguay

²Center for Human Disease Modeling, Duke University, Durham, NC 27710, USA

³Molecular Biology Unit, ⁴Bioinformatics Unit, and ⁵Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, CP 11400, Uruguay

⁶Biochemistry Department, School of Medicine, Universidad de la Republica, Montevideo, CP 11800, Uruguay

*Author for correspondence (jbadano@pasteur.edu.uy)

Accepted 19 September 2011

Journal of Cell Science 125, 1–14

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.089375

Summary

Primary cilia are conserved organelles that play crucial roles as mechano- and chemosensors, as well as transducing signaling cascades. Consequently, ciliary dysfunction results in a broad range of phenotypes: the ciliopathies. Bardet–Biedl syndrome (BBS), a model ciliopathy, is caused by mutations in 16 known genes. However, the biochemical functions of the BBS proteins are not fully understood. Here we show that the BBS7 protein (localized in the centrosomes, basal bodies and cilia) probably has a nuclear role by virtue of the presence of a biologically confirmed nuclear export signal. Consistent with this observation, we show that BBS7 interacts physically with the polycomb group (PcG) member RNF2 and regulate its protein levels, probably through a proteasome-mediated mechanism. In addition, our data supports a similar role for other BBS proteins. Importantly, the interaction with this PcG member is biologically relevant because loss of BBS proteins leads to the aberrant expression of endogenous RNF2 targets *in vivo*, including several genes that are crucial for development and for cellular and tissue homeostasis. Our data indicate a hitherto unappreciated, direct role for the BBS proteins in transcriptional regulation and potentially expand the mechanistic spectrum that underpins the development of ciliary phenotypes in patients.

Key words: BBS, Cilia, Polycomb group

Introduction

Primary cilia are antennae-like extensions that emanate from the cellular membrane and are typically present in most phyla and, in vertebrates, in most cell types. Recent data have linked primary cilia to diverse sensory processes, including chemo- and mechano-sensation as well as the transduction and/or interpretation of different paracrine signaling cascades (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009; Christensen et al., 2008; Gerdes et al., 2009; Goetz and Anderson, 2010; Wallingford and Mitchell, 2011). Consistent with their broad incidence and diversity of function, ciliary defects can result in a range of clinical manifestations that are shared, to a variable extent, among clinically distinct human genetic disorders, known collectively as ciliopathies (Badano et al., 2006b; Fliegauf et al., 2007). One such ciliopathy is Bardet–Biedl syndrome (BBS; OMIM 209900), a pleiotropic disorder characterized by retinal degeneration, obesity, learning difficulties, polydactyly and gonadal and renal malformations. BBS is a genetically heterogeneous disorder for which 16 genes have been identified to date: *BBS1–BBS12*, *MKS1*, *CEP290*, *FRITZ/C2ORF86* and *SDCCAG8* [Kim et al., 2010; Leitch et al., 2008; Otto et al., 2010; Stoetzel et al., 2007 (and references within)].

All BBS proteins tested to date localize to cilia, basal bodies and centrosomes (Ansley et al., 2003; Badano et al., 2006a; Fan et al., 2004; Kim et al., 2004; Kim et al., 2005; Li et al., 2004; Marion et al., 2009; May-Simera et al., 2009). In the context of

ciliary biology, the BBS proteins appear to have both structural and functional roles. Studies in *Caenorhabditis elegans* have demonstrated that *bbs7* and *bbs8* are necessary for intraflagellar transport (IFT), a mechanism that enables and regulates the trafficking of proteins along the ciliary axoneme (Blacque et al., 2004). Moreover, in cultured cells, several of the BBS proteins can form a complex, the BBSome, that plays a role during ciliogenesis (Jin et al., 2010; Nachury et al., 2007). More recently, it has been shown that the BBS complex is able to recognize sorting signals in a number of ciliary proteins and plays a role transporting this cargo into the ciliary compartment (Jin et al., 2010). In addition to their participation in the formation and maintenance of cilia, several BBS proteins have also been shown to modulate paracrine signals. In zebrafish embryos, loss of BBS proteins leads to Shh-dependent migration phenotypes; similar genetic manipulations in zebrafish, mouse and cultured mammalian cells also cause Wnt signaling defects by altering the balance between the different outcomes of the pathway (Gerdes et al., 2007). Depletion of the BBS proteins leads to defective planar cell polarity (PCP) signaling and the concomitant upregulation of canonical signaling, possibly through the stabilization of β -catenin, the main effector of the pathway (Gerdes et al., 2007; Ross et al., 2005).

To gain further insight into the biological role of this group of proteins, we have initiated a detailed characterization of the

sequence and binding partners of the BBS proteins, with primary emphasis on BBS1, BBS2 and BBS7, which together account for 35–40% of the genetic load in the disorder. This is in contrast to the second-most frequently mutated group of the three type II chaperonins (BBS6, BBS10 and BBS12), whose primary sequence exhibits similarity over loosely defined domains of unknown function (Badano et al., 2003). Here we show that not only BBS1, BBS2 and BBS7, but also the plurality of bona fide BBS proteins are predicted to possess nuclear export signals with concomitant detection of BBS proteins in the nucleus of mammalian cells. This subcellular distribution is probably important to the pathomechanism of BBS because mutations found in BBS patients can alter this nuclear localization pattern. Consistent with a nuclear role for these proteins, we also show that BBS7 physically interacts with the polycomb group (PcG) member Ring Finger Protein 2 (RNF2) and controls its protein level, probably by mediating the rate of its degradation by the proteasome. Moreover, we show that other BBS proteins also participate in the process. Depletion of BBS7 leads to increased RNF2 protein levels and results in the transcriptional misregulation of a number of RNF2 target genes, both in cultured cells as well as in vivo in *Danio rerio* (zebrafish). Finally, our data indicate that the role of the BBS proteins in gene regulation might not be restricted to RNF2 but probably extends to other PcG members. These studies point to a hitherto unknown facet of BBS protein activity and lead to the surprising observation that this group of proteins could have a direct role in transcriptional regulation that might contribute to the pathogenesis of BBS in humans.

Results

In silico analysis of BBS proteins reveals nuclear export signals

We have shown recently that whereas overexpression of wild-type BBS7 in HeLa and NIH3T3 cells results in a general cytoplasmic staining and a general exclusion from the nuclear compartment, expression of two BBS7 mutants (H323R and T211I) reported in BBS patients results in ubiquitous cellular staining, including the nucleus (Badano et al., 2003; Zaghoul et al., 2010). Given that the BBS proteins characterized to date localize to the centrosome, basal body and the cilium, this observation raised the possibility that at least BBS7 might also localize to the nucleus. As a first test of this hypothesis, we performed an in silico analysis of the amino acid sequence of the 16 BBS proteins to identify possible nuclear localization signals (NLS) or nuclear export signals (NES) using prediction software for both NLS (NLStradamus; <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) and NES (NetNES 1.1; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) motifs (la Cour et al., 2004; Nguyen Ba et al., 2009). Interestingly, although 15 out of the 16 BBS proteins, CEP290 being the exception, seem to lack an NLS (data not shown), the analysis for NES predicts the presence of a NES motif in each of the BBS proteins tested, with the exception of BBS8, suggesting that these proteins might localize to the nucleus at least transiently (supplementary material Figs S1 and S2).

BBS7 has a dynamic cellular localization pattern and has the capacity to enter the nucleus

Given our previous results with the BBS7 mutants, we determined the localization pattern of endogenous BBS7 in mammalian cells by performing immunocytochemistry in

NIH3T3 cells. Co-staining of BBS7 with γ - and acetylated tubulin showed that BBS7 not only localizes to centrosomes and basal bodies in a pattern that was indistinguishable from that of other BBS proteins reported to date, but it also colocalized with the ciliary axoneme (Fig. 1). Interestingly, not all ciliated cells showed positive staining for BBS7 in the cilium (Fig. 1, compare B with C), suggesting that the exact localization of BBS7 in the context of this organelle might be regulated.

We reasoned that, if BBS7 is also found in the nuclear compartment, it might be localized there transiently or at low levels. Consistent with that notion, when we used higher concentrations of our primary anti-BBS7 antibody in immunocytochemistry assays we observed nuclear staining (Fig. 2A, upper panels). BBS7 is predicted to have a NES motif centered on amino acid residues leucine 625 and isoleucine 634 (supplementary material Fig. S2, upper panel) and therefore the fact that it appears to be present in the nucleus at low levels might be the result of its active export from this cellular compartment. We reasoned that if this is the case, inhibiting nuclear export might result in increased BBS7 nuclear signal. We therefore treated cells with leptomycin B (LMB) and *N*-ethylmaleimide (NEM), chemicals that block nuclear export mediated by CRM1 through NES motifs, and assessed the localization of BBS7 (Fornerod et al., 1997; Holaska and Paschal, 1998; Kudo et al., 1999). Treatment with LMB resulted in increased BBS7 nuclear signal (Fig. 2A, lower panels). To better visualize the effect of LMB, we processed the microscopy images using pseudocolor to highlight the relative density of the BBS7 signal. This analysis showed that cells treated with LMB presented more BBS7 signal (increased green coloring) in the nucleus that correlated with a reduction in the cytoplasmic signal (supplementary material Fig. S3). Similarly, treatment with NEM resulted in nuclear BBS7-positive staining, even when using normal concentrations of the primary antibody (Fig. 2B). To confirm these observations, we tested the subcellular localization of BBS7 by cell fractionation, in which we isolated the cytoplasmic and nuclear fractions from NIH3T3 cells and assessed the presence of BBS7 by western blot. Consistent with our immunofluorescence data, although most BBS7 appeared in the cytoplasmic fraction, the protein was also observed in the nucleus (Fig. 2C).

We next tested whether the predicted NES in BBS7 is functional. We performed site-directed mutagenesis, exchanging an isoleucine residue with alanine at position 634 (I634A) in our Myc-tagged mammalian BBS7 expression construct (Myc–BBS7 NES), a change that was predicted to disrupt the NES completely (supplementary material Fig. S2, lower panel). We transiently transfected NIH3T3 cells with both the Myc–BBS7 and the Myc–BBS7 NES expression constructs and performed immunocytochemistry using the monoclonal anti-Myc antibody. As reported previously, overexpression of wild-type BBS7 does not recapitulate the localization pattern of the endogenous protein because high levels of signal are observed along the entire cytoplasm (Zaghoul et al., 2010). However, the nuclear signal in Myc–BBS7-expressing cells was low in the majority of cases (Fig. 2D). By contrast, Myc–BBS7 NES was readily observed both in the cytoplasm and the nuclear compartment (Fig. 2D). To quantify this effect, we performed transfections in triplicate of both wild-type and mutant constructs and assessed this nuclear localization pattern by counting at least 70 cells per experiment. Our data indicates that at least 50% of cells transfected with the

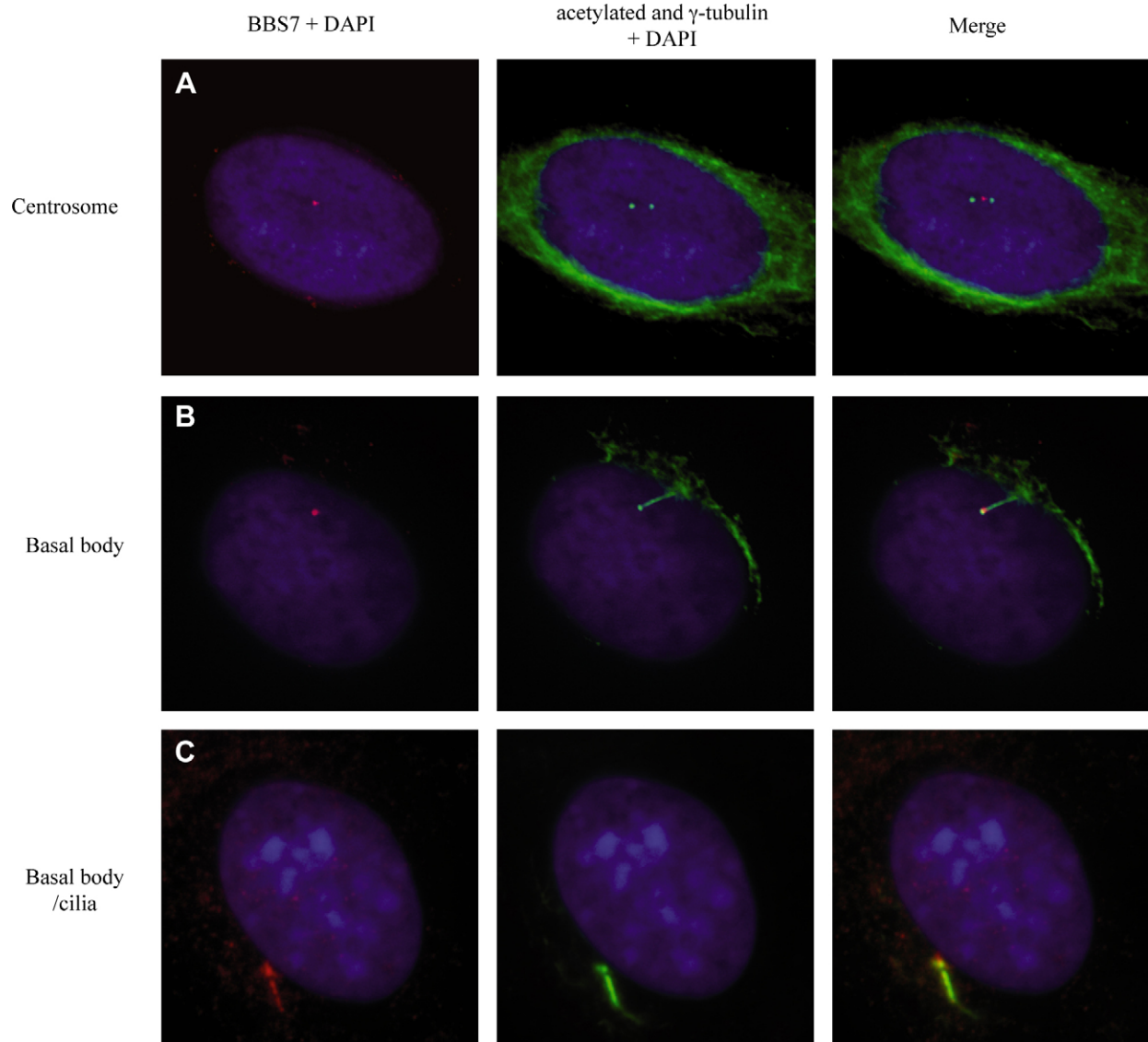


Fig. 1. BBS7 has a dynamic localization pattern. (A–C) Immunocytochemistry assays in NIH3T3 cells using antibodies against endogenous BBS7 (red, left column) and γ - and acetylated tubulin to label centrosomes, basal bodies and the ciliary axoneme (green, middle column). BBS7 localizes to the pericentriolar region (A), to the basal body (B), and to the basal body and the primary cilium (C). DNA was stained with DAPI (blue).

NES mutant construct showed positive nuclear staining compared with 8% of wild-type Myc–BBS7-transfected cells (Fig. 2C; $\chi^2=95.9$, $P<0.001$). We quantified the effect reported previously for the BBS7 missense changes H323R and T211I (Zaghloul et al., 2010) and found an intermediate phenotype, with 20–25% of cells presenting nuclear staining (Fig. 2D). Importantly, the nuclear accumulation of the NES mutant compared with wild-type BBS7 could also be observed by using cell fractionation assays (Fig. 2E).

Collectively, our data indicate that BBS7 localizes to centrosomes, basal bodies and the ciliary axoneme, at least in some cases, and can also be found in the nucleus from where it appears to be actively exported. Moreover, a NES motif located between residues 625 and 634 is likely to be functional and might mediate this process, at least in part, given that neither the H323R nor the T211I mutations are predicted to disrupt the motif but do affect the rate of BBS7 nuclear export.

BBS proteins interact with the nuclear protein RNF2

In parallel to characterizing the cellular distribution of BBS proteins, we have been working towards dissecting the protein complex in which these proteins participate. Focusing on BBS7, we cloned its full-length open reading frame (ORF) into the pSOS construct (pSOS-BBS7) and used this fusion protein as bait in a cytoplasmic yeast two-hybrid screen using a fetal brain cDNA library as prey (Cytotrap assay). From the initial 337 putative positives obtained in the screen, we selected 13 clones that fulfilled our validation criteria: the ability to grow at 37°C only in galactose (Fig. 3). Sequencing of the pMyr (library) plasmids revealed that 11 of these clones corresponded to RNF2 (also known as RING1B, BAP1, DING, BAP-1, HIP13 and RING2), a PcG member with a role in chromatin remodeling and gene regulation. The PcG proteins were described originally in *Drosophila* as transcriptional repressors of homeotic genes during development (Lewis, 1978). RNF2 is a nuclear protein,

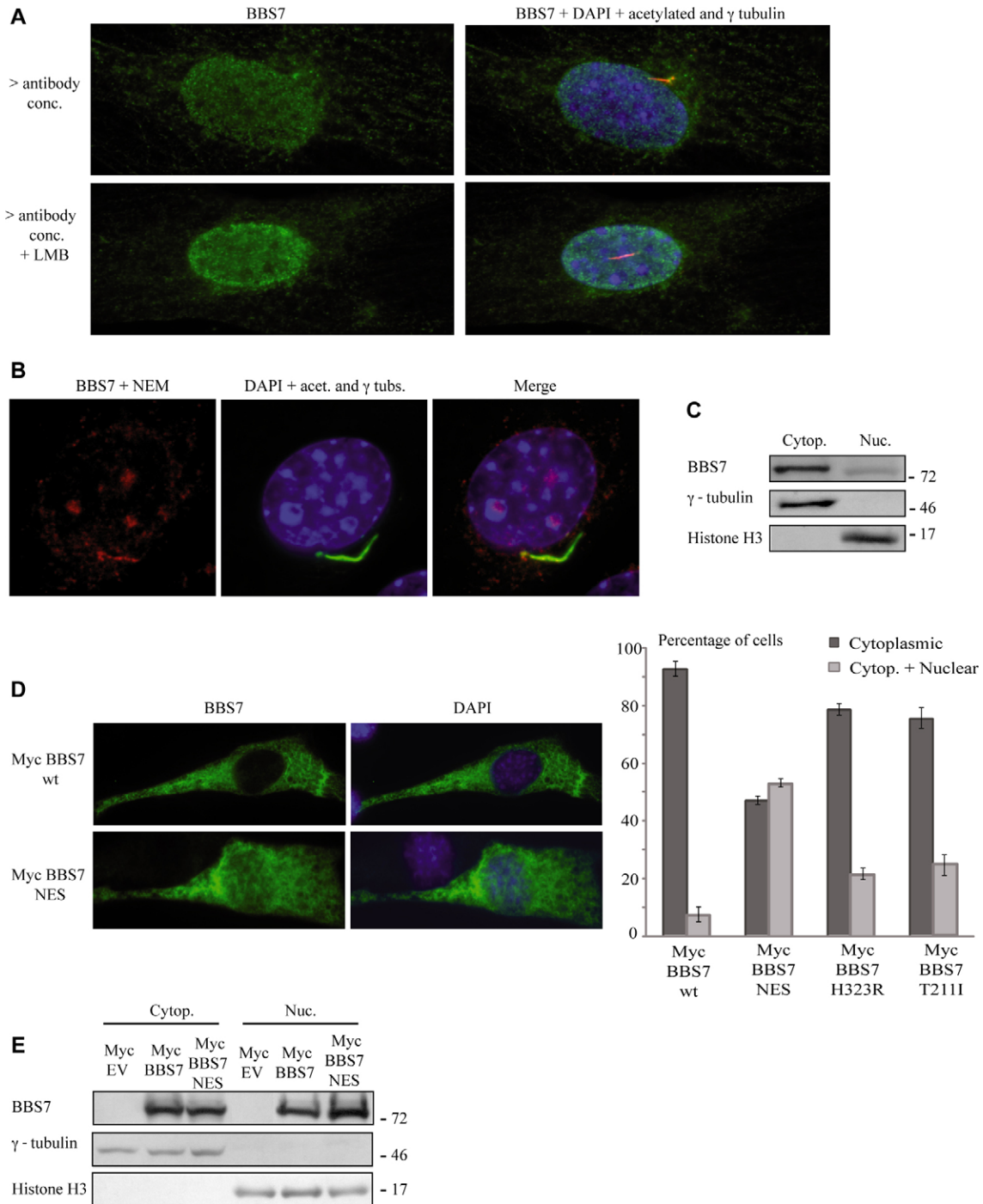


Fig. 2. BBS7 can enter the nuclear compartment. (A) Immunofluorescence staining of NIH3T3 with a high concentration of the BBS7 antibody in untreated cells (upper panel) and in cells treated with LMB (bottom panel). In both cases, BBS7 staining is shown in green in the left column, the merge with γ - and acetylated tubulin and DAPI is shown in the right column. (B) Immunofluorescence staining of NIH3T3 cells showing the formation of nuclear aggregates that are evident at normal concentrations of BBS7 antibody after treatment with NEM (red). The nucleus is stained with DAPI (blue) and the γ - and acetylated tubulin are shown in green. (C) Cell fractionation showing the presence of endogenous BBS7 in both cytoplasmic and nuclear compartments; antibodies against γ -tubulin and histone H3 were used as controls for each fraction. (D) Epifluorescence images of NIH3T3 cells expressing Myc-BBS7 wild-type (upper panel) and Myc-BBS7 NES (bottom panel) using an anti-Myc antibody (green). The graph shows the percentage of cells transfected with Myc-BBS7 wild-type, Myc-BBS7 NES and the BBS7 mutants H323R and T211I, showing either a cytoplasmic distribution with nuclear exclusion (categorized as cytoplasmic) versus cytoplasmic and nuclear staining. Values shown means \pm s.d. (E) Cell fractionation after transfection with Myc-EV, Myc-BBS7 wild-type and Myc-BBS7 NES showing that Myc-BBS7 NES is enriched in the nucleus; antibodies against γ -tubulin and histone H3 were used as controls.

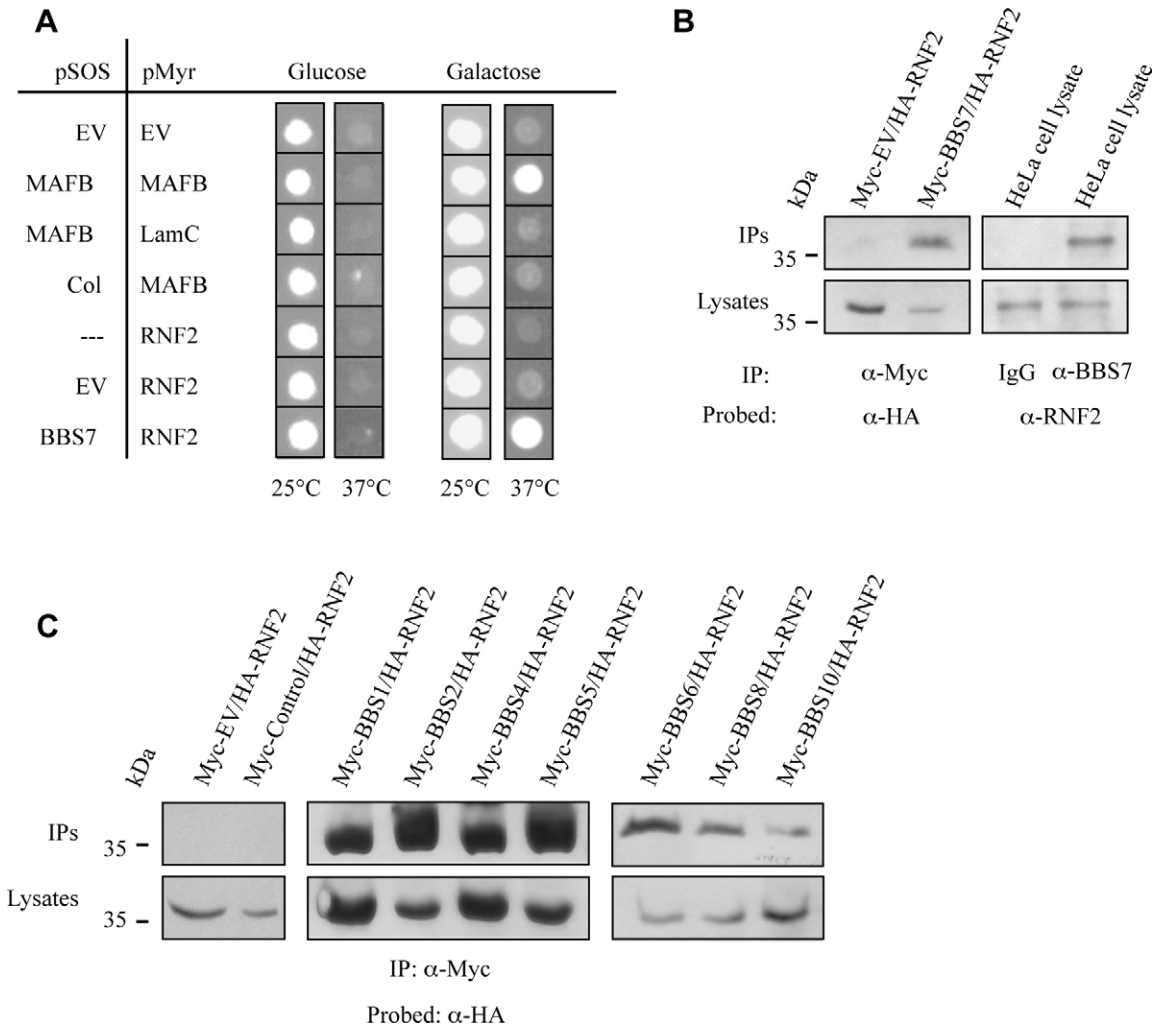


Fig. 3. BBS proteins interact with RNF2. (A) Cytoplasmic yeast two-hybrid screen using BBS7 as bait resulted in the identification of RNF2. True positives, MAFB-MAFB (positive control) and BBS7-RNF2 are shown growing at the restrictive temperature of 37°C only in galactose (condition in which the prey is expressed). Negative controls include MAFB-Lamin C, ColI-MAFB and both empty vectors, EV-EV. (B) Co-immunoprecipitation assays showing that BBS7 interacts with RNF2 in mammalian cells. Left: Cell lysates of HEK293 cells transiently expressing constructs (as indicated) were used to immunoprecipitate with an anti-Myc antibody. Both immunoprecipitates and cell lysates were analyzed by SDS-PAGE with an anti-HA antibody. Right: Endogenous BBS7 interacts with endogenous RNF2. Lysates of untreated HeLa cells were immunoprecipitated with an anti-BBS7 antibody and purified rabbit IgGs as control, and western-blotted with a mouse monoclonal anti-RNF2 antibody. (C) BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS6, BBS8 and BBS10, but not an unrelated protein (Myc-Control), can also interact with RNF2 in mammalian cells.

member of the polycomb repressive complex PRC1, that is thought to act as an E3 ubiquitin ligase that ubiquitylates lysine 119 of histone H2A (Schwartz and Pirrotta, 2007; Wang et al., 2004).

We first confirmed the BBS7-RNF2 interaction by testing for bait-prey dependency in yeast, showing that only cells containing both pSOS-BBS7 and pMyr-RNF2 were able to grow at the restrictive temperature of 37°C (Fig. 3A). To test whether the BBS7-RNF2 interaction can occur in mammalian cells, we performed co-immunoprecipitation assays (CoIP). We coexpressed epitope-tagged BBS7 (Myc-BBS7) and RNF2 (HA-RNF2) in cells and performed CoIPs. We were able to detect a single band of the expected size for RNF2 only in the samples where HA-RNF2 was coexpressed with Myc-BBS7 but not with the empty vector (Myc-EV; Fig. 3B, left panel). In addition, we immunoprecipitated BBS7 using our polyclonal

anti-BBS7 antibody and tested for the presence of RNF2 with a monoclonal antibody. We detected the RNF2 band only in the BBS7 immunoprecipitate but not when we used a purified rabbit IgG to perform the immunoprecipitation (Fig. 3B, right panel). This result supports the notion that BBS7 might exert at least part of its biological role in the nucleus. As mentioned earlier, up to 16 proteins have been causally linked to BBS. We therefore performed CoIPs using other Myc-tagged BBS proteins (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS6, BBS8 and BBS10) and both the empty vector and a non-related Myc-tagged protein as controls (Myc-EV and Myc-Control). HA-RNF2 was co-immunoprecipitated when coexpressed with all the BBS proteins tested but not with the controls (Fig. 3C). Thus, our data from both yeast and mammalian cells indicate that the nuclear protein RNF2 can interact with BBS7 and a number of other BBS proteins.

Several BBS proteins regulate the protein levels of RNF2

To understand the biological relevance of the BBS–RNF2 interaction, we analyzed the effect of depleting the protein level of several BBS proteins on basic parameters addressing the functionality of RNF2, such as its localization and expression both at the RNA and protein level. We first assessed the efficiency of our short hairpin (shRNA) constructs (pSUPER) by comparing *BBS1*, *BBS2*, *BBS4* and *BBS7* mRNA levels between cells transfected with pSUPER EV (control empty vector) and the corresponding targeting constructs (Fig. 4A; Fig. 5A; supplementary material Fig. S4). Upon evaluating endogenous RNF2 localization by immunocytochemistry in cells transfected with pSUPER BBS7, we did not observe any changes in the pattern of subcellular distribution of RNF2, which retained its nuclear localization (data not shown). Thus, BBS7 does not appear to be required for RNF2 to enter the nucleus.

Next, we looked at whether the BBS proteins might affect the protein levels of RNF2 by comparing the total amount of RNF2 in cells depleted not only of BBS7 but also of the other two members of this BBS sub-group of proteins, BBS1 and BBS2, as well as BBS4. We transfected HeLa cells (in triplicate) with either pSUPER EV or pSUPER BBS1, BBS2, BBS4 and BBS7, and analyzed RNF2 by western blot. We observed a marked increase in the protein levels of RNF2 upon depletion of each of

the four BBS proteins (Fig. 4A,B and data not shown). Moreover, although the effects of depleting BBS1, BBS4 and BBS7 were comparable (approximately 50% increase in RNF2 levels with respect to control cells), inhibition of BBS2 resulted in significantly higher amounts of RNF2 (>200% increase; see Fig. 4B). Although this result might reflect differences in the efficiency of the corresponding shRNAs (supplementary material Fig. S4), it is interesting to note that BBS2 is readily observable in the nuclear compartment by immunocytochemistry (supplementary material Fig. S5).

We then assessed whether the changes in RNF2 levels were due to altered gene expression by performing both semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) and real time PCR. We observed that in cells depleted for BBS7, the amounts of *RNF2* mRNA were decreased (Fig. 5A,B), suggesting that RNF2 might regulate its own transcription through a negative feedback loop. We have shown recently that depletion of BBS4 results in defective proteasome-mediated protein clearance, leading to the accumulation of β -catenin in BBS4 knockdown cells (Gerdes et al., 2007). Therefore, we tested whether depletion of BBS7 resulted in a similar proteasomal phenotype using the HEK293 ZsGreen proteasome sensor cell line in which the green fluorescent protein (GFP) is targeted constitutively for degradation (see Materials and Methods).

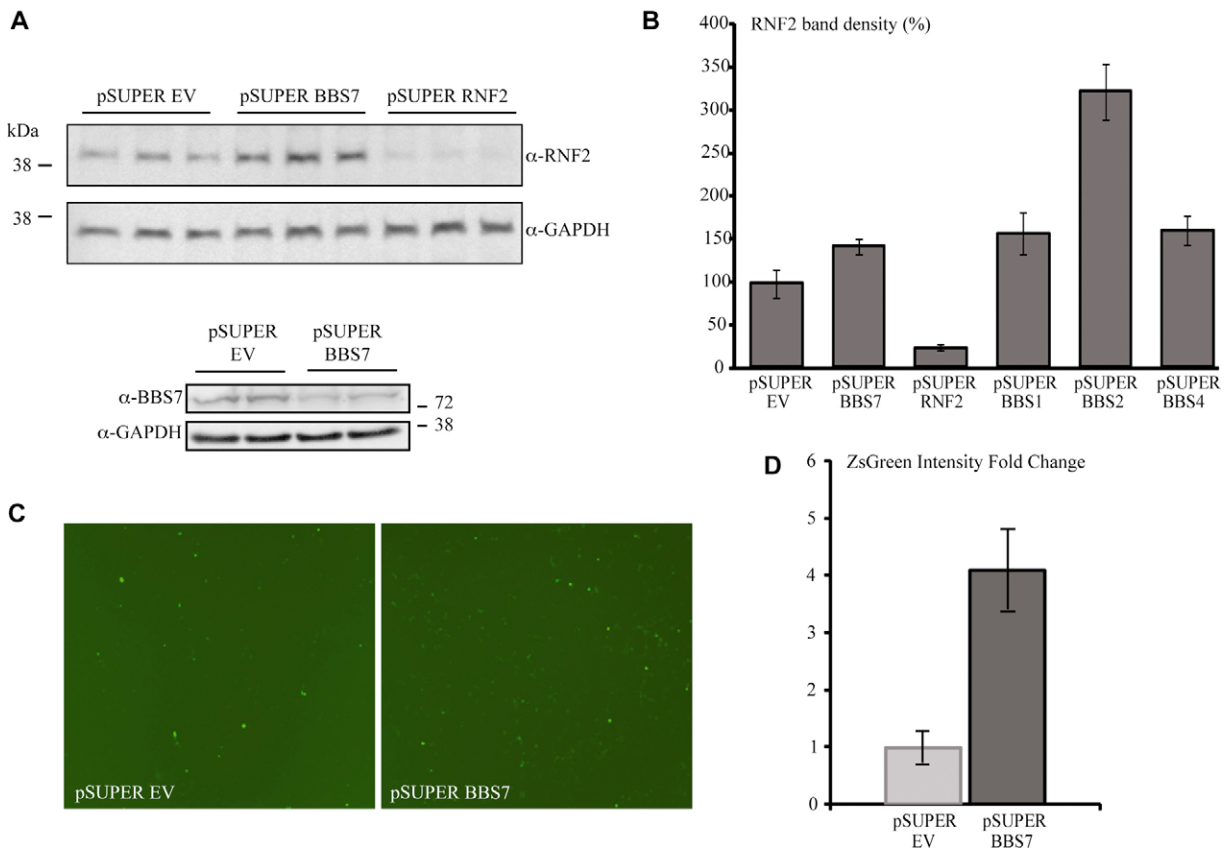


Fig. 4. Depletion of BBS proteins affects proteasome efficiency and RNF2 protein levels. (A) Western blots of cell extracts after transient inhibition of BBS7 and RNF2 with pSUPER vectors (using the empty vector, pSUPER EV, as control) and blotted with an anti-RNF2 antibody (upper panel) and an anti-BBS7 (lower panel). An anti-GAPDH antibody was used as a loading control. (B) RNF2 average band density quantification of the western blot (considering the three biological replicates), including the effect of the inhibition of BBS1, BBS2 and BBS4 (blots not shown). (C) Immunofluorescence image of HEK293 proteasome sensor line cells transfected with empty vector (left) and pSUPER BBS7 (right), showing the increased GFP signal in BBS7-depleted cells. (D) Quantification of the GFP signal measured by flow cytometry and expressed as fold change. Values shown means \pm s.d.

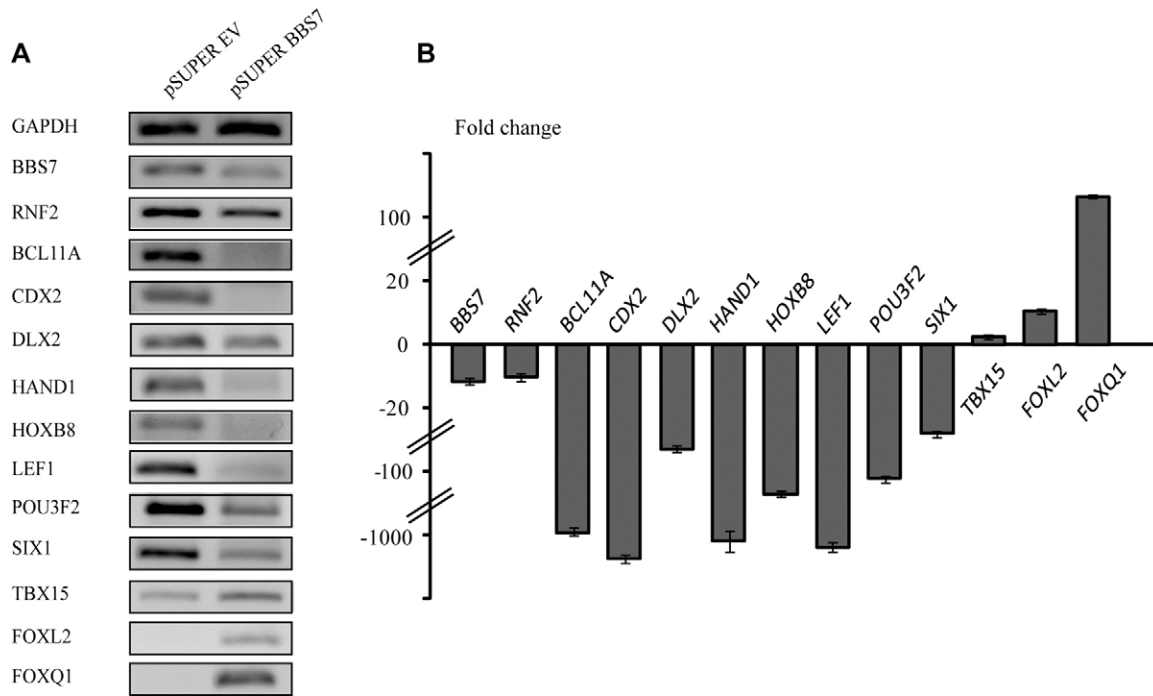


Fig. 5. BBS7 depletion alters the expression of RNF2 target genes. (A,B) Relative expression levels of *RNF2* and 11 previously identified RNF2 target genes analyzed by semi-quantitative (A) and Real Time RT-PCR (B) in BBS7-depleted cells (pSUPER BBS7) relative to control cells (pSUPER EV). *GAPDH* and *BBS7* were amplified as controls. The relative expression of each gene is shown as the fold change and the error bars represent the s.d. of replicates. The cross-bars in the y-axis indicate changes in the scale used.

Cells transfected with our pSUPER BBS7 construct showed an increase in GFP signal compared with pSUPER EV control cells (Fig. 4C). A quantification of total luminescence by flow cytometry showed a threefold increase in GFP signal in pSUPER BBS7 cells (Fig. 4D), indicating that the efficiency of proteasome-mediated protein degradation is compromised in BBS7 knockdown cells. Cumulatively, our results show that BBS1, BBS2, BBS4 and BBS7 have the capacity to downregulate RNF2 at the protein level, probably by affecting its rate of degradation.

Alterations in BBS7 protein levels result in the transcriptional misregulation of RNF2 target genes

Our data have raised the possibility that, in the absence of BBS proteins, RNF2 levels might be abnormally increased, possibly affecting the regulation of downstream targets of this PcG protein. To test this possibility, we selected a panel of 11 known RNF2 target genes (Boyer et al., 2006) and measured their mRNA levels both in control and in BBS7-depleted cells. We transfected HeLa cells with either the pSUPER EV or pSUPER BBS7 constructs, extracted total RNA 72 hours post-transfection and performed both semi-quantitative RT-PCR (Fig. 5A) and real time PCR (Fig. 5B). We observed significant changes in the levels of expression of all the genes tested. Consistent with the known role of RNF2 as a transcriptional repressor, the mRNA levels of *BCL11A*, *CDX2*, *DLX2*, *HAND1*, *HOXB8*, *LEF1*, *POU3F2* and *SIX1* were significantly lower in cells in which BBS7 was downregulated. By contrast, *TBX15*, *FOXL2* and *FOXQ1* were upregulated in BBS7-depleted cells. It is important to note that RNF2 has also been shown to be associated with transcriptionally active genomic regions, although the underlying

mechanism is not well understood (Bracken et al., 2006). To determine whether at least part of this effect is mediated by basal body- or cilia-related functions of the BBS proteins, we assessed the expression of a subset of RNF2 target genes in cells where ciliary function was perturbed. Although the effect was milder than the effects of knockdown of BBS7, depletion of the IFT anterograde molecular motor KIF3A phenocopies pSUPER BBS7, whereas depletion of the retrograde IFT particle IFT139 resulted in the opposite effect (supplementary material Fig. S6), suggesting that specific ciliary components might play a role in the regulation of RNF2 target genes.

Misregulation of RNF2 targets occurs in vivo

To assess whether BBS-dependent misregulation of RNF2 target genes might occur in vivo, we turned to a zebrafish model. We used translation-blocking morpholinos (MOs) at doses determined previously to affect *bbs7* or *bbs4* function (Zaghloul et al., 2010). Embryos injected with each MO presented the characteristic gastrulation defects reported previously, including poor somitic definition, shortened body axes and kinked notochords (Gerdes et al., 2007; Leitch et al., 2008; Ross et al., 2005; Stoetzel et al., 2006; Stoetzel et al., 2007; Zaghloul et al., 2010). We then performed whole-mount in situ hybridization to assess the expression of *bcl11a*, *six1b*, *pou3f2*, *hoxb8a* and *lef-1* at 30 hours post-fertilization (hpf; developmental stage Prim-15) in two independent injections and assessed 25–30 morphant embryos per probe. *bcl11a*, *pou3f2* and *lef-1* showed a reduction in expression in morphant embryos (Fig. 6A,C,E). Uninjected controls and embryos injected with a standard control MO expressed *bcl11a* prominently in the telencephalon and olfactory placode and mildly in the

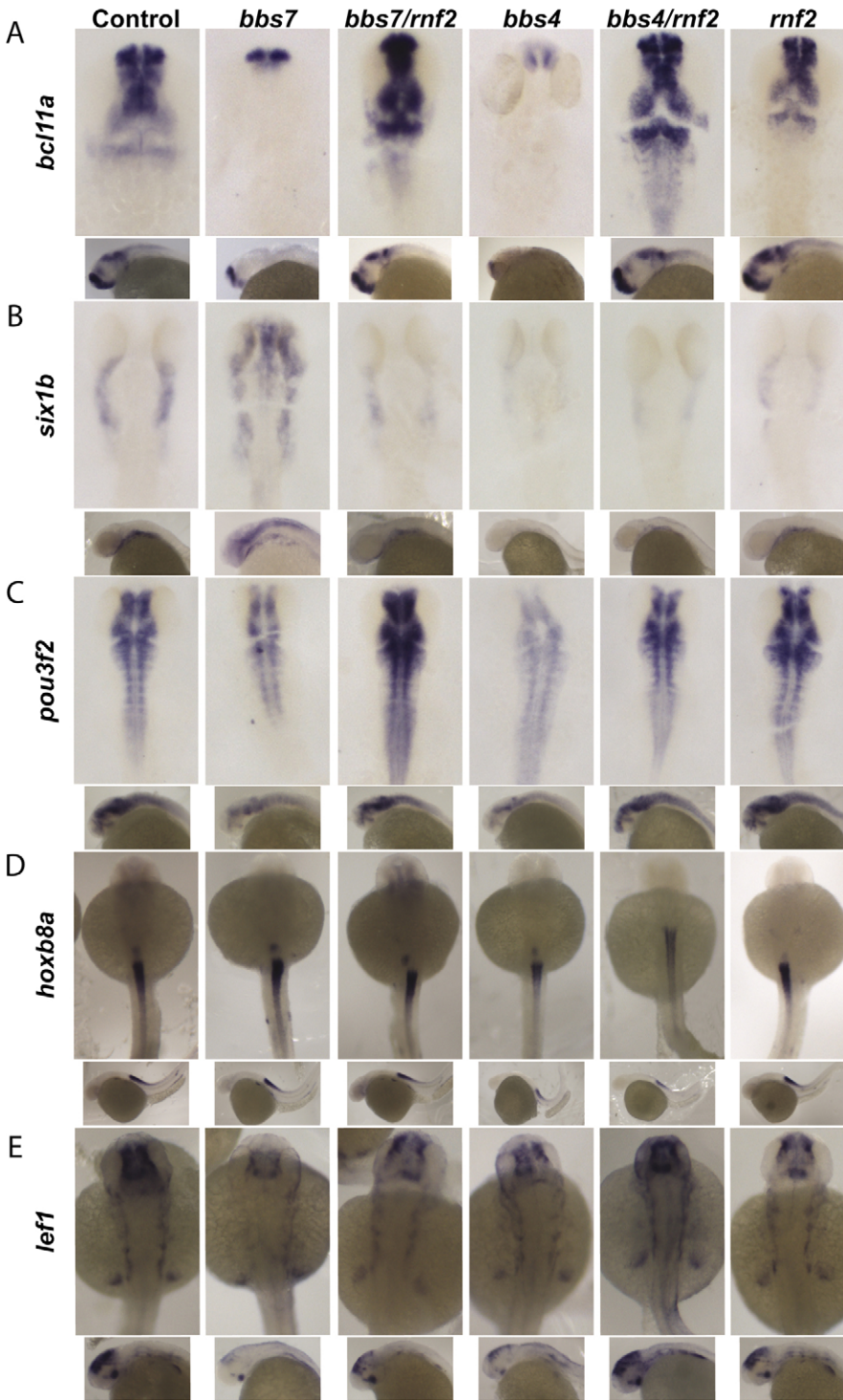


Fig. 6. In vivo misregulation of RNF2 target genes in zebrafish BBS morphants. (A–E) Embryos injected with *bbs7*, *bbs4* or *rnf2* MOs and stained by in situ hybridization at 30 hours post-fertilization using probes for *bcl11a*, *six1b*, *pou3f2*, *hoXB8a* and *lef1*. (A) Embryos injected with *bbs7* and *bbs4* MOs had significantly less staining of *bcl11a* than uninjected control embryos whereas co-injection of *bbs7/4* with *rnf2* rescued and even expanded the field of expression. (B) *six1b* show an altered pattern of expression with staining in the diencephalon in *bbs* morphants. (C) *pou3f2* staining showed lower levels of expression in *bbs7* and *bbs4* morphants, with rescue of expression in double morphants of *bbs7/rnf2* and *bbs4/rnf2*. (D) *hoXB8a* expression in *bbs7*, *bbs4* and double morphants with *rnf2* showed no significant difference in expression. (E) *lef1* expression is reduced in morphant embryos.

mesencephalon and hindbrain, whereas the *bbs7* and *bbs4* morphants exhibited significant reduction of expression in all structures, consistent with our cell-based predictions (Fig. 6A; supplementary material Fig. S7). Similarly, both *pou3f2* expression (Fig. 6C; supplementary material Fig. S7), normally observed in all structures of the brain and spinal cord, and *lef1* expression (Fig. 6E), which is typically expressed in the hypothalamus, diencephalon, tectum, midbrain hind-brain boundary, pectoral fin and branchial arches, were reduced in

morphant embryos. Levels of expression for *six1b* and *hoXB8a* did not appear to differ significantly between morphants and control embryos (Fig. 6B,D). However, the pattern of *six1b* expression was altered; whereas control embryos displayed expression in the branchial arches and otic vesicles, additional expression in the diencephalon of *bbs7* morphants and in the pectoral fin bud and hindbrain of *bbs4* morphants could be observed (Fig. 6B). *hoXB8a* expression patterns remained unchanged in morphants as compared with controls (Fig. 6D). Importantly, we did not

observe gross morphological defects that could be causing these changes in expression patterns (Fig. 6D; supplementary material Fig. S8). To confirm that these changes in gene expression are specific effects of depleting the bbs proteins, we used the standard control MO as an additional control and rescued the phenotype by co-injecting human *BBS4* and *BBS7* mRNA together with the corresponding MO. Importantly, whereas injecting the standard control MO neither affected the expression of *bcl11a* nor *pou3f2*, co-injection of *BBS4* and *BBS7* mRNAs with their corresponding MOs fully rescued the expression of both genes (supplementary material Fig. S7).

To determine whether the reduction in expression of *bcl11a*, *pou3f2* and *lef-1* in the *bbs* MOs was dependent on Rnf2, we investigated possible genetic interactions by using double injections of *bbs7* and *rnf2* or of *bbs4* and *rnf2*. The expression of *lef1* in the double morphants of *bbs7* and *rnf2* or *bbs4* and *rnf2* was partially rescued in all regions compared with *bbs7* and *bbs4* single morphants. Importantly, the expression of both *bcl11a* and *pou3f2* was not only rescued but was also expanded compared with controls. Expression of *bcl11a*, for example, was increased in the midbrain and expanded to the hindbrain, probably as a consequence of reducing *rnf2* to lower levels than in controls (Fig. 6A). In summary, our data indicate that *rnf2* target genes are misregulated in vivo in the absence of the bbs proteins, corroborating and assigning physiological relevance to our in vitro data.

Global analysis of BBS7 in gene regulation

Finally, we evaluated whether the role of the BBS proteins in gene regulation is restricted to their interaction with RNF2 or whether it extends beyond this particular PcG protein. We therefore performed a microarray-based analysis to visualize, in a global fashion, the changes in gene expression associated with the loss of BBS7 function. We transfected HeLa cells (in triplicate) with either pSUPER EV or pSUPER BBS7, extracted RNA and hybridized our samples onto a 4 × 44K Human Genome Oligo Microarray interrogating ≥41,000 unique human genes and transcripts arrayed in four replicas. This allowed us to compare our three biological samples as well as a technical dye swap control in a single experiment. After stringent quality control steps, we retained 18,872 probes corresponding to 13,420 unique features.

Our initial analysis showed a significant number of affected genes (for a complete list of genes with their corresponding *P*-values and log₂ fold change, see supplementary material Table S1). We ordered putative altered genes by their adjusted *P*-values and set an arbitrary cut-off at $P < 1 \times 10^{-5}$ and a log₂ fold

change of ±2 to define a set of differentially expressed (DE) transcripts for subsequent analyses (supplementary material Fig. S9 and Table S1). Because the decision of a cut-off value is arbitrary, we did not try to estimate the number or identity of genes affected by BBS7 function. Rather, we focused on confirming and possibly expanding on our previous results and determined whether genes known to be targeted by RNF2, or the other PcG proteins (SUZ12, EED and PHC1) for which lists of putative target genes have been reported (Boyer et al., 2006), are enriched in our DE dataset. From 7,275 analyzable genes that are not present in any of the PcG lists (NO group) (Table 1), 503 (6.9%) are present in our DE list of genes. However, 17% of targets of RNF2, 22% of targets of SUZ12, 25% of targets of EED, 20% of targets of PHC1 and 21% of genes with a PcG-dependent histone H3 trimethylation modification (H3K27) are DE (Table 1). Thus, our data show a significant enrichment of targets of RNF2 and all other PcG proteins tested in our dataset of genes affected by BBS7 depletion (Pearsons Chi-squared test, $\chi^2=457$, $df=6$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$). Importantly, an equivalent analysis using a PcG-independent group of developmental genes reportedly targeted by Cyclin D1 (Ctrl-neg group) (Bienvenu et al., 2010), showed that they were not significantly different to the NO group (Table 1).

Next, we performed an unbiased analysis of our data to avoid the need of establishing arbitrary cut-offs. We hypothesized that if a group of genes is preferentially altered in the absence of BBS7, these should present lower *P*-values than those genes that are a priori not linked to BBS7. We first tested whether genes included in the ciliary proteome (Gherman et al., 2006) (www.ciliaproteome.org) are preferentially affected in BBS7 knockdown cells and did not find a significant difference in the mean and distribution of their *P*-values compared with the genes in the array that are not present in the database (Fig. 7A, NO group). We then performed a similar analysis with the target genes of RNF2, SUZ12, EED and PHC1 and the H3K27 list, and compared their *P*-value distributions with those of the NO and Ctrl-neg groups. Importantly, our analysis revealed that the groups of genes associated previously with the PcG proteins presented significantly lower *P*-values than our two controls (Kruskal-Wallis Chi-squared test, $\chi^2=461.1358$, $df=6$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$; see Fig. 7B). Collectively, our data show that BBS7 probably participates in the regulation of target genes of RNF2 and other PcG proteins such as SUZ12, EED and PHC1. Finally, we performed an ontology analysis using the list of altered genes with *P*-values $< 1 \times 10^{-5}$ in an effort to delineate common biological processes or pathways that appear to be altered in the absence of BBS7. This analysis revealed an

Table 1. Targets of different PcG proteins are significantly affected in the absence of BBS7

	RNF2	SUZ12	EED	PHC1	H3K27	NO*	Ctrl-neg [†]
DE	97	105	82	103	241	503	51
Not DE	464	370	242	419	896	6772	679
Total	561	475	324	522	1137	7275	730
% DE	17	22	25	20	21	6.9	7

Analysis of genes reported to be targeted by the PcG proteins RNF2, SUZ12, EED and PHC1 and of genes with a histone PcG-dependent trimethylation modification (H3K27). The numbers and percentage of genes differentially expressed (DE) in the absence of BBS7 are given. We show a statistically significant enrichment of target of the different PcG proteins tested in our dataset (Pearsons Chi-squared test, $\chi^2=457$, $df=6$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$).

*NO corresponds to all the analyzable genes that are not present in any of the PcG lists.

[†]Ctrl-neg corresponds to reported targets of Cyclin D1 (Bienvenu et al., 2010).

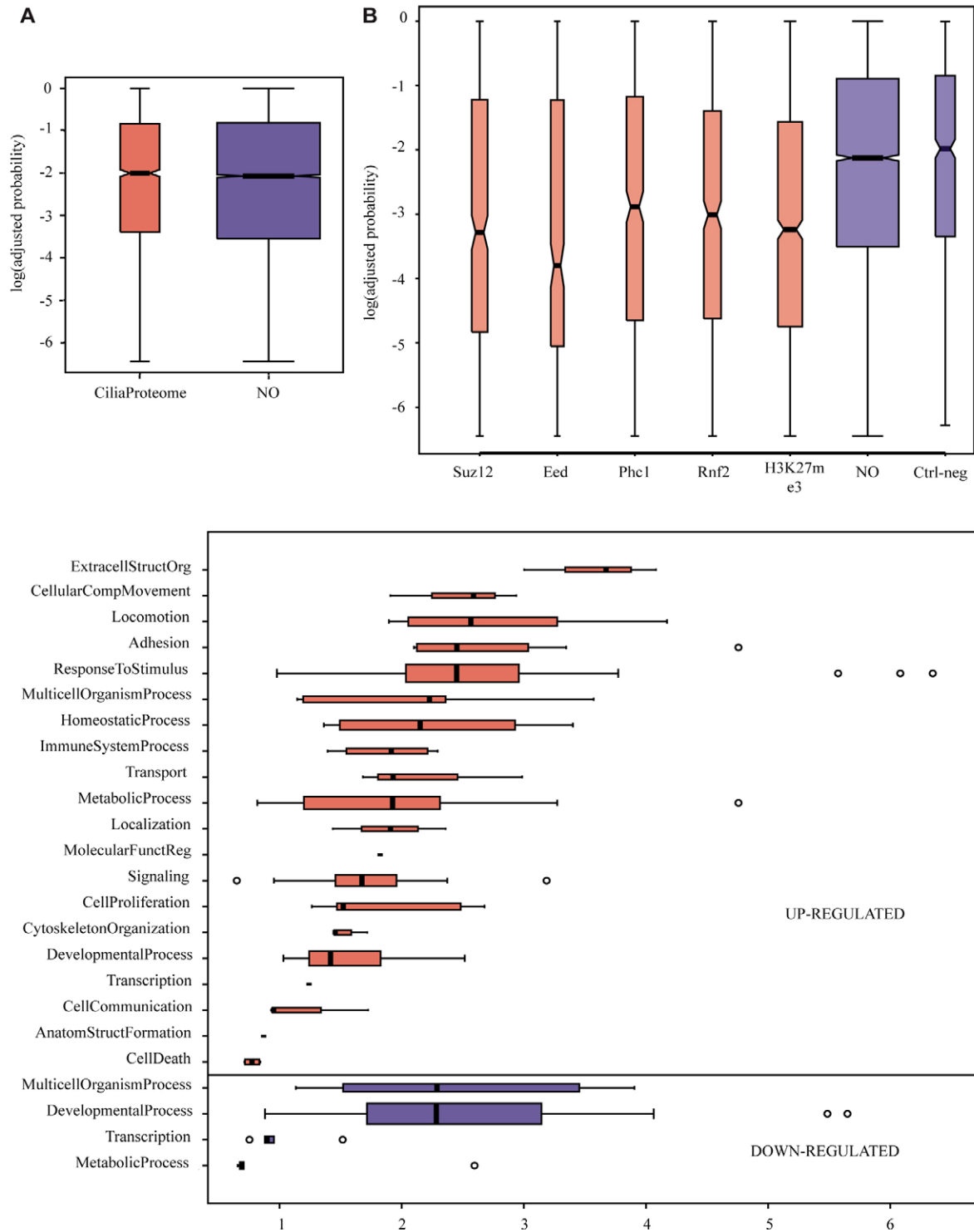


Fig. 7. Microarray analysis of BBS7-depleted cells. Transiently transfected HeLa cells were used to compare the transcriptional profile of control and BBS7-depleted cells. (A) Boxplot of the log P -values obtained in the microarray experiment for the genes included in the cilia proteome compared with the genes in the array that are not present in that database (NO). (B) Similarly, target genes for different PcG proteins (SUZ12, EED, PHC1 and RNF2) and for genes with the trimethylated H3K27 marker (H3K27me3) compared with the genes not present in those groups (NO) and also compared with the CCND1 target genes used as a negative control (Ctrl-neg). (C) Upregulated and downregulated genes (showing $P < 1 \times 10^{-5}$) in the absence of BBS7 were used in an ontology analysis. Ontology classes with an over-representation in our dataset are shown.

over-representation of genes involved in maintaining cellular homeostasis, cell organization, cellular interaction with the extracellular environment and, in general, genes playing a role

in developmental processes, a function that is consistent with the commonly associated roles of PcG target genes (Fig. 7C).

Discussion

Our deeper knowledge of ciliary biology has been instrumental in beginning to understand the phenotypic consequences of ciliary dysfunction. However, and despite these advances, little is known regarding the exact biological role of a number of ciliary proteins, both in the context of ciliary-dependent and ciliary-independent functions. Here, we increase the complexity associated with the BBS proteins by showing that these proteins are probably found in the nuclear compartment, albeit at reduced levels, where they are involved in the regulation of gene expression. Our data indicate that several BBS proteins are able to modulate RNF2 protein levels. Importantly, it has recently been shown that cilia are involved in the regulation of the mTOR pathway, a key regulator of protein synthesis in response to different extracellular stimuli (Boehlke et al., 2010; DiBella et al., 2009). As such, although we cannot discard the possibility that cilia-dependent perturbation of mTOR signaling might affect the protein levels of RNF2, our proteasome data indicate that the effect of the BBS proteins on RNF2 is probably achieved by affecting its turnover. Given that all the BBS proteins tested in this study are able to interact with RNF2, at least in overexpressing conditions, it is possible that this regulatory activity over RNF2 occurs in the context of a complex, either the BBSome or a different BBS complex. Supporting this possibility, whereas depletion of either BBS7, BBS1, BBS2 or BBS4 resulted in a marked increase in RNF2, overexpression of a single BBS protein was not sufficient to reduce the levels of the PcG protein (data not shown).

The physiological relevance of the nuclear localization of the BBS proteins is supported by several observations. First, the vast majority of BBS proteins present NES motifs, and in the case of BBS7 this signal appears to be functional. Second, whereas depleting BBS1, BBS2, BBS4 and BBS7 results in increased RNF2 levels, inhibition of BBS2, which appears to be abundantly present in the nuclear compartment, provoked the most prominent effect on RNF2 abundance. Third, two *BBS7* mutations found in patients, H323R and T211I (Badano et al., 2003), result in increased nuclear localization of the protein. Those mutants retain the ability to bind RNF2 (data not shown) and behave as dominant negatives in a zebrafish-based *in vivo* rescue assay (Zaghloul et al., 2010). Therefore, our data might prove relevant to the understanding of this *in vivo* effect. However, we note that these mutations are not predicted to affect the NES motif tested in this work (located around residues 625–634). One possibility is that these mutations affect protein–protein interactions required for efficient nuclear export. Proteins that are subjected to NES-mediated nuclear export physically interact not only with the karyopherin receptor CRM1 (also known as exportin 1 or XPO1) but also might need adaptor proteins mediating the interaction and a number of other moieties, such as RanGTP (Fornerod et al., 1997; la Cour et al., 2004; Sorokin et al., 2007). In addition, the activity of a NES signal might be regulated by binding of additional proteins and post-translational modifications (la Cour et al., 2004), aspects that could also be affected by these mutations. Finally, there are examples of proteins, such as actin from *S. cerevisiae*, that contain more than one functional NES signal (Wada et al., 1998). Interestingly, one of the scores provided by the NetNES server presents a peak centered on residue 218 of BBS7 that is diminished by the T211I mutation (supplementary material Fig. S10).

In this scenario, elucidating what regulates the activity or subcellular localization of proteins such as BBS7 will be crucial to completely understand their function. In addition, and given that BBS7 and RNF2 can interact in the cytoplasm at least in yeast, understanding whether the interaction of BBS7 with RNF2 is restricted to the nuclear compartment or can also occur outside of it is also important. Our data suggest that the localization of BBS7 appears to be variable in terms of its presence in the ciliary axoneme and possibly in terms of its ability to enter the nucleus. The localization of the BBS proteins might be altered in response to specific cellular or ciliation stages or upon the activation of signaling cascades that operate through the cilium. Moreover, our data indicate that the presence of cilia might mediate the role of BBS7 in the regulation of RNF2, given that knockdown of the anterograde motor KIF3A results in a mild misregulation of RNF2 target genes that resembles the effect of depleting BBS7. Consistent with this notion, depletion of other ciliary components such as IFT139, a protein that has been causally linked to the pathogenesis of several ciliopathies (Davis et al., 2011), also participates in the regulation of different RNF2 targets although the exact mechanism remains to be elucidated.

Importantly, the ability of ciliary proteins to enter the nucleus is not restricted to the BBS proteins. Inversin, mutated in nephronophthisis (NPHP2); polycystin 1, altered in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD); and NEK1, a centrosomal protein mutated in mouse models of cystic kidney disease, have also been reported in the nucleus (Hilton et al., 2009; Nürnberger et al., 2002; Yoder et al., 2002). Likewise, OFD1, the protein mutated in the ciliopathy orofaciocigital syndrome type I (OMIM 311200), has also been shown to have this capacity and has been linked to gene regulation by its association with a histone acetyltransferase (Giorgio et al., 2007). Interestingly, recent data highlights striking similarities between the process of nuclear import and that of targeting to the ciliary compartment. It has been shown that the molecular motor KIF17 possesses a ciliary localization signal that is similar to classic NLS motifs. Furthermore, Dishinger and colleagues have shown that importin- β 2 and RanGTP, key proteins in nuclear translocation, are present in the cilium and are required for KIF17 ciliary targeting (Dishinger et al., 2010). In this context, we speculate that mechanisms similar to nuclear export could also function to actively regulate the composition of the ciliary compartment.

Lastly, our data both provide an extensive list of genes whose expression is potentially affected in the absence of the BBS proteins and also show that not all the genes identified as differentially expressed in our cell-based assays will be aberrantly expressed *in vivo*. Nevertheless, the fact that the BBS proteins affect the expression of key developmental regulators, such as targets of the PcG, might provide an important clue to the cellular basis of the different clinical manifestations that characterize BBS and other ciliopathies. For example, we show that depletion of BBS7 results in downregulation of *SIX1* in our cell-based assays and probably results in ectopic expression in zebrafish *bbs* morphants at the Prim-15 stage. Murine *Six1* is implicated in the formation of specialized sensory structures, placodes, as well as other developmental aspects of the sensory system, findings that might be relevant to the thermosensory defects recently reported in BBS animals and patients (Christophorou et al., 2009; Tan et al., 2007). Likewise, *SIX1* has been also implicated in processes such

as epithelial–mesenchymal transitions (EMT) (Micalizzi et al., 2009), potentially providing clues to the increased fibrosis observed in the kidney phenotype of BBS and other ciliopathies.

In summary, moieties such as the BBS proteins might provide a link between the cilium and the interior of the cell, relaying different types of signals and, finally, exerting their role through the regulation of gene transcription. Further studies will be needed to understand the nature of the signal(s) that modulate the activity of the BBS proteins, their capacity to enter the nucleus, their association with RNF2 and possibly other PcG proteins, and the extent of their involvement in gene regulation. Understanding the type of genes that are ultimately affected by the function of proteins such as the BBSs will provide significant insight into the pathogenesis and cellular basis of the ciliopathies.

Materials and Methods

Yeast two-hybrid screen

We performed the Cytotrap yeast two-hybrid screen following the manufacturer's instructions (Stratagene). We amplified the complete ORF of BBS7 from HeLa cDNA by PCR using the *Pfu* high fidelity DNA polymerase (Stratagene) and using primers that were tagged with *Sall* and *NotI* restriction sites. We cloned the ORF of BBS7 into the pSOS vector (bait) and used a fetal brain library cloned in the pMyr vector (prey; Stratagene) for the screen.

Mammalian expression constructs and mutagenesis

The complete ORF of *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS10*, *RNF2* and an unrelated control gene (Myc–Control in Fig. 1) were cloned into pCMV-Myc and HA mammalian expression plasmids (Clontech). To generate the I634A mutant, we designed primers introducing the change and performed site-directed mutagenesis using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit following the manufacturer's instructions (Stratagene). Both the H323R and T211I mutants were previously generated (Zaghloul et al., 2010).

Cell culture, transfections and LMB treatment

HeLa, Hek293 and NIH3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (at PAA or Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) at 37°C in 5% CO₂. Transfections were performed using the Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen). For nuclear export inhibition, cells were incubated with LMB at a concentration of 50 ng/ml.

Co-immunoprecipitation assays

For co-immunoprecipitations (CoIP) we grew HEK293 cells in 10-cm dishes and co-transfected them with the appropriate pCMV-Myc construct and the pCMV-HA RNF2 plasmid when needed. We harvested cells 48 hours after transfection (or at desired confluency for endogenous CoIPs) by incubating them for 15 minutes at 4°C in CoIP buffer (150 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl pH 7.5 and 1% Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma) and 1 mM sodium orthovanadate. Cell lysates were further incubated at 4°C for 15 minutes with vortexing and then centrifuged for 15 minutes at 13,000 *g* at 4°C. For CoIP, we incubated cell lysates overnight and under rotation at 4°C with either 8 µg of monoclonal anti-Myc antibody or our rabbit polyclonal anti-BBS7 antibody immobilized onto a mix of protein A and protein G Sepharose beads (Invitrogen). We washed the beads using CoIP supplemented buffer, resuspended the samples in loading buffer, boiled them for 5 minutes and analyzed them by western blot using a monoclonal anti-HA (Sigma) or a mouse monoclonal anti-RNF2 antibody (Abnova).

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, either HeLa or NIH3T3 cells were grown on glass coverslips. At 24 hours post-transfection when appropriate or at desired confluency, cells were fixed in –20°C methanol for 10 minutes, blocked with 5.5% FBS for 1 hour and incubated with the appropriate primary antibody at room temperature for 2 hours. We then used secondary antibodies coupled to either Tetramethylrhodamine or Alexa Fluor 488 (Invitrogen) for visualization by both fluorescent and confocal microscopy. We used 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain DNA.

Antibodies

We used rabbit polyclonal antibodies raised against specific synthetic peptides for BBS7 and BBS2 for immunocytochemistry assays. We used monoclonal antibodies to Myc, HA, γ -tubulin and acetylated tubulin (Sigma), a rabbit polyclonal antibody to GAPDH (Abcam) as western blot control, a mouse

monoclonal antibody against RNF2 (H00006045-M01, Abnova) and a donkey polyclonal antibody against BBS7 (Santa Cruz Biotechnology) for western blot.

RNA interference

For the expression of short interfering RNAs (siRNAs) we selected our 19-nucleotide target sequences in the genes of interest using the siDESIGN center (Dharmacon). We cloned the hairpins into the pSUPER vector by designing oligonucleotides containing our 19-nucleotide target sequences according to the manufacturer's instructions (OligoEngine). Positive clones were confirmed by restriction enzyme digestion and direct sequencing. We transfected cell cultures with either pSUPER EV (control empty vector), pSUPER BBS7, BBS1, BBS2, BBS4 or pSUPER RNF2 and harvested cells after 72 hours for both protein and RNA extraction. The IFT139 targeting sequence was cloned into the pCAGMir30 vector (Addgene) and the hairpins for KIF3A and IFT88 were expressed using the pSHAG Magic construct (Open Biosystems).

Cell fractionation and western blot analysis

We obtained cytoplasmic and nuclear fractions using the Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen). For the gene inhibition experiments, we harvested cells 72 hours after transfection with the pSUPER constructs, prepared cell lysates as described for CoIP, quantified protein using the BCA method (Sigma), loaded equal amounts on SDS-PAGE and analyzed the samples by western blot. The quantification of western blot bands was performed using the ImageJ software (NIH).

RT-PCR and real time PCR

To test both the efficiency of knockdown of our constructs as well as the effect of depleting BBS7 on different target genes (primers are available from the authors upon request), we harvested cells 72 hours after transfection and extracted total RNA with Trizol (Invitrogen) following the provider's instructions, prepared cDNA using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) and used this cDNA as template in either limited-cycle PCR or real time PCR. For real time PCR we followed SYBR green incorporation using the Quantimix Easy SYG KIT (BioTools) in a Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). All real time PCR reactions were performed in biological and PCR duplicates. The threshold cycle (CT) value for each gene in the panel was normalized to *GAPDH*, calculating the Δ Ct for each gene in all samples (replicates of pSUPER EV and pSUPER BBS7). The comparative CT method ($\Delta\Delta$ Ct method) was used to determine the relative quantity of the target genes, and the fold change in expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

In vivo analysis of gene expression

Morpholinos (MOs) against zebrafish *bbs4* (1.5 ng), *bbs7* (6 ng), *rnf2* (0.5 ng) and a standard control (5 ng) were obtained from Gene Tools. The standard control targets a human β -globin intronic mutation and does not have a target in zebrafish. Wild-type zebrafish embryos at a one- to two-cell stage were injected with 1 nl of each solution. Zebrafish were collected at the Prim15 stage. Whole-mount in situ hybridizations were carried out using antisense probes for *bcl11a*, *six1b*, *pou3f2*, *hoxb8a* and *lef-1* made from clones (Openbiosystems) and following a published protocol (Thisse and Thisse, 2008). Further processing included clearing in methyl salicylate, flat mounting when needed, and photographing with a Nikon SMZ-745T Zoom Stereo Photo Microscope at a 5 \times magnification using a 5.0-megapixel DS-Fi1 color digital camera head. Rescues were performed by co-injecting the MOs with the corresponding human wild-type mRNA that was transcribed in vitro using the SP6 Message Machine Kit (Ambion).

Microarray: sample preparation and chip hybridization

Total RNA from pSUPER EV control and pSUPER BBS7 cells was isolated by Trizol (Invitrogen). The concentration and integrity of RNA was determined using a NanoDrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and a 2100 Bioanalyzer (Agilent) with an RNA 6000 Nano LabChip Kit, using the Eukaryote Total RNA Nano assay according to the manufacturer's instructions. RNAs with an RNA integrity number (RIN) greater than 8 were used. Microarray analysis was performed using a 4 \times 44K Human Genome Oligo Microarray (G4112F, Agilent), in a two-color design. The Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent) was used to generate fluorescent complementary RNA (cRNA) for the microarray hybridizations. Briefly, we amplified and labeled 1 µg of total RNA using the Cy5-CTP or Cy3-CTP dyes. Equal amounts of labeled samples (pSUPER EV and pSUPER BBS7) were hybridized to the arrays at 65°C for 17 hours in a rotating oven (Agilent). Arrays were washed with the wash buffers 1 and 2 and the stabilization and drying solutions from Agilent. Slides were scanned on an Agilent DNA microarray scanner, and microarray data were extracted with Agilent's Feature Extraction software (v9.5). Three biological and one technical dye swap replicates were performed and a total of four arrays were analyzed.

Microarray data analysis

Data analysis was accomplished in 'R' (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>), mainly through packages in the Bioconductor suite (Gentleman et al., 2004). Differential expression was assayed using the limma software package (Smyth, 2005) and the ontology analysis conducted with GOstats (Falcon and Gentleman, 2007). Probes were flagged for filtering considering saturation, signal above background and uniformity. Probes that had any of the replicates flagged were eliminated. Absolute values of correlations between the M-values exceeded 0.83 and displayed expected bivariate distributions (data not shown). Genes were considered differentially expressed when the multiple testing adjusted *P*-value was $<1 \times 10^{-5}$ and the absolute value of log₂ of fold change greater than 2 (supplementary material Fig. S5).

Acknowledgements

We thank Florencia Irigoín and Pablo Aguilar for their critical comments on the manuscript and Norann Zaghoul for her comments and experimental advice.

Funding

This study was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII-Innova) and Fondo Clemente Estable (FCE) [grant number PR_FCE_2009_1_2382 to J.L.B.]; by the National Institute of Child Health and Development [grant number R01HD04260 to J.K.]; and by the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney disorders, National Institutes of Health [grant numbers R01DK072301, R01DK075972 to N.K.]. J.L.B. is supported by the Genzyme Renal Innovations Program (GRIP). J.L.B., C.G., G.L., M.C.-R., S.A., C.R. and H.N. are supported by the 'Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas' (PEDECIBA), and by ANII-Innova, Uruguay. N.K. is a Distinguished Brumley Professor. Deposited in PMC for release after 12 months.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.089375/-DC1>

References

- Ansley, S. J., Badano, J. L., Blacque, O. E., Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., Kim, J. C., Ross, A. J., Eichers, E. R., Teslovich, T. M. et al. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **425**, 628-633.
- Badano, J. L., Ansley, S. J., Leitch, C. C., Lewis, R. A., Lupski, J. R. and Katsanis, N. (2003). Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 650-658.
- Badano, J. L., Leitch, C. C., Ansley, S. J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R. A., Beales, P. L., Dietz, H. C., Fisher, S. and Katsanis, N. (2006a). Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **439**, 326-330.
- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. and Katsanis, N. (2006b). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **22**, 125-148.
- Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J. E., Meyer, C. A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G. M., Cole, M. F., Odom, D. T., Odajima, J. et al. (2010). Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature* **463**, 374-378.
- Blacque, O. E., Reardon, M. J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M. R., Ansley, S. J., Badano, J. L., Mah, A. K., Beales, P. L., Davidson, W. S. et al. (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev.* **18**, 1630-1642.
- Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M. et al. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1115-1122.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K. et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-353.
- Bracken, A. P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K. H. and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **20**, 1123-1136.
- Cardenas-Rodriguez, M. and Badano, J. L. (2009). Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **151C**, 263-280.
- Christensen, S. T., Pedersen, S. F., Satir, P., Veland, I. R. and Schneider, L. (2008). The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr. Top. Dev. Biol.* **85**, 261-301.
- Christophorou, N. A., Bailey, A. P., Hanson, S. and Streit, A. (2009). Activation of Six1 target genes is required for sensory placode formation. *Dev. Biol.* **336**, 327-336.
- Davis, E. E., Zhang, Q., Liu, Q., Diplas, B. H., Davey, L. M., Hartley, J., Stoetzel, C., Szymanska, K., Ramaswami, G., Logan, C. V. et al. (2011). TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat. Genet.* **43**, 189-196.
- DiBella, L. M., Park, A. and Sun, Z. (2009). Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 595-606.
- Dishinger, J. F., Kee, H. L., Jenkins, P. M., Fan, S., Hurd, T. W., Hammond, J. W., Truong, Y. N., Margolis, B., Martens, J. R. and Verhey, K. J. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat. Cell Biol.* **12**, 703-710.
- Falcon, S. and Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* **23**, 257-258.
- Fan, Y., Esmail, M. A., Ansley, S. J., Blacque, O. E., Borojevich, K., Ross, A. J., Moore, S. J., Badano, J. L., May-Simera, H., Compton, D. S. et al. (2004). Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 989-993.
- Fliegauf, M., Benzing, T. and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 880-893.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J. et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80.
- Gerdes, J. M., Liu, Y., Zaghoul, N. A., Leitch, C. C., Lawson, S. S., Kato, M., Beachy, P. A., Beales, P. L., Demartino, G. N., Fisher, S. et al. (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat. Genet.* **39**, 1350-1360.
- Gerdes, J. M., Davis, E. E. and Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**, 32-45.
- Gherman, A., Davis, E. E. and Katsanis, N. (2006). The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat. Genet.* **38**, 961-962.
- Giorgio, G., Alfieri, M., Praticchizzo, C., Zullo, A., Cairo, S. and Franco, B. (2007). Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4397-4404.
- Goetz, S. C. and Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 331-344.
- Hilton, L. K., White, M. C. and Quarimby, L. M. (2009). The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 52-56.
- Holaska, J. M. and Paschal, B. M. (1998). A cytosolic activity distinct from Crm1 mediates nuclear export of protein kinase inhibitor in permeabilized cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14739-14744.
- Jin, H., White, S. R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S. P., Bazan, J. F. and Nachury, M. V. (2010). The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* **141**, 1208-1219.
- Kim, J. C., Badano, J. L., Sibold, S., Esmail, M. A., Hill, J., Hoskins, B. E., Leitch, C. C., Venner, K., Ansley, S. J., Ross, A. J. et al. (2004). The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat. Genet.* **36**, 462-470.
- Kim, J. C., Ou, Y. Y., Badano, J. L., Esmail, M. A., Leitch, C. C., Fiedrich, E., Beales, P. L., Archibald, J. M., Katsanis, N., Rattner, J. B. et al. (2005). MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1007-1020.
- Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N. et al. (2010). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* **329**, 1337-1340.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9112-9117.
- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527-536.
- 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. (2008). Hypomorphic mutations in syndromic encephalocoele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **40**, 443-448.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Li, J. B., Gerdes, J. M., Haycraft, C. J., Fan, Y., Teslovich, T. M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O. E., Li, L., Leitch, C. C. et al. (2004). Comparative genomic identification of conserved flagellar and basal body proteins that includes a novel gene for Bardet-Biedl syndrome. *Cell* **117**, 541-552.
- Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J. M., Mandel, J. L. and Dollfus, H. (2009). Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1820-1825.
- May-Simera, H. L., Ross, A., Rix, S., Forge, A., Beales, P. L. and Jagger, D. J. (2009). Patterns of expression of Bardet-Biedl syndrome proteins in the mammalian cochlea suggest noncentrosomal functions. *J. Comp. Neurol.* **514**, 174-188.

- Micalizzi, D. S., Christensen, K. L., Jedlicka, P., Coletta, R. D., Barón, A. E., Harrell, J. C., Horwitz, K. B., Billheimer, D., Heichman, K. A., Welm, A. L. et al. (2009). The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *J. Clin. Invest.* **119**, 2678-2690.
- 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. (2007). A core complex of bbs proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* **129**, 1201-1213.
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N. and Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202.
- Nürnberg, J., Bacallao, R. L. and Phillips, C. L. (2002). Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3096-3106.
- Otto, E. A., Hurd, T. W., Airik, R., Chaki, M., Zhou, W., Stoetzel, C., Patil, S. B., Levy, S., Ghosh, A. K., Murga-Zamalloa, C. A. et al. (2010). Candidate exome capture identifies mutation of SDCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy. *Nat. Genet.* **42**, 840-850.
- Ross, A. J., May-Simera, H., Eichers, E. R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D. J., Leitch, C. C., Chapple, J. P., Munro, P. M., Fisher, S. et al. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* **37**, 1135-1140.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 9-22.
- Smyth, G. K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor* (ed. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry and W. Huber), pp. 397-420. New York: Springer.
- Sorokin, A. V., Kim, E. R. and Ovchinnikov, L. P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **72**, 1439-1457.
- 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. (2006). BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat. Genet.* **38**, 521-524.
- Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E. E., Zaghoul, N. A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C. C., Sarda, P. et al. (2007). Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 1-11.
- Tan, P. L., Barr, T., Inglis, P. N., Mitsuma, N., Huang, S. M., Garcia-Gonzalez, M. A., Bradley, B. A., Coforio, S., Albrecht, P. J., Watnick, T. et al. (2007). Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 17524-17529.
- Thisse, C. and Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59-69.
- Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. and Nishida, E. (1998). Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.* **17**, 1635-1641.
- Wallingford, J. B. and Mitchell, B. (2011). Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev.* **25**, 201-213.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-878.
- Yoder, B. K., Hou, X. and Guay-Woodford, L. M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2508-2516.
- 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. (2010). Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10602-10607.