



**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA**

**Facultade de Medicina**

**Departamento de Fisioloxía**

## **TESIS DOCTORAL**

***Estudio funcional del gen pelota***

**Autora: MARTA CUERVO LÓPEZ**

**Director: JUAN ZALVIDE TORRENTE**

**Santiago de Compostela, 2009**



**D. JUAN ZALVIDE TORRENTE**, Profesor Titular perteneciente al Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICA QUE:

el trabajo titulado *“Estudio funcional del gen pelota”*, presentado por **Dña. Marta Cuervo López** para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, y que, considerando que cumple las condiciones necesarias, lo considera finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, Febrero de 2009.

Fdo. Juan Zalvide Torrente

Fdo. Marta Cuervo López



*A mi familia.*

Porque dicen que la familia que le toca a uno es una lotería, y mi hermana dice que tengo suerte en los juegos. Va a tener razón.



A ver por donde empiezo.

Después de tanto escribir resulta que aún me quedan páginas en blanco por llenar, a las que me tengo que enfrentar para, espero, hacer algo más que escribir una larga serie de nombres. Es interminable la lista de personas a las que, por uno u otro motivo tengo que agradecer cada pedacito de este trabajo, sin las cuales, y de eso estoy segura, nada hubiese sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a Chito el haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender un sinfín de cosas, así como el haber tenido tanta paciencia conmigo y mis impuntualidades. A Celia, por sus sabias aportaciones.

A Anxo y Carmen, por estar siempre dispuestos a echar una mano con sus conocimientos y consejos, y a Susana Bravo, en especial por su ayuda técnica en algunas partes de este trabajo.

A la gente del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en especial a mis compañeros de laboratorio, tanto a los que se han ido como a los que todavía continúan peleándose con sus experimentos: a Martita, mi compañera durante todos estos años, por tener siempre una sonrisa en los labios y las manos dispuestas a ayudar; a Gonzalo y Miguel Estravís, por ampliar considerablemente mi cultura musical; a Milo, gran amigo y mejor persona; a Gloria, por haber inaugurado a su llegada los JJ, que se vieron irremediabilmente condenados al olvido; a Miguel Fidalgo; por tantas respuestas que me ha dado; a Daniel Torrecilla, por tantos chistes descabellados y mesas torturadas; a Óscar, persona irrepetible; a Pepe Pardo; a Vanesa; a María; a Lola; a Daniel Cacabelos; a Adriana; a Antía; a Pili; a Isa; a Ruth; a Iria y a Teresa. A todos ellos gracias por soportar estoicamente mis acaparaciones de cámara y mis constantes preguntas, y por todo lo que he aprendido de ellos, no sólo en el laboratorio.

A la gente de Microscopía Confocal, en especial a Merchi y Raquel, por conseguir que después de todo no fuera tan pesado tantas horas delante de un microscopio.

A mis amigos, que sin tener nada que ver con estos temas, han aguantado mis largas peroratas sin sentido, y sobre todo por conseguir sacarme de casa en malos momentos. A Vane, por ser un gran apoyo y por nuestros interminables intentos de arreglar el mundo, por nuestras colegas belgas (como no) y por esas desigualdades de la vida que se constituyen por sí mismas las mejores; a Ángela, por esos cafés y cañas que tan bien sientan siempre. A Tino, por haber aparecido en el momento adecuado.

A Miguel, porque, pese a todo, ha tenido mucho que ver en todo esto.

## *Agradecimientos*

A la gente de la UETeM, en donde soy una recién llegada en esta recta final, que han sabido hacer que una se sienta como en casa.

A mis padres, de los cuales todavía no acabo de comprender esa fe ciega en mí. A mi hermana, por dejarme colarme de vez en cuando en su habitación para charlar un ratillo. A mi abuela, porque se lo merece.

Y por qué no a Carmen Amoraga, Nicole Krauss, Fernando Aramburu y demás amigos, por ser una gran vía de escape.

Gracias.

*"C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante".*

*"Le Petit Prince" Antoine de Saint - Exupéry*

*"I can never read all the books I want,*

*I can never be all the people I want and live all the lives I want.*

*I can never train myself in all the skills I want.*

*And why do I want?*

*I want to live and feel the shades, tones*

*and variations of mental and physical experience possible in life.*

*And I am horribly limited."*

**Silvia Plath**



## INDICE

### I. Introducción

<b>1. El gen <i>pelota</i> .....</b>	<b>19</b>
1.1. Mutantes de <i>pelota</i> en <i>D. melanogaster</i> .....	21
1.2. Dom34 en <i>S. cerevisiae</i> .....	24
1.3. <i>Pelota</i> en el desarrollo de mamíferos .....	27
<b>2. La traducción de proteínas .....</b>	<b>29</b>
2.1. Los factores de liberación de la traducción (RFs) .....	32
<b>3. Degradación del mRNA (<i>mRNA turnover</i>) .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Mecanismos de control de calidad del mRNA .....</b>	<b>41</b>
4.1. Nonsense – mediated mRNA decay (NMD) .....	41
4.2. NonStop mRNA decay (NSD) .....	45
4.3. No - Go decay (NGD) .....	48
<b>5. El ciclo celular y su regulación.....</b>	<b>50</b>
5.1. Progresión a lo largo del ciclo celular.....	54
<b>6. Interferencia de RNA (RNAi) .....</b>	<b>58</b>
6.1. Mecanismo de funcionamiento de la interferencia de RNA.....	60
6.2. RNAi como herramienta experimental .....	63

<b>II. Objetivos.....</b>	<b>67</b>
---------------------------	-----------

### III. Materiales y métodos

<b>1. Cultivo celular .....</b>	<b>73</b>
1.1. Líneas celulares empleadas y mantenimiento.....	73
1.2. Tripsinización .....	74
1.3. Contaje celular.....	74
1.4. Congelación de líneas celulares .....	74
1.5. Descongelación de líneas celulares .....	75

1.6. Sincronización con timidina .....	75
1.7. Transfecciones .....	76
<b>2. Modificaciones enzimáticas del DNA .....</b>	<b>80</b>
2.1. Corte con enzimas de restricción.....	81
2.2. Ligado de fragmentos de DNA.....	81
<b>3. Electroforesis en geles de agarosa .....</b>	<b>82</b>
3.1. Aislamiento de fragmentos de DNA después de la electroforesis en geles de agarosa.....	83
<b>4. Plásmidos y RNA de interferencia.....</b>	<b>83</b>
4.1. Relación de plásmidos empleados.....	83
4.2. Construcción de plásmidos y RNA de interferencia .....	88
<b>5. Aislamiento de ácidos nucleicos .....</b>	<b>90</b>
5.1. Transformación de bacterias competentes.....	90
5.2. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) .....	92
5.3. Aislamiento de DNA plasmídico a gran escala (maxiprep) .....	93
5.4. Aislamiento de ARN total a partir de cultivos celulares .....	94
<b>6. Análisis de mRNA .....</b>	<b>95</b>
6.1. RT – PCR.....	95
<b>7. Análisis de genes reporter .....</b>	<b>100</b>
7.1. Ensayos luciferasa y betagalactosidasa.....	100
<b>8. Citometría de flujo .....</b>	<b>103</b>
<b>9. Inmunofluorescencia .....</b>	<b>105</b>
<b>10. Análisis de proteína .....</b>	<b>107</b>
10.1. Obtención de extractos proteicos totales de cultivos celulares .....	107
10.2. Cuantificación de extractos proteicos.....	108
10.3. Western-Blot .....	109
10.4. Inmunoprecipitación .....	113
10.5. Proteómica.....	114

## IV. Resultados

<b>1. Subclonado de la secuencia codificante del gen <i>pelota</i>.....</b>	<b>119</b>
<b>2. Comprobación del funcionamiento de los shRNAs.....</b>	<b>121</b>
<b>3. El gen <i>pelota</i> y el ciclo celular .....</b>	<b>123</b>
3.1. La expresión de <i>pelota</i> no varía a lo largo del ciclo celular.....	123
3.2. La inhibición del gen <i>pelota</i> no produce efectos aparentes en el ciclo celular de las líneas celulares estudiadas.....	126
<b>4. La proteína codificada por el gen <i>pelota</i> localiza intracelularmente en el citoplasma .....</b>	<b>130</b>
<b>5. Estudio de las implicaciones de <i>pelota</i> en mecanismos de control de calidad del mRNA .....</b>	<b>142</b>
5.1. Vectores reporter.....	142
5.2. No Go mRNA Decay .....	145
5.2.1. No existen evidencias del mecanismo de No – Go decay en las líneas celulares humanas empleadas (HEK 293 y HCA2 – hTERT).	
5.2.2. La inhibición de la proteína codificada por el gen <i>pelota</i> no produce ningún tipo de variación en los vectores reporter del No – Go en las líneas celulares estudiadas.	
5.2.3. La sobreexpresión del gen <i>pelota</i> no induce el mecanismo de No – Go decay.	
5.3. Non Stop mRNA Decay .....	155
5.3.1. No existen evidencias del mecanismo de Non – Stop decay en la línea celular humana HEK 293.	
5.3.2. La inhibición de la proteína codificada por el gen <i>pelota</i> no produce ningún tipo de variación en los vectores reporter del Non Stop en las líneas celulares estudiadas.	
5.3.3. La sobreexpresión del gen <i>pelota</i> no induce el mecanismo de NonStop Decay.	
<b>6. Proteómica.....</b>	<b>163</b>

<b>V. Discusión</b> .....	169
<b>VI. Conclusiones</b> .....	183
<b>VII. Bibliografía</b> .....	187

## ABREVIATURAS

**GSCs:** *Germinal Stem Cells*

**BMPs:** *Bone Morphogenetic Proteins*

**Dpp:** *Decapentaplegic*

**Gbb:** *60A – glass bottom boat*

**eRF:** *eukaryotic release factor*

**PABP:** *PoliA Binding Protein*

**NMD:** *Nonsense – mediated Decay*

**UPF:** *Up – frameshifts*

**ORF:** *Open Reading Frame*

**PTC:** *Premature Termination Codon*

**EJC:** *Exon Junction Complex*

**SMG:** *Suppresor with morphological effect on genitalia*

**NSD:** *NonStop Decay*

**NGD:** *NoGo Decay*

**CDK:** *Cyclin – Dependent Kinase*

**CDKI:** *Cyclin – Dependent Kinase Inhibitor*

**PTGS:** *Post – Transcriptional Gene Silencing*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**siRNAs:** *Short interfering RNAs*

**miRNAs:** *Micro RNAs*

**shRNAs:** *Short Hairpin RNAs*

**RNAi:** *RNA Interference*

**RISC:** *RNA – Induced Silencing Complex*

**HEK293:** *Human Embrionary Kidney*

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*

*Abreviaturas*

**CFP:** *Cyan Fluorescent Protein*

**MMLV:** *Moloney Murine Leukemia Virus*

**Pwo:** *Pyrococcus woessii*

**β – gal:** *β galactosidase*

**FACS:** *Fluorescent – Activated Cell Sorting*

**PVDF:** *Polyvinylidene Fluoride*

**GAPDH:** *Glyceraldehyde 3 – Phosphate Dehydrogenase*

**MALDI – TOF:** *Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*

**Hsp:** *Heat Shock Protein*

# I. INTRODUCCIÓN

*“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”*

Isaac Newton



## **El gen *pelota***

La primera identificación del gen *pelota* tuvo lugar cuando se llevó a cabo un screening de mutagénesis basado en el elemento P en busca de mutantes machos estériles (Castrillon et al. 1993). Dado que el fenotipo obtenido en los mutantes fueron alteraciones en la espermatogénesis, empezaremos esta sección con un resumen de la espermatogénesis en *D. melanogaster*.

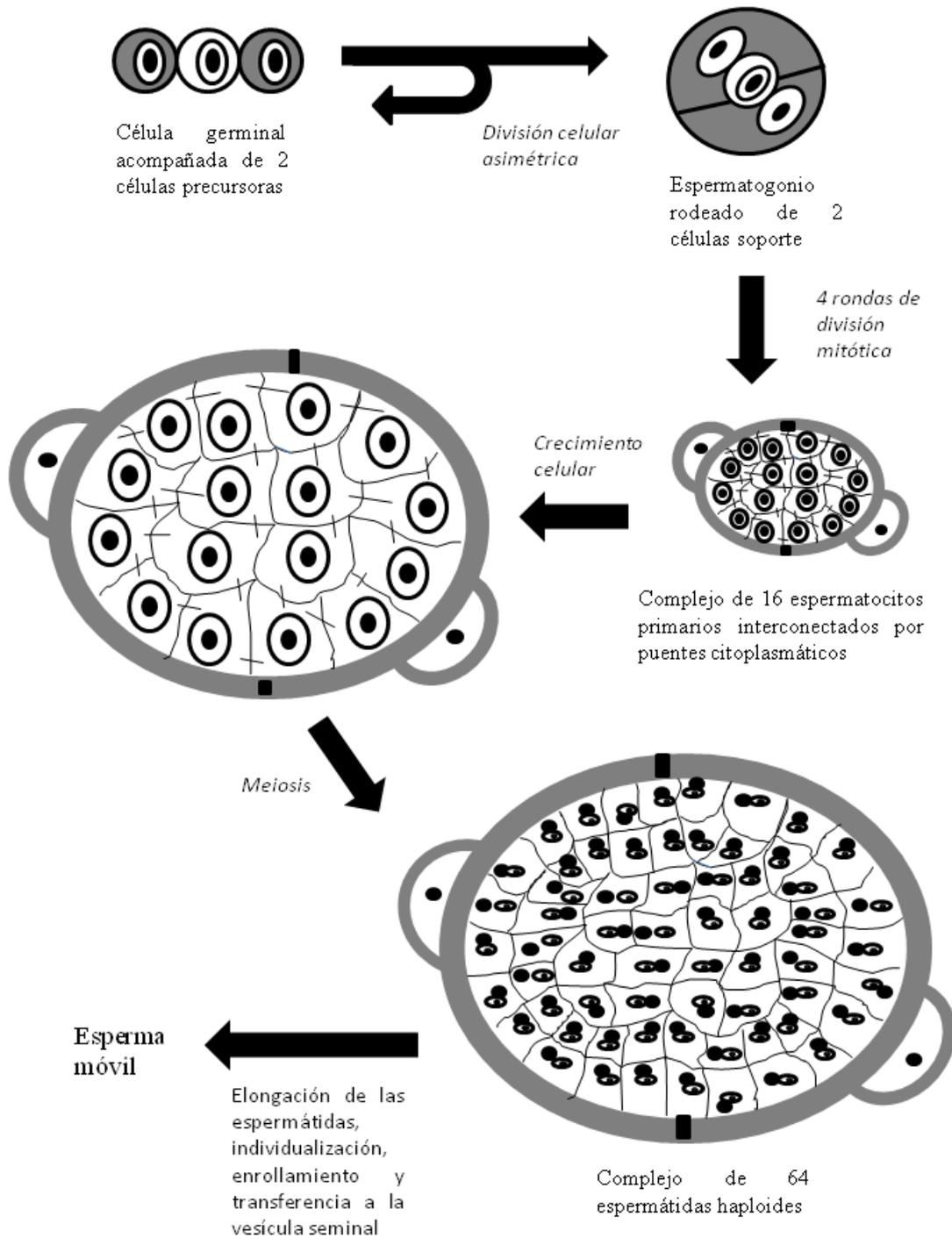
### **Espermatogénesis en *Drosophila melanogaster*.**

La espermatogénesis en *Drosophila* comienza con la formación del espermatogonio a partir de una población de células madre germinales, que se encuentran en un extremo del testículo, que en *Drosophila* tiene forma de tubo. El espermatogonio sufre un número determinado de divisiones mitóticas seguidas de crecimiento celular, meiosis y diferenciación celular. El programa completo desde las células germinales hasta la formación de esperma funcional requiere 10 días, y es iniciado cada 10 horas, con lo cual todos los estadios de la espermatogénesis están presentes en el testículo adulto.

El proceso de espermatogénesis se compone de diferentes fases, en las cuales partiendo de una célula germinal acompañada de dos células precursoras se llega a la formación de esperma funcional. Para ello, las células sufren una serie de divisiones celulares desiguales: mientras que las células germinales parentales permanecen unidas a una estructura especializada de origen somático, las células hijas (una espermatogonia y dos células que la rodean) se liberan de la unión e inician un programa de diferenciación. Una serie de cuatro rondas de divisiones mitóticas da lugar a la formación de un complejo de 16 espermatocitos primarios interconectados por puentes citoplasmáticos. A continuación, estos espermatocitos inician una fase de crecimiento en la que aumentan 25 veces su volumen. Los espermatocitos primarios entran en meiosis, dando lugar a 64 espermátidas haploides. El núcleo en cada espermátida se reforma y la mitocondria se fusiona para formar el derivativo mitocondrial o nebenkern. Estas espermátidas se transformarán en esperma maduro a través de un complejo proceso de citodiferenciación, que implica condensación

Introducción

nuclear, así como la elongación del axonema y otras estructuras para formar la cola. El paso final es la individualización, proceso por el cual las espermátidas elongadas se recubren de su propia membrana y el enrollamiento, lo que causa que el complejo de 64 espermátidas pase a la base del testículo, desde donde el espermatozoides correcto es transferido a la vesícula seminal para su almacenamiento.



*Figura 1. Espermatogénesis en Drosophila melanogaster. A partir de una célula germinal acompañada de dos células precursoras se forma el esperma funcional. Para ello tienen lugar una serie de divisiones mitóticas seguidas de crecimiento celular, meiosis y diferenciación celular. El programa completo de formación requiere 10 días y se inicia cada 10 horas.*

### **El gen *pelota* y la espermatogénesis en *D. melanogaster*.**

Como resultado del análisis que se ha mencionado al principio, fueron aisladas e identificadas 83 mutaciones autosómicas que daban lugar a machos estériles, de las cuales la mayoría afectaba a la espermatogénesis, con defectos que iban desde la no proliferación de las células germinales a la producción de esperma defectivo.

Uno de los mutantes más interesantes se denominó *pelota*. Analizando el arresto de la meiosis en estos mutantes, se vio que el fenotipo parecía completamente normal hasta llegar al estadio de espermatocito de 16 células. A continuación, los mutantes para *pelota* no eran capaces de entrar en las divisiones meióticas responsables de la reducción nuclear, pero sin embargo eran capaces de continuar el proceso de diferenciación. En los complejos de espermátidas de los mutantes, los núcleos se volvían pálidos y homogéneos, pero permanecían tan grandes como el núcleo del espermatocito. La mitocondria se fusionaba para formar un nebenkern grande y anormal. A partir de este momento tiene lugar muy poca diferenciación, y se ven muy pocos complejos elongados. El fenotipo del macho estéril mutante de *Drosophila* recuerda al que aparece en los mutantes para *twine*, un homólogo de *cdc25* de *Drosophila*, a algunas combinaciones heteroalélicas de la mutación *haywire* y a tres mutaciones ligadas al cromosoma X que producen machos estériles. En todas estas mutaciones la diferenciación postmeiótica ocurre en ausencia de reducción nuclear.

Cuando se estudiaron en detalle los mutantes machos de *pelota* en *Drosophila* y la relación de sus fenotipos con los de otros genes responsables de la regulación de meiosis I y II, como *twine*, *string* o *roughex* (Eberhart y Wasserman, 1995), se vio que durante la espermatogénesis, las divisiones mitóticas y la fase de crecimiento suceden

## Introducción

de una forma normal. El primer defecto aparente es un fallo de la división celular meiótica, que da lugar a la acumulación de espermatocitos que presentan una parada en el ciclo celular. Esta parada tiene lugar muy pronto en la meiosis o bien antes de que esta tenga lugar, ya que no se observan estructuras características de la metafase o la anafase. Por analogía con las divisiones mitóticas, este punto de control se denomina transición G2/M meiótica, ya que tras la fase G2 tan extensa, debería producirse la entrada en meiosis. Sin embargo, aunque las divisiones meióticas no tengan lugar en espermatocitos, otros aspectos de la espermatogénesis relacionados con la diferenciación postmeiótica o espermiogénesis continúan, dando lugar a espermátidas tetraploides con estructuras de cabeza y cola, un fenotipo idéntico como se ha dicho al que presentan los mutantes para *twine*. El gen *twine* es un homólogo en *Drosophila* de *cdc25* de *S. pombe*, una conocida fosfatasa, reguladora universal del ciclo celular.

Para definir el arresto de la espermatogénesis en mutantes homocigotos de *pelota* en mayor detalle, se analizaron tres eventos importantes que ocurren durante la meiosis I: la condensación de los cromosomas, la formación del huso y la rotura de la envoltura nuclear. En espermatocitos que presentan un arresto del ciclo, los cromosomas están parcialmente condensados, pero nunca se mueven de la periferia del núcleo, mientras que en los normales la condensación ocurre de una forma rápida al final de la profase, en la periferia del núcleo, tras lo cual se mueven hacia el centro del núcleo una vez están totalmente condensados. Los mismos niveles de condensación de DNA se observaron en espermatocitos mutantes para *twine*.

Durante la meiosis normal la envoltura nuclear se rompe y las lamininas que la constituyen se dispersan, formando nubes difusas en torno a la cromatina, para volver a asociarse cuando la envoltura nuclear se forme de nuevo. En los espermatocitos mutantes para *pelota* la envoltura nuclear no se rompe. De nuevo, este fenotipo es similar al de los mutantes para *twine*, en donde la envoltura nuclear permanece intacta durante el arresto inicial y las lamininas son degradadas más adelante junto con las estructuras de cabeza y cola que se han formado en la diferenciación de las espermátidas.

La formación del huso es el tercer evento central dentro de la meiosis. Durante la fase de crecimiento, los microtúbulos forman una red difusa en el citoplasma celular, que permanece hasta que las células están maduras. Al final de la profase meiótica, tras la separación de los centrosomas hacia los polos de la célula, la red se rompe y se forma el huso. En espermatocitos mutantes para *pelota*, los microtúbulos permanecen en el citoplasma. Los centrosomas se separan, pero no completan su migración y no forman el áster, con lo que nunca se observa el huso. Una vez más, un fenotipo idéntico aparece en los mutantes *twine*.

*Pelota* parece ser también necesario para el desarrollo correcto del ojo, ya que mutantes homocigotos *Drosophila* presentan ojos con un tamaño más pequeño y con omatidios desorganizados. En este caso, este fenotipo es similar al de los mutantes para el gen *roughex*, siendo este un gen regulador de la meiosis II.

### **Papel de *pelota* en la oogenesis de *Drosophila melanogaster*.**

Desde que se hizo la primera caracterización de *pelota* en espermatogénesis, se observó que la mutación de este gen también afectaba al ovario, aunque de forma más sutil que al testículo. De hecho, la mutación de *pelota* también producía esterilidad en hembras, que presentaban ovarios pequeños y con muy pocos oocitos. En un primer momento se creyó que la falta de *pelota* afectaba a la mitosis además de a la meiosis, pero un análisis más detallado reveló que la mutación de este gen producía un efecto más interesante si cabe que la simple afectación del ciclo celular.

En el ovario de *Drosophila*, la autorenovación de las células madre germinales (GSCs) es un proceso fundamental para asegurar su continuidad. Estas células se encuentran dentro del ovario en una estructura denominada germarium, que está en el extremo anterior de los ovariolos que conforman el ovario. En el extremo anterior del germarium, existen células somáticas que constituyen un nicho que apoya a dos o tres células germinales. Una de estas últimas células se divide para generar dos células hijas, una que sigue manteniendo el contacto con las células somáticas y sufre un proceso de regeneración a célula germinal, la otra que se separa de las células

somáticas y se diferencia en un cistoblasto. El cistoblasto se divide cuatro veces con una citocinesis incompleta, dando lugar a un complejo de 16 células, de las cuales una se convierte en oocito y el resto en células de apoyo (*nurse cells*). La autorenovación de las GSCs está controlada tanto por factores intrínsecos como por factores extrínsecos procedentes de las células somáticas del germarium (*niche signals*), entre los que se encuentran las señales BMPs (*bone morphogenetic proteins*): Dpp (*Decapentaplegic*) y Gbb (*60A – glass bottom boat*). Por ejemplo, una disminución de las señales BMP da como resultado la pérdida de células madre germinales como consecuencia de la diferenciación mientras que la sobreexpresión de Dpp en el germarium produce tumores.

Un estudio reciente ha demostrado la implicación de *pelota* en este proceso de autorenovación de las células madre germinales (Xi et al. 2005), proponiendo que es necesaria para bloquear una ruta de diferenciación distinta de otra ya conocida, que depende del gen Bam. *Pelota* es necesaria en las células madre germinales (GSCs) para el mantenimiento, renovación y división de las mismas, así como para la supervivencia del complejo.

### **DOM34 en *S. cerevisiae*.**

La proteína DOM34 de *S. cerevisiae* es un 32% idéntica y un 55% similar a *pelota* a nivel aminoacídico, y se considera el homólogo de *pelota* en levadura. Estudios de cepas defectivas para este gen en *S. cerevisiae* (*dom34Δ*) mostraron que la proteína era importante tanto en la división mitótica como en la meiosis en levaduras (Davis y Engebrecht, 1998). En primer lugar se vio que los mutantes de Dom34 crecían más lentamente que las cepas salvajes y presentaban un retraso del ciclo celular a nivel de la fase G1. Además, Dom34 también parecía ser necesaria para la esporulación así como para la formación de pseudohifas. Curiosamente, los defectos provocados por la falta de *pelota* parecían depender de alteraciones en la traducción de proteínas, porque RPS30A, un gen que codifica para la proteína ribosomal S30, es un supresor del fenotipo. Además, el perfil de polirribosomas aparecía alterado en estas cepas, en las que disminuían sus niveles a la vez que aumentaban los de subunidades ribosomales

libres, perfil que era restaurado a los niveles de las cepas salvajes por la supresión del fenotipo de las cepas *dom34Δ* por *RPS30A*. Estos datos, junto con el hecho de que en la secuencia de Dom34 aparecía una región que presentaba una alta similitud con una porción de eRF1 (*eukariotic release factor 1*), llevaron a los autores a sugerir un posible papel para Dom34p en la traducción proteica.

Por último, la expresión heteróloga de *pelota* era capaz de suplir las deficiencias que presentaban los fenotipos de las cepas *dom34Δ*, siendo este proceso de complementación la prueba de la homología funcional de ambos homólogos, así como de la conservación de la función a lo largo de la evolución.

### **Interacciones de Dom34**

Mediante un ensayo de doble híbrido, Dom34p fue identificada como una proteína que interaccionaba con Hbs1p, una proteína no esencial para el crecimiento de levaduras, pero que resultaba ser importante para un crecimiento eficiente y la síntesis de proteínas en condiciones que limitaban el inicio de la traducción (Carr – Schmidt et al. 2002). Dom34p interacciona con el dominio C terminal de Hbs1p *in vivo*. Esta proteína presenta un elemento característico de las proteínas G, además de regiones con similitud de secuencia con el factor de elongación de la traducción eEF1A y el factor de liberación de la traducción eRF3. eEF1A se encarga de llevar el aminoacil – tRNA al sitio A del ribosoma durante el proceso de traducción, mientras que eRF3 interviene en el proceso de terminación de la traducción. Además, comparte similitudes en su secuencia con Ski7p, una proteína implicada en la degradación de mRNA mediada por el exosoma. Además, Hbs1p es una proteína capaz de unir GTP *in vitro*, lo que sugiere que pertenece a la familia de las proteínas G.

### **Funciones de Dom34**

Dom34, junto con Hbs1, han sido relacionadas con un nuevo mecanismo de control de calidad del mRNA recientemente descrito, denominado NoGo Decay (Doma and Parker, 2006), que comentaremos más adelante. Este complejo proteico parece

ser el efector para este mecanismo, que reconoce y degrada mRNAs que presentan alguna alteración en su estructura capaz de causar un bloqueo del ribosoma durante la traducción, y que se caracteriza por ser iniciado por una rotura endonucleolítica del mRNA objeto de degradación en un lugar cercano a donde ha quedado detenido el ribosoma.

### **Estructura cristalina de Dom34**

Recientemente, un par de estudios han establecido la estructura cristalina de Dom34 (Lee et al. 2007; Graille et al. 2008). En el primero de ellos estudian la estructura cristalina de Dom34 de *Thermoplasma acidophilum* (*Ta pelota*). La identidad de secuencia de esta proteína es del 26% con la humana, 22% con *D. melanogaster* y 21% con *S. cerevisiae*. Los dominios 2 y 3 se asemejan a los correspondientes de eRF1 humano, aunque carecen del motivo GGQ presente en el dominio 2 de los factores de liberación de clase I, responsable de la actividad hidrolítica del centro peptidil transferasa del ribosoma tanto en procariontas como en eucariotas. Además existe en Dom34 una serie de dominios con una secuencia altamente conservada: el motivo 1 presente en el dominio 1; un motivo 2, presente en el dominio 2, que contiene una secuencia peptídica PGF altamente conservada, que podría estar implicado en una interacción con el ribosoma en un lugar distinto al del centro peptidil transferasa; y el motivo 3 del dominio 3 que contiene un residuo de tirosina altamente conservado. Sorprendentemente, Dom34 de *Ta* presenta actividad endoribonucleasa *in vitro*, para la que es suficiente el dominio 1 de la proteína. Esta actividad endoribonucleasa de Dom34, se ve reforzada con la formación del complejo Dom34 / Hbs1, lo que refuerza la idea de que la propia Dom34 de *S. cerevisiae* sea la responsable de la actividad catalítica necesaria para el NoGo Decay.

En un segundo estudio estudiaron la estructura cristalina de Dom34 de *S. cerevisiae*, en donde se vio que esta proteína presentaba un 21% de similitud de secuencia con *Ta pelota*, con una serie de dominios que adoptan estructuras similares aunque en diferentes posiciones relativas. Dom34 adopta una estructura general en forma de T, con tres dominios diferenciados. El dominio N terminal, similar al de la familia Sm parece estar implicado en la unión a RNA, y los dominios medio y C terminal

son estructuralmente análogos a los de eRF1, y en ellos aparece el motivo PGF conservado. Estudiando la interacción de Dom34 con Hbs1 vieron que estas proteínas eran capaces de formar un complejo estable independientemente de la presencia de GTP, y que la asociación de Dom34 con Hbs1 aumenta varias veces la afinidad por GTP. En este estudio proponen que el modo de interacción entre Hbs1 y Dom34 es muy similar al de eRF1 con eRF3.

### ***Pelota* en el desarrollo de mamíferos**

La primera aproximación al papel del gen *pelota* en mamíferos fue llevada a cabo mediante el desarrollo de un mutante deficitario (*knockout*) de ratón para este gen (Adham et al, 2003).

Los animales heterocigotos no presentaban ningún fenotipo y eran fértiles, lo cual indicaba que una copia funcional del gen es suficiente para el desarrollo normal. Sin embargo, mediante genotipado de la progenie de los cruces de estos animales heterocigotos se observó la ausencia de individuos homocigotos carentes de *pelota*, lo que indicaba que la deficiencia de *pelota* tenía como consecuencia la letalidad en el estado embrionario.

Estudios histológicos revelaron que los embriones homocigotos deficientes en *pelota* no se desarrollaban más allá del día 7.5 de la embriogénesis. En esta etapa del desarrollo, los mutantes eran mucho más pequeños aunque las capas celulares embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) podían reconocerse histológicamente. El hecho de que las tres capas germinales aparezcan diferenciadas en los embriones sugería que el cese del desarrollo no es debido a la falta de diferenciación, sino a un defecto de proliferación. Para comprobar el potencial de crecimiento y supervivencia de los embriones homocigotos carentes de *pelota*, se cultivaron durante 7 días embriones en el estadio 3.5 obtenidos de cruces de heterocigotos. Se controló el crecimiento de los blastocistos, se extrajo el DNA de los embriones el último día y se genotiparon por PCR. Los análisis realizados determinaron que tanto los blastocistos normales como los heterocigotos presentaban un crecimiento normal, mientras que en los homocigotos carentes de *pelota* la masa celular interna del blastocisto era incapaz de proliferar después del cuarto día e

## Introducción

invariablemente morían después del sexto día en cultivo. Sin embargo, las células del trofectodermo permanecían unidas a la placa de cultivo y continuaban aumentando de tamaño después de los 7 días de cultivo. Las células del trofectodermo se derivan de células que se vuelven mitóticamente inactivas después del estadio 4.5, repitiendo sucesivas rondas de la fase S y generando núcleos poliploides y un enorme citoplasma. Estos datos indican que la letalidad de los embriones es debida a defectos en la proliferación celular y que *pelota* es esencial para una división mitótica normal y para el desarrollo embrionario temprano en el ratón.

Para determinar la existencia o no de poliploidia en las células de ratón deficientes para *pelota*, al igual que sucede en la meiosis de *Drosophila*, se estudió el contenido de DNA celular de las secciones histológicas estudiadas anteriormente. En los embriones normales los histogramas de DNA mostraban patrones típicamente diploides, mientras que los embriones en los cuales se había detenido el desarrollo mostraban un histograma de DNA en donde aparecían cantidades anormales de DNA, como aneuploidías y poliploidías (sobre todo tetraploidías), que podrían ser causadas por una parada en el ciclo celular de estas células, posiblemente relacionada con alguna alteración en la formación del huso, en la estructura del centrosoma o bien en la segregación de los cromosomas.

## **La traducción de proteínas**

Según sostiene el dogma central de la biología, la información fluye desde el DNA al RNA y de ahí a las proteínas. La información genética contenida en el DNA, es transcrita a RNA; tras la transcripción y el procesamiento del RNA tiene lugar la traducción, es decir, la síntesis de proteínas guiada por un molde de mRNA. Tras la traducción del mRNA la cadena polipeptídica ha de plegarse en una conformación tridimensional adecuada y a menudo es procesada antes de dar lugar a una proteína funcional.

El proceso de traducción comienza con la unión de un metionil tRNA específico y el mRNA a la subunidad menor del ribosoma. A continuación, la subunidad mayor del ribosoma se une al complejo, formando un ribosoma funcional sobre el que tiene lugar la elongación de la cadena polipeptídica. Una serie de proteínas no ribosómicas específicas son necesarias para diversas fases del proceso de traducción. Entre estas proteínas se encuentran los factores de iniciación, de elongación y de terminación de la traducción, que varían entre procariontes y eucariotes. El ribosoma tiene tres sitios para la unión de tRNA, que son denominados lugar P (peptidil), A (aminoacil) y E (liberación). Los aminoacil tRNA se van uniendo a los distintos sitios del ribosoma, y gracias a los distintos factores de elongación se va produciendo la traducción del mRNA, siendo este un proceso dependiente de la hidrólisis de GTP. La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que un codón de terminación se coloca en el sitio A del ribosoma. En este momento es cuando intervienen los factores de liberación que los reconocen y terminan la síntesis de proteínas. Las células procariontes cuentan con dos factores de liberación que reconocen los codones de terminación: RF1 reconoce UAA o UAG, y RF2 reconoce UAA o UGA. En células eucariotas un único factor de liberación (eRF1) reconoce los tres codones de terminación. Además las células procariontes y eucariotas también tienen factores de liberación (RF3 y eRF3 respectivamente) que no reconocen codones de terminación específicos pero actúan con RF1 (o eRF1) y RF2. El factor de liberación se une a un codón de terminación en el sitio A estimulando la hidrólisis del enlace entre el tRNA y la cadena polipeptídica en el

## *Introducción*

sitio P, permitiendo la salida de ésta del ribosoma. El tRNA es liberado posteriormente, disociándose las subunidades ribosómicas y la hebra de mRNA.

Aunque la transcripción es el nivel principal de control de la expresión génica, la traducción del mRNA también está regulada tanto en células procariotas como eucariotas.

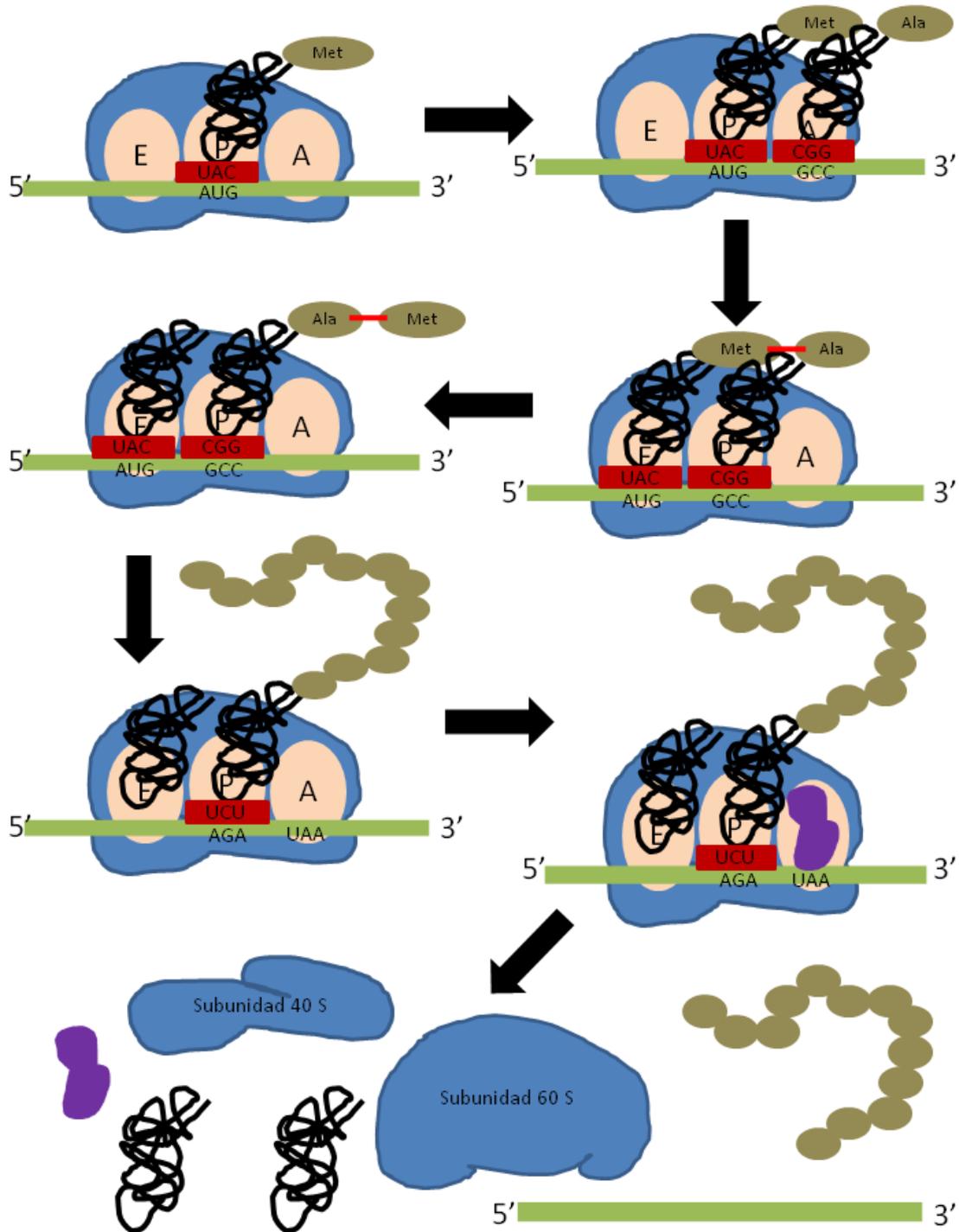


Figura 2. Esquema básico de la traducción proteica. La iniciación de la misma está mediada por los factores de iniciación, que provocan el ensamblaje de las dos subunidades del ribosoma y la unión de un metionil tRNA al lugar P del ribosoma en un proceso en varias fases mediado por la unión de ATP y GTP (a). El proceso de elongación continúa con la acción de los factores de elongación, que median la unión del siguiente aminoacil tRNA al lugar A del ribosoma, en un proceso mediado por la unión de GTP (b). Posteriormente se produce el desplazamiento de los tRNAs dentro de los lugares del ribosoma y la formación del enlace peptídico (c). El proceso de elongación continúa (d, e) hasta que aparece un codón de terminación en el lugar A del ribosoma, lo cual provocará la terminación de la transcripción mediante los factores correspondientes y la liberación de la cadena polipeptídica y el desensamblaje de las subunidades ribosomales. (f, g).

## Los factores de liberación de la traducción (RFs)

Los factores de liberación de la traducción (RFs) intervienen durante el proceso de traducción, reconociendo los codones de terminación presentes en la secuencia del mRNA y provocando la liberación de la cadena polipeptídica de los ribosomas y la consecuente finalización de la traducción.

Al igual que en muchas otras ocasiones, los primeros resultados obtenidos en este campo fueron en procariontes, y posteriormente fueron identificados los genes SUP45 y SUP35 como los principales implicados en el proceso de terminación de la traducción en *S. cerevisiae*. Más adelante, mediante el establecimiento de un sistema *in vitro* que reproducía la terminación de la transcripción en mamíferos, eRF1 y eRF3 fueron identificados como los homólogos de los productos génicos de SUP45 y SUP35 de levaduras.

La existencia de codones de terminación sin sentido fue propuesta por Crick et al. (1961). Posteriormente, estos codones de terminación fueron identificados: UAA, UAG y UGA (Weigert and Garen, 1965; Brenner et al. 1967). La presencia de estos tripletes en el mRNA se demostró que servía *in vitro* como señal para la liberación de las cadenas polipeptídicas de los ribosomas (Takanami and Yan, 1965) y no codificaban para ningún aminoácido (Khorana, 1968). Se demostró que estos tripletes sin sentido eran reconocidos por unas proteínas específicas denominadas factores de liberación (Capecchi, 1967), dos de las cuales presentaban diferentes especificidades por los distintos codones: RF1 (UAA, UAG) y RF2 (UAA, UGA) (Scolnick et al, 1968). Posteriormente se descubrió la existencia de un tercer factor, denominado RF3 (Milman et al, 1969; Goldstein and Caskey, 1970), que no presentaba especificidad por ningún codón, pero que era capaz de estimular la actividad de RF1 y RF2 *in vitro*.

Por otra parte, en eucariotas sólo han sido identificados dos factores de liberación, denominados eRF1 y eRF3. La denominada clase I de factores de liberación se encarga del reconocimiento del codón stop y promueve la hidrólisis del enlace éster que une la cadena polipeptídica al tRNA del sitio peptidil (P). Esta clase comprende RF1 y RF2 de procariontes, y eRF1 de eucariotas. Por otra parte, la clase II de factores de liberación comprende el RF3 procarionte y eRF3 eucariota, siendo esta clase de

proteínas de unión a GTP, y no son específicas de codón ni reconocen ninguno de ellos, centrándose su función en estimular la actividad de los factores de liberación de la clase I y confiriendo la dependencia de GTP del proceso.

### **Clase I de factores de liberación**

Basado en estudios *in vitro*, los factores de liberación fueron purificados tanto en procariotas como en eucariotas. En 1985 se determinaron las estructuras primarias de RF1 y RF2 de *E. coli* (Craigén et al, 1985). Más adelante, se demostró que eRF1 pertenecía a una familia de proteínas eucarióticas altamente conservada que incluía la proteína codificada por SUP45 en *S. cerevisiae* (Frolova et al. 1994). Sin embargo, los descubridores de la familia eRF1 no encontraron ninguna similitud entre las secuencias de los RFs bacterianos y los RFs eucarióticos, y especularon con el hecho de que las proteínas responsables de la terminación en eucariotas evolucionaron independientemente de los RFs procarióticos. Por otra parte se ha propuesto que tanto los RFs procarióticos como los eucarióticos tienen un origen común con el factor de elongación EF-G.

La determinación de las estructuras cristalinas de eRF1 humano y RF2 bacteriano (Song et al. 2000; Vestergaard et al. 2001), nos ha permitido ver que la estructura terciaria de ambas proteínas difiere bastante. Sin embargo, estos datos proponen que tanto eRF1 como RF2 cuando se encuentran asociados al ribosoma y en presencia del codón stop presentan estructuras comparables que son compatibles con el modelo propuesto de mimetismo del tRNA (Ito et al. 1996). Según este modelo, los factores de liberación de clase I presentan una estructura tridimensional que mimetiza la del tRNA, debida a una serie de motivos conservados universalmente, estructura necesaria para la realización de su función y para la unión al lugar A del ribosoma. Este mimetismo explicaría la habilidad de los factores de liberación para reconocer los codones de terminación.

eRF1 consta de 3 dominios: N terminal, medio y C terminal. El dominio N terminal fue el propuesto como responsable del reconocimiento del codón stop (Song

et al. 2000). El dominio central incluye un motivo GGQ altamente conservado a lo largo de la evolución (Frolova et al. 1999), responsable de la actividad hidrolítica peptidil transferasa y por lo tanto necesario para la actividad de liberación de eRF1, pero que no interviene en el reconocimiento del codón ni en las interacciones con el ribosoma ni con eRF3. Las mutaciones en GGQ dan lugar a un fenotipo dominante negativo *in vitro* y son letales recesivas en *S. cerevisiae*. Se ha propuesto que los dominios N terminal y medio pueden formar un núcleo funcional activo ("*core*" domain) (Frolova et al. 2000). El dominio C terminal de eRF1 se une a eRF3 *in vivo* en ausencia del núcleo funcional activo, pero ambos dominios son necesarios para desencadenar la actividad GTPasa de eRF3.

### **Clase II de factores de liberación**

El proceso de terminación de la traducción implica la hidrólisis de GTP a GDP llevada a cabo por los factores de clase II (eRF3 y RF3). Pese a esta dependencia de GTP del proceso, en eRF1 nunca se identificó un motivo de unión a GTP. Esto fue lo que sugirió la existencia de un segundo factor de liberación. Esta hipótesis se vio reforzada tras la identificación en *E. coli* de un factor, denominado RF3, que estimulaba la reacción de finalización y era capaz de unir nucleótidos de guanidina, pero que no presentaba especificidad por codones ni actividad liberadora por sí misma (Milman et al. 1969). En 1995, se demostró que la proteína codificada por el gen Sup35 en *Xenopus laevis* estimulaba en gran medida la actividad *in vitro* de eRF1 en presencia de GTP y bajas concentraciones de codones stop. Esta proteína fue denominada eRF3 (Zhouravleva et al. 1995). También se demostró que los productos de los genes Sup45 (eRF1) y Sup35 (eRF3) interaccionan *in vitro*. Esta interacción es mediada por el extremo C terminal de eRF1.

Se piensa que los componentes de esta clase II de factores de liberación, RF3 en procariotas y eRF3 en eucariotas tienen un origen independiente, siendo el de RF3 común con EF – G y habiéndose originado eRF3 del mismo ancestro proteico que eRF1 – A (un homólogo eucariótico del factor de elongación bacteriano EF – Tu) y Hbs1.

En la mayoría de los casos estudiados, los eRF3 eucarióticos presentan tres dominios. La región C terminal de la familia eRF3 está altamente conservada y presenta homología con el factor de elongación EF1A. Este dominio presenta un pliegue GTPasa similar al de otras proteínas G (Stansfield et al. 1995), y es esencial para la viabilidad. Por otra parte, las regiones media y N terminal no están conservadas, si bien se pueden encontrar algunas características comunes.

eRF3 no presenta actividad propia como factor de liberación, pero se encarga de estimular la actividad de eRF1, con el que forma un complejo muy estable. Se trata de una proteína GTPasa, capaz de unir e hidrolizar GTP a GDP, facilitando de este modo la decodificación del codón de terminación y siendo necesaria esta actividad GTPasa para acoplar el reconocimiento de las señales de terminación de la transcripción por eRF1 con la liberación eficiente de la cadena polipeptídica (Salas – Marco et al. 2004).

Otros estudios han demostrado que en *S. cerevisiae* el dominio N terminal de eRF3 está implicado tanto en la modulación de la eficiencia de traducción como en el funcionamiento del complejo eRF1/eRF3 más allá de la terminación de la transcripción (Urakov et al. 2006).

## Degradación del mRNA

Al igual que otros procesos celulares, la degradación del mRNA es un proceso altamente regulado. Un amplio número de factores y mecanismos celulares están implicados en controlar la tasa de degradación del mRNA.

Hasta el momento se han identificado una serie de mecanismos que regulan la degradación de mRNA de un modo normal en la célula. Entre ellos se encuentra la degradación de mRNA dependiente de deadenilación, que normalmente va seguida de una degradación del mRNA  $5' \rightarrow 3'$  o bien  $3' \rightarrow 5'$ . Los mRNAs eucarióticos son creados con dos determinantes que les confieren estabilidad, la caperuza de 7-metilguanosina en  $5'$  y la cola de poliA en  $3'$ . Estas dos estructuras interactúan con las proteínas citoplasmáticas eIF4E y PABP (proteína de unión a poliA), para proteger al transcrito de las exonucleasas y promover el inicio de la traducción. Para que se inicie la degradación, una de estas dos estructuras debe ser destruida, o bien el mRNA roto internamente mediante un ataque endonucleolítico. En eucariotas, la mayoría de los mRNAs que son degradados siguen una ruta que comienza con el acortamiento de la cola de poliA. Este primer paso es único en el sentido de que es reversible, ya que esos transcritos pueden ser readenilados y ser devueltos a los polisomas. Sin embargo, una vez que la célula determina que un mRNA debe de ser destruido, comienza una de las dos rutas irreversibles. Se trata, bien de la eliminación de la caperuza en  $5'$ , en un proceso denominado *decapping*, el cual permite al mRNA ser degradado en dirección  $5' \rightarrow 3'$  por la exoribonucleasa XRN1, o bien el extremo  $3'$  desprotegido es atacado por un enorme complejo de exonucleasas que actúan en dirección  $3' \rightarrow 5'$  denominado exosoma.

La deadenilación es el primer paso en la degradación de la mayor parte de mRNAs, y aunque no se sabe exactamente cómo es desencadenada, hasta el momento se han caracterizado una serie de deadenilasas, entre las que se encuentran PAN2 – PAN3, CCR4 – NOT y PARN (ribonucleasa específica de poliA), cada una de ellas con unas propiedades características. PAN2 – PAN3 es una nucleasa dependiente de poliA que está implicada en recortar las colas de poliA de los mRNAs que se están formando a una longitud estándar de 60 – 80 nucleótidos en *S. cerevisiae* (Brown et al. 1996). En

este punto, la deadenilación es transferida a otra deadenilasa, CCR4 – NOT. Esta enzima es la deadenilasa principal en *S. cerevisiae* (Tucker et al. 2001) y es un gran complejo de nueve proteínas, de las cuales dos, Ccr4 y Caf1, tienen dominios exonucleasa. En células de mamífero, se ha visto que CCR4 – NOT deadenila mRNAs reporter (Yamashita et al. 2005). PARN es única en el sentido de que tiene actividad deadenilasa dependiente de la caperuza, es decir, su actividad se ve reforzada por la presencia de una caperuza en el extremo 5' del mRNA (Dehlin et al. 2000). Además, esta deadenilasa es inhibida por proteínas que se unen a la caperuza (Gao et al. 2000).

La degradación 3' → 5' del mRNA es llevada a cabo por el exosoma, un complejo formado por unas 10 – 12 subunidades, compuesto por 6 proteínas con una homología significativa con las exoribonucleasas fosforolíticas 3' → 5' y varias proteínas accesorias, incluyendo factores con homología con exonucleasas hidrolíticas que funcionan 3' → 5' y helicasas de RNA (Houseley et al. 2006). El exosoma tiene varias funciones además de la degradación citoplasmática del RNA, como el procesamiento 3' de RNAs no codificantes en el núcleo.

La degradación 5' → 3' de los mRNAs se inicia con el *decapping*. En *S. cerevisiae*, la enzima responsable es un dímero que consiste en Dcp1 y Dcp2, siendo la segunda la responsable de la actividad catalítica (Steiger et al. 2003). En eucariotas superiores existe una tercera enzima, denominada Hedls o Ge – 1, que estimula la actividad (Fenger – Gron et al. 2005; Yu et al. 2005). Una serie de factores accesorios son necesarios para que el *decapping* se lleve a cabo de forma eficiente. En primer lugar, las proteínas Sm – like (Lsm) parecen estar implicadas en el proceso. El complejo heptamérico Lsm1 – 7 se asocia con el extremo 3' de los mRNAs deadenilados y promueve el *decapping* (Tharun et al. 2000; Tharun et al. 2001). Otras proteínas Lsm, como EDC3, la PABP – binding protein – 1 de *S. cerevisiae* o RAP55 de mamíferos también parecen estar implicadas en el proceso.

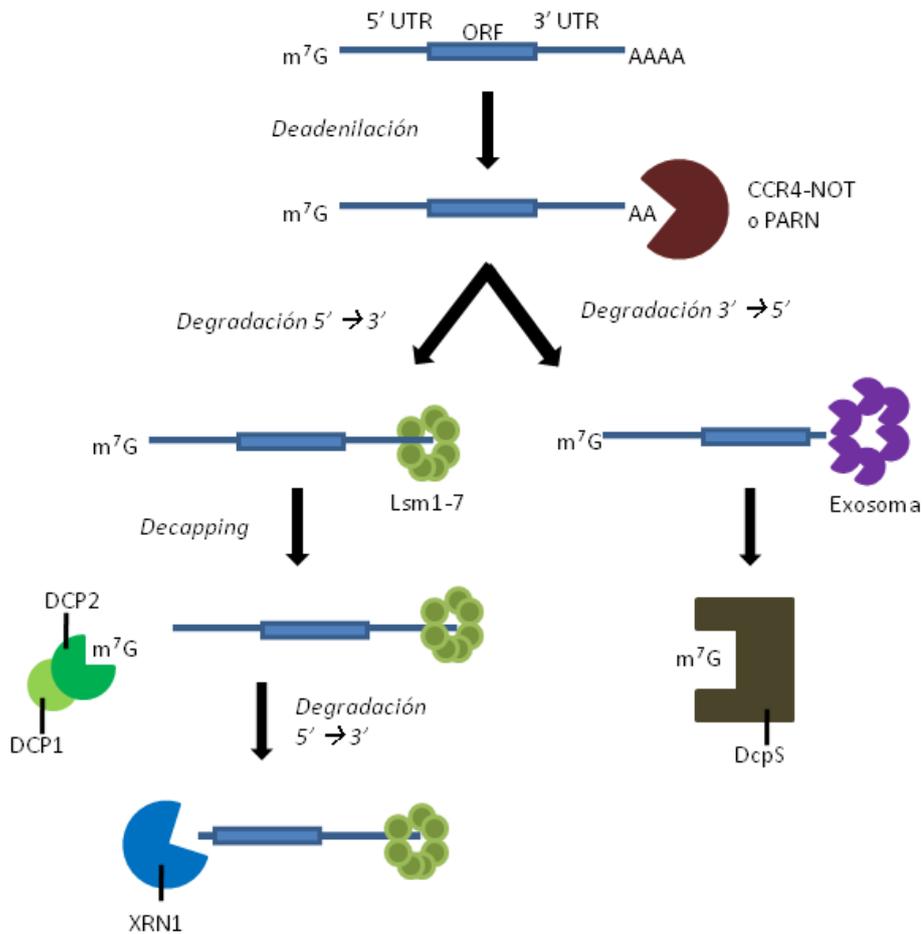


Figura 3. Degradación de mRNA dependiente de deadenilación. La deadenilación es el primer paso en la degradación de la mayor parte de los mRNAs. Es llevado a cabo por una serie de enzimas denominadas deadenilasas, entre las que se encuentran CCR4 – NOT o PARN. Tras ello sigue la degradación del mRNA 3' → 5', llevada a cabo por el complejo proteico denominado exosoma, o bien la degradación 5' → 3', que se inicia con el decapping, que elimina la caperuza de 7-metilguanosina en 5'.

Otros mecanismos menos habituales de degradación de mRNA comprenden el decapping independiente de deadenilación y la degradación mediada por una endonucleasa. En *S. cerevisiae* el mecanismo de degradación del mRNA independiente de deadenilación, requiere el reclutamiento de la maquinaria de decapping. En este

caso, Rps28B interacciona con Edc3 para llamar a la enzima responsable del *decapping* (Dcp1 / Dcp2), tras esto, el mRNA es degradado por Xrn1 (Badis et al. 2004).

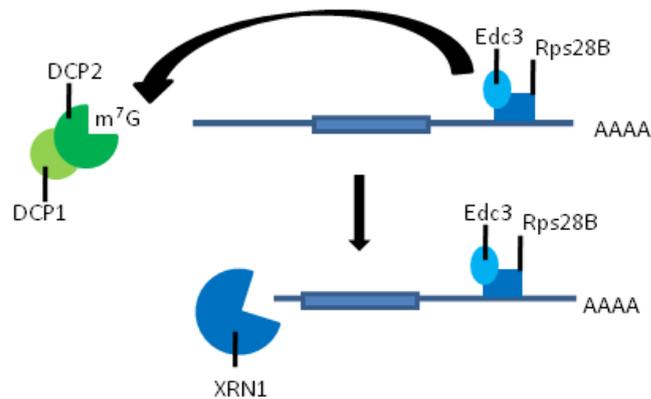


Figura 4. Degradación de mRNA independiente de deadenilación. Este mecanismo requiere en *S. cerevisiae* el reclutamiento de la maquinaria de *decapping*.

Por último, la degradación del mRNA también puede ser llevado a cabo por un mecanismo mediado por una endonucleasa, que inicia la rotura interna del mRNA, generando dos fragmentos, cada uno de ellos con un extremo sin protección, que son posteriormente degradados por XRN1 y el exosoma. Se han identificado varias endonucleasas celulares cuyo blanco es el mRNA, como PMR1, IRE1 o la RNasa MRP. Además, una serie de endonucleasas no identificadas han sido relacionadas con los procesos de degradación de mRNAs aberrantes (Gatfield and Izaurralde 2004), y los siRNAs inician la degradación del mRNA a través de rotura endonucleolítica mediada por Argonata2 (Song et al. 2000; Liu et al. 2004).

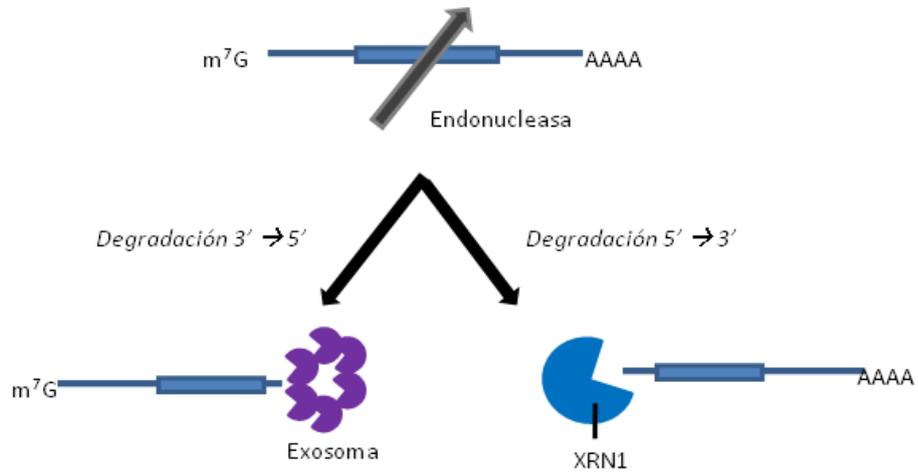


Figura 5. Degradación de mRNA dependiente de una endonucleasa. Este mecanismo inicia la rotura interna del mRNA, generando dos fragmentos, que son posteriormente degradados por XRN1 y el exosoma.

## Mecanismos de control de calidad del mRNA

Para mantener la fidelidad a la hora de traducir, la célula ha desarrollado una serie de medios para detectar y degradar transcritos aberrantes, protegiéndose de ese modo de productos proteicos potencialmente tóxicos. El mecanismo que se encarga del procesamiento del mRNA inadecuado ocurre en el núcleo, mientras que los siguientes procesos son dependientes de la traducción y detectan complejos de ribonucleoproteínas mensajeras aberrantes en el citoplasma.

### Nonsense – mediated decay (NMD)

El mecanismo de control de calidad del mRNA más estudiado hasta el momento es el nonsense – mediated decay (NMD). Este mecanismo es capaz de detectar y degradar transcritos que contengan codones de terminación prematuros (PTCs). Los PTCs pueden aparecer en un transcrito debido a mutaciones genómicas, transcripción imprecisa, frame – shifts, iniciación de la transcripción errónea o bien 3' UTRs de gran extensión, procesamiento inadecuado del pre - mRNA, como pueden ser *splicing* y poliadenilación. Estos transcritos primarios, en el caso de ser traducidos, pueden producir proteínas truncadas con funciones aberrantes. La ruta del NMD está presente en todos los eucariotas, y las proteínas principales componentes del complejo del NMD, UPF1, UPF2 y UPF3, están muy conservadas entre especies (Conti and Izaurralde 2005; Lykke-Andersen et al. 2000).

La presencia de un PTC es señalado por la presencia en 3' de una señal activadora en cis, que varía entre especies. En el caso de las células de mamífero, esta señal es una unión exón – exón señalizada por un grupo de proteínas que constituyen el EJC (*exon junction complex*), un complejo de multiproteínas depositado unos 20 – 24 nucleotidos en 5' de cada límite de exón durante el *splicing* (Le Hir et al. 2000; Le Hir et al. 2001). UPF3 forma parte de este conjunto de proteínas que marca los mRNAs que han sufrido un *splicing* correcto, y que es reconocido en primer lugar por un ribosoma que efectúa una ronda previa de reconocimiento de la traducción. Cuando el extremo 5' del mRNA pasa a través del poro nuclear en dirección al citoplasma un ribosoma

## Introducción

comienza su traducción. Durante esta ronda previa de traducción el EJC unido al mRNA es desplazado por el ribosoma. El codón stop normal se encontrará en el último exón, de tal modo que cuando el ribosoma llegue al mismo y se detenga, ningún EJC permanecerá unido al mRNA. Cuando esto sucede, el mRNA “pasa la inspección” y es liberado al citoplasma donde ya puede ser traducido normalmente. Sin embargo, cuando aparece un PTC y el ribosoma se detiene en el mismo, el EJC permanece asociado con el mRNA, donde es detectado por la maquinaria de vigilancia que se encarga de la posterior degradación de la molécula de mRNA aberrante. Este EJC posicionado inadecuadamente no es un desencadenante universal del NMD. En *D. melanogaster* y *S. cerevisiae*, el EJC no parece tener papel alguno, siendo la distancia entre el codón stop y la cola de poliA crucial para desencadenar la degradación del mRNA. Mediante la extensión del UTR 3', el PTC incrementa la distancia entre el ribosoma y la cola de poliA, y la conformación del complejo ribonucleoproteico mensajero es reconocido como anormal (Gatfield et al. 2003). En *D. melanogaster*, el proceso es iniciado por la rotura endonucleolítica del mRNA.

El complejo de vigilancia está formado por los efectores altamente conservados del NMD, que incluyen tres proteínas en levaduras (UPF1, UPF2 y UPF3, *Up – frameshifts 1 – 3*) y siete en *Caenorhabditis elegans* (SMG 1 – 7, *suppressor with morphological effect on genitalia 1 – 7*). Estos efectores fueron identificados en screens genéticos en *S. cerevisiae* y *C. elegans*, o mediante búsqueda de homólogos en otros organismos (Rehwinkel et al. 2006; Amrani et al. 2006; Conti and Izaurralde 2005; Lejeune and Maquat 2005). Cumplen un papel fundamental en el NMD en todos los organismos en los cuales este proceso ha sido investigado. Las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3 (nombradas SMG – 2, SMG – 3 y SMG – 4 en *C. elegans*) aparecen conservadas en eucariotas incluyendo *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, así como en *Arabidopsis thaliana*. Los efectores del NMD adicionales (SMG1, SMG5, SMG6 y SMG7) aparecen conservados en la mayoría de los organismos multicelulares, pero SMG7 no presenta ningún ortólogo claro en *D. melanogaster*. SMG5, SMG6 y SMG7 son homólogos de la proteína asociada a la telomerasa Est1p así como de la proteína relacionada Ebs1p en *S. cerevisiae*, aunque se desconoce si estas proteínas tienen un papel en el NMD (Fukuhara et al. 2005;

Reichenbach et al. 2003; Snow et al. 2003). UPF1 es una helicasa de RNA cuya actividad está regulada mediante ciclos de fosforilación y defosforilación, para lo cual son necesarios los efectores adicionales del NMD. La fosforilación de UPF1 requiere UPF2 y UPF3, y es catalizada por SMG1, una proteína kinasa relacionada con las PI3 kinasas (Denning et al. 2001; Yamashita et al. 2001; Grimson et al. 2004). La defosforilación de UPF1 está mediada por SMG5, SMG6 y SMG7, tres proteínas relacionadas que actúan como adaptadores entre UPF1 fosforilada y la proteína fosfatasa 2A (Cali et al. 1999; Anders et al. 2003; Chiu et al 2003; Ohnishi et al. 2003; Kashima et al. 2006). SMG5 – 7 se une a UPF1 fosforilada a través de dominios específicos que adoptan un plegamiento del tipo 14-3-3 (Fukuhara et al. 2005). A pesar de la ausencia de ortólogos claros de SMG1 y SMG5 – 7 en *S. cerevisiae*, tanto UPF1 como UPF2 son fosforiladas en este organismo. Sin embargo, la kinasa responsable de estas fosforilaciones y cómo ocurre la defosforilación todavía están por dilucidar.

Pese a los mecanismos alternativos a la hora de identificar los sustratos del NMD y a las variaciones en los efectores entre especies, todas las rutas caracterizadas tienen en común el requerimiento del componente UPF1 del complejo. Durante la traducción normal, el codón stop es reconocido por los factores de liberación eRF1 y eRF3, que provocan la hidrólisis del tRNA. Sin embargo, cuando la terminación ocurre en un PTC, la liberación del péptido se ve retrasada y el ribosoma permanece detenido en el codón stop. Esto permite la unión de UPF1 y la kinasa SMG1 a los factores de liberación, formando un complejo, denominado SURF (SMG1 – Upf1 - eRF1 – eRF3 complex), en el ribosoma detenido (Kashima et al. 2006; Czaplinski et al. 1998). En este punto, mediante la interacción con UPF2, UPF1 interacciona con el EJC, en donde está presente UPF3, y la formación de este puente entre SURF en el ribosoma y el EJC, que une el PTC y el EJC, lleva a la fosforilación de UPF1 por SMG1 y la disociación de los factores de liberación. Por último, SMG7, una proteína relacionada con las proteínas 14-3-3, se asocia con el complejo y desencadena la degradación (Unterholzner and Izaurralde 2004), para lo cual parece ser importante la defosforilación de UPF1, que implica a la proteína adaptadora SMG5 y la proteína fosfatasa 2A (Chiu et al. 2003; Ohnishi et al. 2003; Anders et al. 2003; Cali et al. 1999).

Introducción

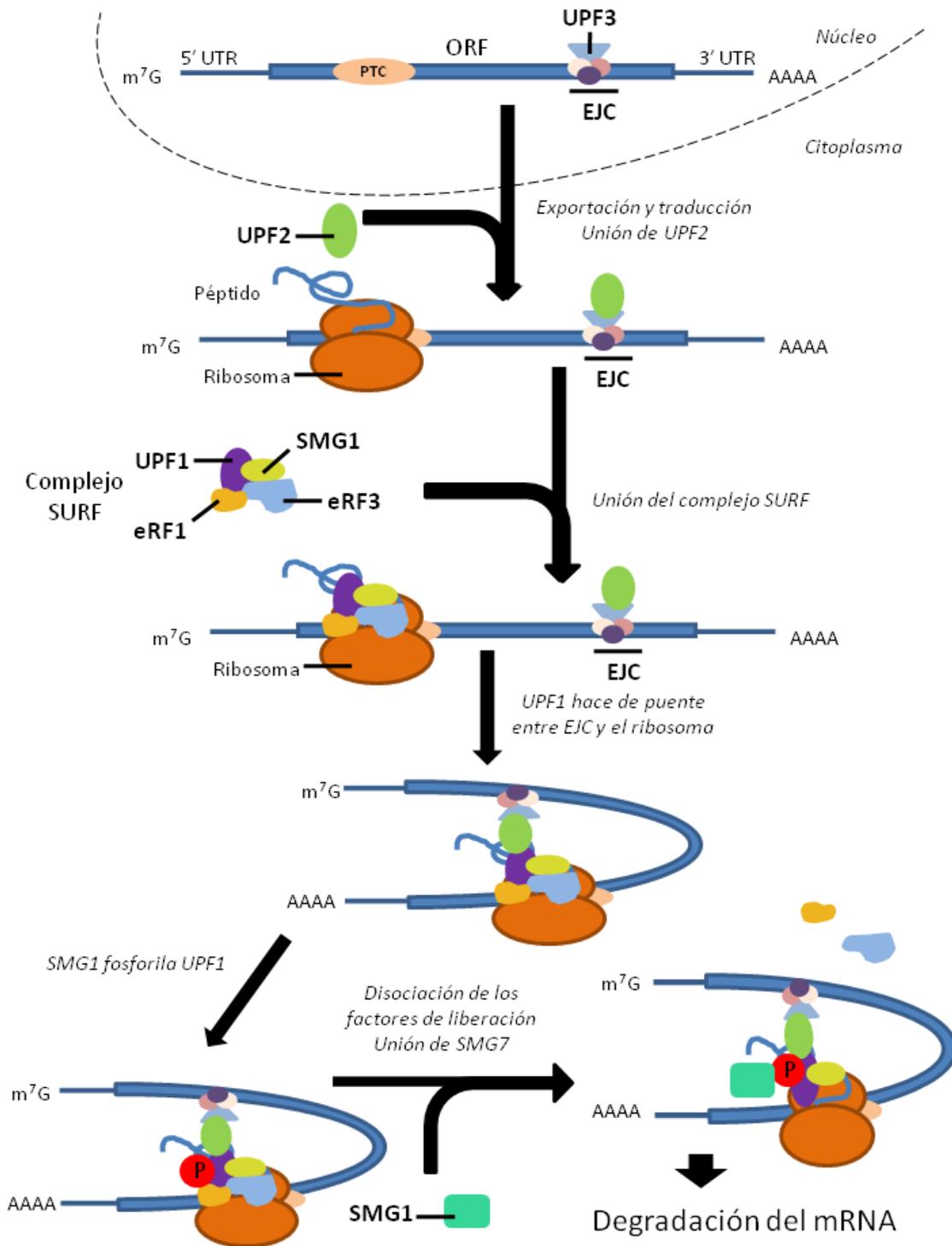


Figura 6. Mecanismo de acción del NMD en eucariotas. El mRNA aberrante es reconocido en una ronda previa de traducción por la presencia del EJC asociado al mismo. El ribosoma encallado en el PTC provoca el reclutamiento de los factores que intervienen en el mecanismo de vigilancia y la posterior degradación de la molécula de mRNA errónea.

## **Non Stop Decay (NSD)**

Este mecanismo de control de calidad permite a eucariotas la identificación y degradación de mRNAs que carezcan de un codón de terminación. Estos transcritos pueden ser generados por una pausa en la transcripción o bien por la poliadenilación que ocurre de forma prematura en una región codificante (Cui and Denis 2003; Frischmeyer et al. 2002). Además de proteger a las células evitando la posible producción de proteínas aberrantes, este sistema facilita la liberación del ribosoma.

En el caso de bacterias, la traducción de estos nonstop mRNAs tiene como consecuencia la detención de los ribosomas en el extremo 3' del mRNA. Estos ribosomas son liberados para ser reciclados mediante tmRNA, una molécula única, que presenta propiedades tanto del tRNA como del mRNA (Muto et al. 1998; Abo et al. 2000; Karzai et al. 2000). La región similar al tRNA dona una alanina a la cadena peptídica detenida, usando el lugar A del ribosoma, mientras que la región similar al mRNA desplaza al nonstop mRNA y dirige la adición de una cola peptídica corta al extremo C terminal del polipéptido. La cola C terminal que acaba de ser añadida es lo que marca a la proteína quimérica para proteólisis. También ha sido descrito que el sistema de tmRNA facilita la degradación de los mRNAs nonstop (Yamamoto et al. 2003, Mehta et al. 2006).

El modelo general para este mecanismo en eucariotas, descrito inicialmente en levaduras implica la degradación mediada por exosoma que comienza en la cola de poliA en 3', implicando al propio exosoma citoplasmático, al complejo SKI (Ski2, Ski3 y Ski8) y a la proteína adaptadora Ski7. Todo comienza cuando, debido a la ausencia de un codón de terminación, el ribosoma continúa traduciendo a lo largo de la cola de poliA, de donde desplaza a PABP y en donde se acaba deteniendo, evitando de este modo que ese mRNA sea traducido por otros ribosomas. El complejo estable que forman el ribosoma y el mRNA nonstop es reconocido por Ski7. El extremo C – terminal de Ski7, que es similar a los dominios GTPasa de EF1A y eRF3 (Benard et al. 1999), se une al lugar A vacío del ribosoma, liberándolo de esta manera. Es entonces cuando Ski7 se asocia con la forma citoplasmática del exosoma y con el complejo auxiliar de proteínas SKI (Ski2, Ski3 y Ski8) mediante su dominio N – terminal (Araki et al. 2001).

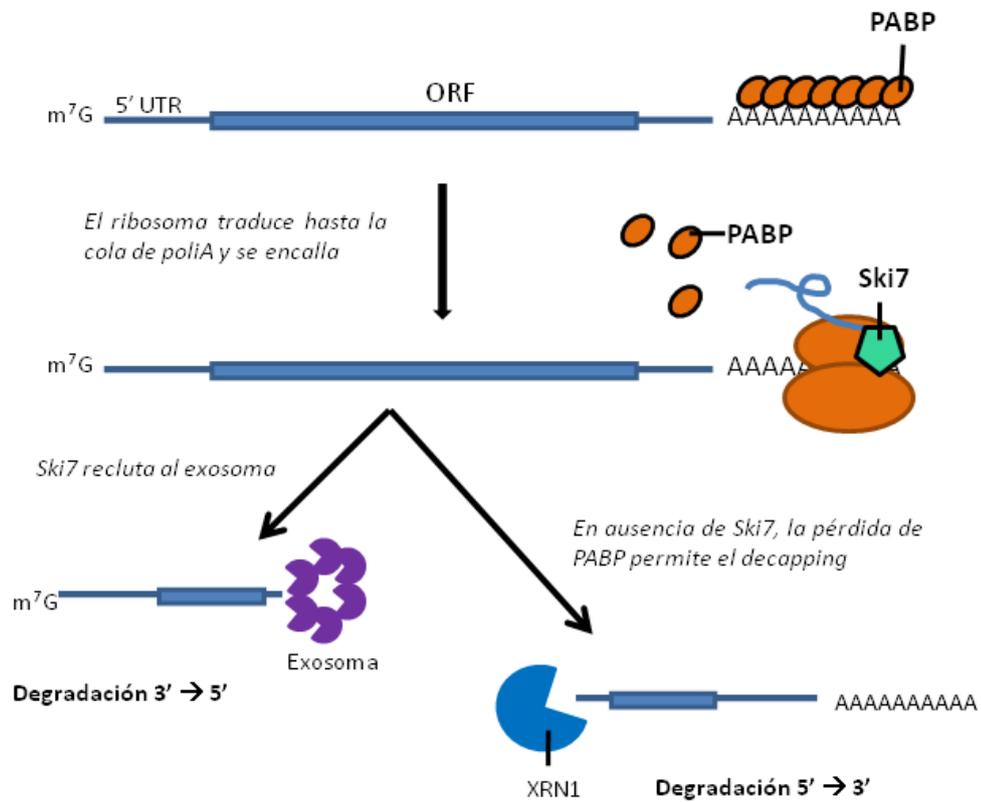
## Introducción

Esta asociación es la que provoca finalmente la rápida degradación del transcrito en dirección 3' -> 5' (van Hoof et al. 2002). En ausencia de Ski7, una segunda ruta, la degradación 5' -> 3' puede mediar el desencadenamiento de NSD en *S. cerevisiae* (Inada and Aiba 2005). Esto parece ser debido a la eliminación de PABP por el ribosoma que está traduciendo, lo cual se sabe que produce transcritos susceptibles de *decapping*, así como una reducción de la eficiencia de transcripción.

En estudios llevados a cabo en células de mamífero, se ha visto que, aunque los niveles de expresión de la proteína codificada por los mRNA nonstop se veían disminuídos significativamente, estos mRNAs nonstop no eran degradados (Akimitsu et al. 2007). Según estas observaciones, fue propuesto un modelo según el cual la presencia del ribosoma encallado en el extremo 3' de los mRNA nonstop evita que continúe la traducción dando lugar a una terminación prematura de la misma. Esta terminación de la traducción tenía lugar tras su inicio, al igual que en levaduras, ya que los mRNA nonstop aparecían asociados a polisomas y la traducción de mRNA nonstop sin la caperuza e iniciada por IRES era igualmente inhibida. Parecía que mientras que el mecanismo que reconocía anomalías del tipo del ribosoma en 3' impidiendo la traducción seguía funcionando, el mecanismo inhibitorio consecuente varía entre levaduras y células de mamífero.

Los mRNAs susceptibles de NSD se detectan en polisomas en complejo con un péptido que está siendo formado (Inada and Aiba 2005; Akimitsu et al. 2007). La proteína para la cual codifican apenas es detectada, lo cual indica que los mRNAs son también inhibidos traduccionalmente después de la iniciación.

Generalmente, los mRNAs son reprimidos traduccionalmente cuando carecen de un UTR 3' (como en el caso de los sustratos del NSD), cuando contienen un UTR 3' anormalmente corto, o bien cuando presentan un UTR 3' anormalmente largo (como en el caso de los sustratos del NMD). Además, la traducción de una cola de poli(A) tiene como consecuencia la detención del ribosoma, la represión parcial de la traducción y la degradación de proteínas mediada por el proteosoma (Ito – Harashima et al. 2007).



**Figura 7. Mecanismo de acción del NSD en eucariotas.** En este caso, la ausencia de codón stop provoca que el ribosoma continúe traduciendo a través de la cola de poliA, de donde desplaza a PABP y se detiene. Ski7 reconoce el complejo y se une al mismo, a la vez que se asocia con el exosoma y con el complejo proteico SKI, que media la degradación del mRNA aberrante. En el caso de que Ski7 no esté presente, la pérdida de PABP permite el decapping del mRNA.

## **NoGo Decay (NGD)**

Este mecanismo ha sido el más recientemente descrito, y consecuentemente es el menos conocido. Se trata de un mecanismo dirigido contra mRNAs en donde se produce un bloqueo de la traducción. Fue descubierto cuando se introdujo en *S. cerevisiae* una estructura de horquilla artificial en mRNAs, causando un bloqueo en la elongación de la traducción (Doma and Parker, 2006). La introducción de esta estructura acelera la degradación de mRNAs normalmente estables en levaduras. La degradación de estos transcritos no depende de las enzimas responsables de *decapping* y deadenilación, ni de Ski7p y Upf1p, componentes centrales de las rutas de NSD y NMD respectivamente. Sin embargo, el bloqueo de la exonucleasa Xrn1p, que actúa 5' → 3', o bien el exosoma, que actúa degradando 3' → 5', provoca la acumulación de los fragmentos 3' y 5' del mRNA respectivamente. Esto sugiere que NGD es iniciado por una rotura endonucleolítica seguida de la degradación exonucleolítica de los dos fragmentos.

En contraste con los otros mecanismos de control de calidad del mRNA, este nuevo mecanismo no inicia la degradación del mRNA mediante *decapping* o deadenilación, sino que implica la rotura endonucleolítica del mRNA en un lugar próximo a donde ha tenido lugar el bloqueo del ribosoma que estaba traduciendo, siendo un retraso en la elongación de la traducción el factor desencadenante del mecanismo. Posteriormente tiene lugar la degradación exonucleolítica de los fragmentos producidos; el fragmento 5' libre producto de la rotura endonucleolítica es degradado por el exosoma, mientras que el fragmento 3' es degradado por Xrn1. En este aspecto, se asemeja al NMD en *D. melanogaster*.

El mecanismo de acción del NGD requiere la acción de dos proteínas: Dom34, que parece ser indispensable para el mismo, y Hbs1p, que si bien no es indispensable, parece tener una función en el mecanismo, ya que cepas defectivas para la misma presentaban una menor acumulación de fragmentos producto de la rotura endonucleolítica. Hbs1p es una proteína de la familia de las GTPasas, que presenta similitudes con eRF3, y cuya interacción con Dom34 ha sido demostrada en *S. cerevisiae* (Carr – Schmidt et al. 2002). Por su parte, Dom34, homólogo de *pelota*,

presenta similitudes con eRF1 humano y recientemente se ha demostrado que presenta actividad endonucleolítica *in vitro*, como también se ha dicho más arriba, con lo cual todo parece indicar que es esta misma proteína la responsable de la rotura endonucleolítica del mRNA en el NGD, mecanismo iniciado tras su interacción con Hbs1p (Lee et al. 2007; Graille et al. 2008).

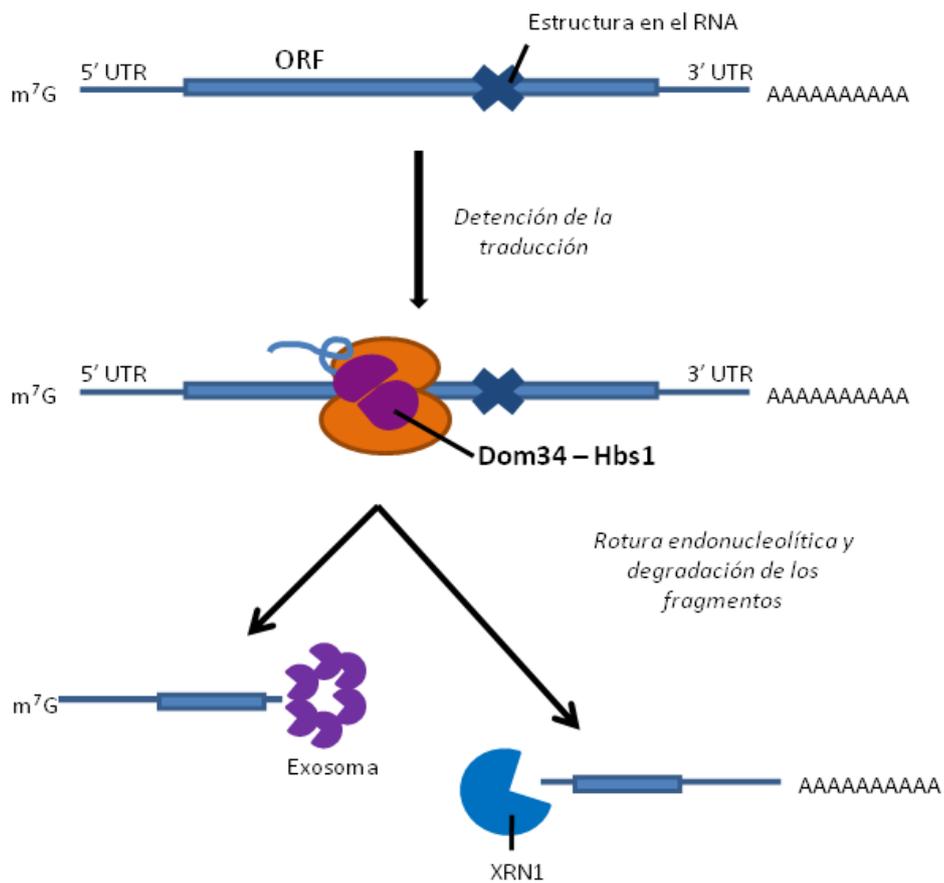


Figura 8. Mecanismo de acción del NGD. El bloqueo del ribosoma en una estructura aberrante pero estable presente en el mRNA provoca un retraso en la elongación de la traducción que causa la rotura endonucleolítica del mRNA mediante la acción del complejo Hbs1 – Dom34.

## El ciclo celular y su regulación

El ciclo de la división de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del DNA, distribución de los cromosomas replicados en las células hijas y división celular. En organismos eucariotas, el ciclo celular consiste en cuatro fases diferenciadas. Aunque el crecimiento celular se trata de un proceso continuo, el DNA se sintetiza sólo durante una fase del ciclo celular, y es tras este acontecimiento cuando los cromosomas replicados se distribuyen a los núcleos hijos mediante una compleja serie de procesos que preceden a la división celular. La progresión a través de estas etapas está controlada mediante un sistema regulador conservado, que no sólo coordina los diferentes procesos del ciclo celular, sino que también acopla el ciclo celular con las señales extracelulares que controlan la proliferación celular.

En el ciclo celular eucariota se distinguen dos etapas fundamentales, denominadas mitosis e interfase. La mitosis es la fase en la que tiene lugar la división del núcleo, que corresponde con la separación de los cromosomas hijos y termina generalmente con la citocinesis o división celular. Por su parte, durante la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del DNA de manera sucesiva, dejando a la célula preparada para la división.

La duración de la síntesis del DNA divide el ciclo de las células eucariotas en cuatro fases diferenciadas: G1, S, G2 y M. G1 (gap 1) es la etapa en la cual las células se preparan para el proceso de replicación del DNA. Durante esta fase es cuando se integran señales mitogénicas e inhibitoras del crecimiento y toma la decisión de seguir adelante, detenerse o bien abandonar el ciclo celular. En G1 se ha identificado un importante punto de control (*checkpoint*) tanto en levaduras como en células humanas. En levaduras es conocido como START, y en células humanas como punto de restricción, y es el punto en el cual la célula se compromete en la replicación del DNA y en completar el ciclo celular (Hartwell et al. 1974; Pardee et al. 19774; Nurse 1975). En levaduras, el rebasar este punto es un proceso controlado principalmente por señales externas, como la disponibilidad de nutrientes y el tamaño celular, mientras que en

mamíferos depende de factores de crecimiento extracelulares, que son señales de proliferación celular. La fase S se define como la fase en la cual tiene lugar la síntesis de DNA. G2 (gap 2) es la segunda fase gap durante la cual la célula se prepara para el proceso de división. M se corresponde con la mitosis, una fase en la que los cromosomas que han sido replicados son segregados en núcleos separados y tiene lugar la citocinesis para formar dos células hijas. Además de G1, S, G2 y M, el término G0 se utiliza para describir el estado de células que han salido del ciclo celular y se han convertido en quiescentes.

Además del punto de control anteriormente mencionado, existe un sistema de puntos de control que impiden la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente hayan sido completados. Varios puntos de control funcionan para asegurar que los cromosomas incompletos o dañados no sean replicados y transmitidos a las células hijas. El punto de control en G2 impide la iniciación de la mitosis hasta que se haya completado la replicación del DNA. Este punto de control detecta al DNA sin replicar así como al DNA dañado. El DNA dañado no sólo detiene el ciclo en G2, sino también en puntos de control en las fases G1 y S. La detención en el punto de control en G1 permite la reparación antes de que la célula entre en la fase S, en la que se replicaría el DNA dañado. El punto de control de la fase S proporciona una monitorización continua de la integridad del DNA, para asegurar que el DNA dañado es reparado antes de su replicación. Además, este punto de control proporciona un monitor del control de calidad, que estimula la reparación de cualquier error que pueda ocurrir durante la replicación del DNA, como la incorporación de bases incorrectas o la replicación incompleta de segmentos de DNA.

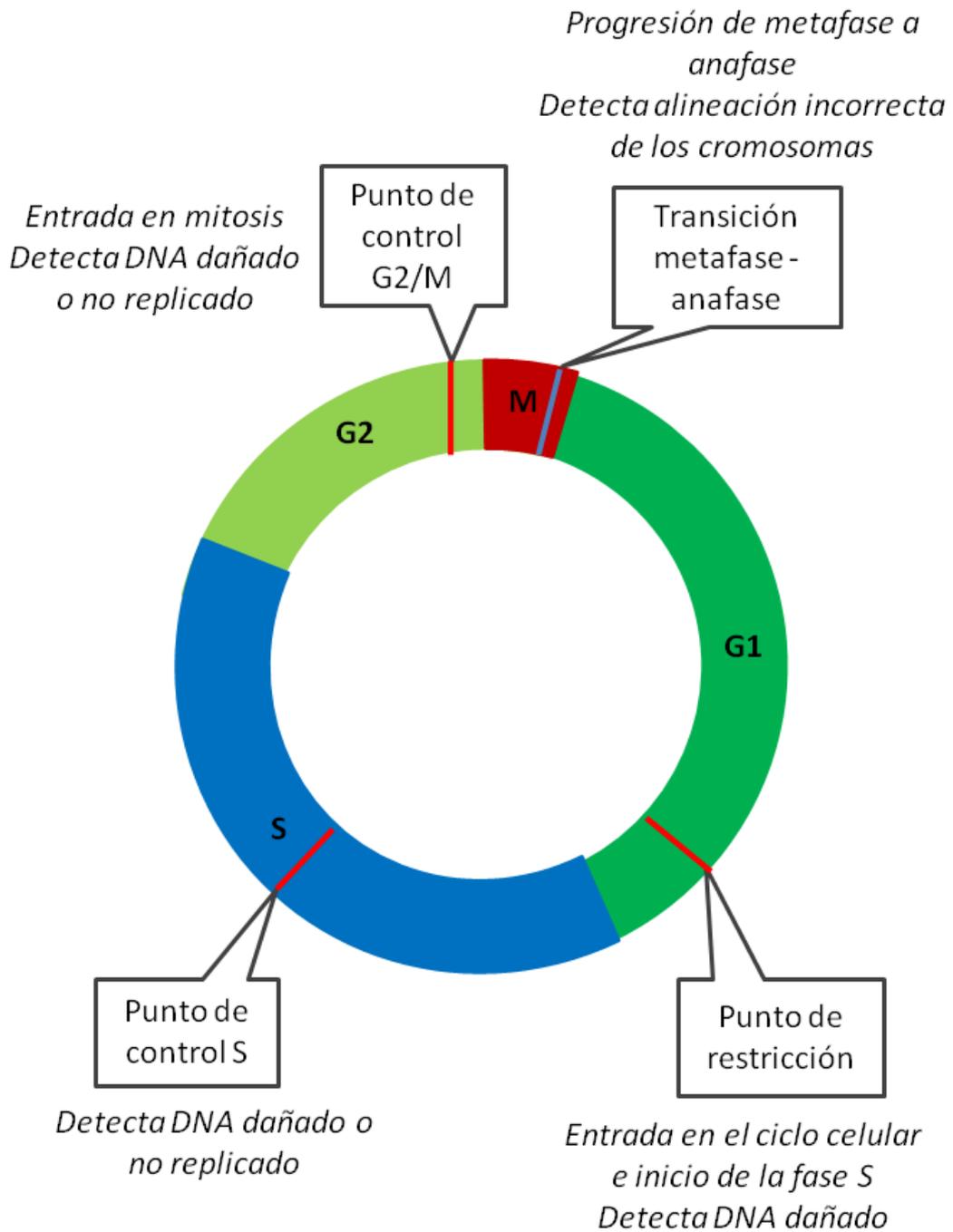


Figura 9. Fases del ciclo celular eucariota y puntos de control del mismo. Los puntos de control del ciclo celular aseguran la correcta progresión entre las distintas fases del mismo, comprobando que todos los procesos que tienen lugar dentro de una fase han sido realizados correctamente antes de pasar a la siguiente.

La mayoría de lo que se sabe acerca de la transición regulada de las células a través del ciclo celular viene de estudios genéticos y bioquímicos llevados a cabo en organismos inferiores. Uno de los primeros genes en que fue identificado como un regulador importante del ciclo celular en levaduras es *cdc2/cdc28* (Hartwell 1978; Nurse and Bisett 1981). La activación de esta kinasa requiere la asociación con una subunidad regulatoria denominada ciclina. Las ciclinas fueron identificadas por primera vez en invertebrados marinos como proteínas cuya acumulación y degradación oscilaba durante el ciclo celular (Evans et al. 1983; Rosenthal et al. 1980). La activación e inactivación secuencial de las kinasas dependientes de ciclinas, junto con la síntesis y destrucción periódica de las ciclinas es lo que proporciona los medios básicos para la regulación del ciclo celular.

En el caso de mamíferos, se han identificado 9 *cdks* y más de 16 ciclinas. Todas ellas contienen una región de homología conocida como *cyclin box*, que es el dominio usado para unir y activar *cdks*. Sin embargo, no todas las ciclinas intervienen en la regulación del ciclo celular. Se han identificado otras funciones, como la regulación de la transcripción, la reparación del DNA, diferenciación y apoptosis.

Además de la unión a las ciclinas, que es el primer nivel de regulación, existen otros niveles de regulación para controlar la actividad de las *cdks* a lo largo del ciclo celular. En segundo lugar, la activación de los complejos ciclina/*cdk* requiere la fosforilación de un residuo de treonina de la *cdk* conservado alrededor de la posición 160. El tercer mecanismo implica la fosforilación inhibidora de residuos de tirosina cerca del extremo N terminal de las *cdk*, la tirosina 15 en el caso de *cdk1* y *cdk2*, siendo la treonina adyacente (Thr 14) en el caso de los vertebrados. Por último, las actividades de las *cdks* también están controladas por la asociación con dos familias de proteínas, los inhibidores de *cdks* (CKI). Una de estas familias es la familia Cip/Kip, cuyos miembros pueden actuar sobre la mayoría de los complejos ciclina/*cdk* e incluso sobre algunas kinasas no relacionadas con las *cdks*. Sus principales miembros son  $p21^{Cip1/WAF1/SDI1/CAP20/PIC1/mda-6}$  (p21),  $p27^{Kip1}$  (p27) y  $p57^{Kip2}$  (p57). La otra familia de CKIs denominada INK4 se compone de  $p16^{INK4a}$  (p16),  $p15^{INK4b}$  (p15),  $p18^{INK4c}$  (p18) y  $p19^{INK4d}$  (p19). Esta familia de CKIs interacciona de forma específica con *cdk4* y *cdk6* pero no con otras *cdks*.

Los efectos combinados de todos estos tipos de regulación de cdk son los responsables del control de la progresión del ciclo celular en respuesta tanto a los puntos de control como a la variedad de los estímulos extracelulares que regulan la proliferación celular.

## **Progresión a lo largo del ciclo celular**

Las ciclinas de tipo D son las primeras en ser inducidas en cuanto las células son estimuladas para ciclar (Sherr 1994). Este tipo de ciclinas, a diferencia de las demás, no oscilan durante el ciclo celular, sino que sus niveles son controlados por la presencia de factores de crecimiento, al menos en algunos tipos celulares. Las ciclinas de tipo D se asocian y activan cdk4 y cdk6. El principal sustrato para las kinasas asociadas con ciclinas de tipo D es la proteína Rb (*retinoblastoma tumor supresor protein*). En células que carecen de Rb, la actividad de estas ciclinas no es necesaria para la progresión del ciclo celular (Lukas et al 1995). Además de funcionar como subunidades reguladoras para cdk4 y cdk6, las ciclinas de tipo D también ayudan en la fosforilación de Rb y las proteínas de la familia de Rb mediante interacción directa proteína – proteína (Dowdy et al 1993; Ewen et al. 1993; Kato et al. 1993).

Rb juega un papel fundamental regulando la progresión en G1 y es un componente clave en toda la red molecular que regula el punto de restricción. Rb es capaz de unirse y regular un gran número de proteínas celulares, incluyendo a miembros de la familia de factores de transcripción E2F (Johnson and Schneider – Broussard 1998). Los factores de transcripción E2F regulan la expresión de muchos genes que codifican proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular y la síntesis de DNA, incluyendo las ciclinas E y A, cdc2 (cdk1) y B – myb. Rb en su estado poco fosforilado se une a E2F, reprimiendo la transcripción de los genes regulados por E2F. La fosforilación de Rb por las kinasas unidas a ciclinas de tipo D (cdk4,6/ciclina D) tiene como resultado la disociación de Rb de E2F en la fase G1 avanzada. Es entonces cuando E2F activa la expresión de sus genes diana.

Mediante la activación por E2F, la ciclina E es la siguiente en ser activada durante la progresión de las células a través de G1 (Geng et al. 1996; Ohtani et al. 1995). La ciclina E se asocia con cdk2, y este complejo es necesario para la transición de G1 a S (Ohtsubo et al. 1995). El complejo ciclina E/cdk2 participa en el mantenimiento de Rb en su estado hiperfosforilado, participando por lo tanto en un feedback positivo para la acumulación de E2F activo (Hinds et al. 1992). La actividad de esta ciclina es necesaria también en las células que carecen de Rb, lo cual sugiere la existencia de una serie de sustratos adicionales para el complejo ciclina E/cdk2. Al igual que otros complejos ciclina/cdk, el complejo ciclina E/cdk2 fosforila la histona H1, actividad importante para la reorganización de la cromatina durante la replicación del genoma.

La ciclina A, que también está regulada en parte por E2F (Schulze et al. 1995), se acumula en la transición de la fase G1 a S y persiste durante la fase S. Esta ciclina se asocia inicialmente con cdk2 y más tarde, en la fase S, se asocia con cdk1. La actividad kinasa asociada a esta ciclina es necesaria para la entrada en fase S, para completar esta fase así como para la entrada en fase M (Girard et al. 1991; Walker and Mahler 1991; Lehner and O'Farrell 1989). Algunos miembros de la familia de E2F son regulados negativamente por ciclina A.

La fase G2 contiene un checkpoint que responde al daño en el DNA y provoca un retraso para permitir la reparación del DNA antes de que la célula entre en mitosis. La mitosis está regulada por cdk1 en asociación con las ciclinas A, B1 y B2 (Arellano and Moreno 1997; King et al. 1994). Estos complejos fosforilan proteínas que incluyen proteínas del citoesqueleto como lamininas, histona H1, y componentes del huso mitótico. Para que tenga lugar la salida de mitosis de las células, las ciclinas A y B deben ser degradadas, proceso en el que participan las kinasas asociadas a los complejos ciclina B/cdk1. Tras la mitosis, las células entran de nuevo en G1, y en el punto de restricción deben decidir de nuevo si entrar en otro ciclo celular.

A modo de resumen, podemos decir que el paso de G1 a S se regula principalmente por cdk2, cdk4 y cdk6 en asociación con las ciclinas D y E, siendo los complejos de cdk4 y cdk6 con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) las que desempeñan

## *Introducción*

un papel crítico en la progresión a través del punto de restricción en G1. Las ciclinas de tipo E (E1 y E2) se expresan posteriormente en G1, y los complejos cdk2/ciclina E son necesarios para el paso de G1 a S y el inicio de la síntesis del DNA. Los complejos de cdk2 con ciclinas de tipo A (A1 y A2) funcionan en la progresión de las células a través de la fase S. A continuación cdk1 regula el paso desde S a G2, y desde G2 a M, formando complejos con ciclinas de tipo A y tipo B (B1, B2 y B3), respectivamente. Si bien, las investigaciones recientes sobre cdk's y ciclinas en ratones modificados genéticamente parecen indicar que existe una redundancia entre diferentes ciclinas y cdk's, de tal forma que una pueda compensar la ausencia de otra.

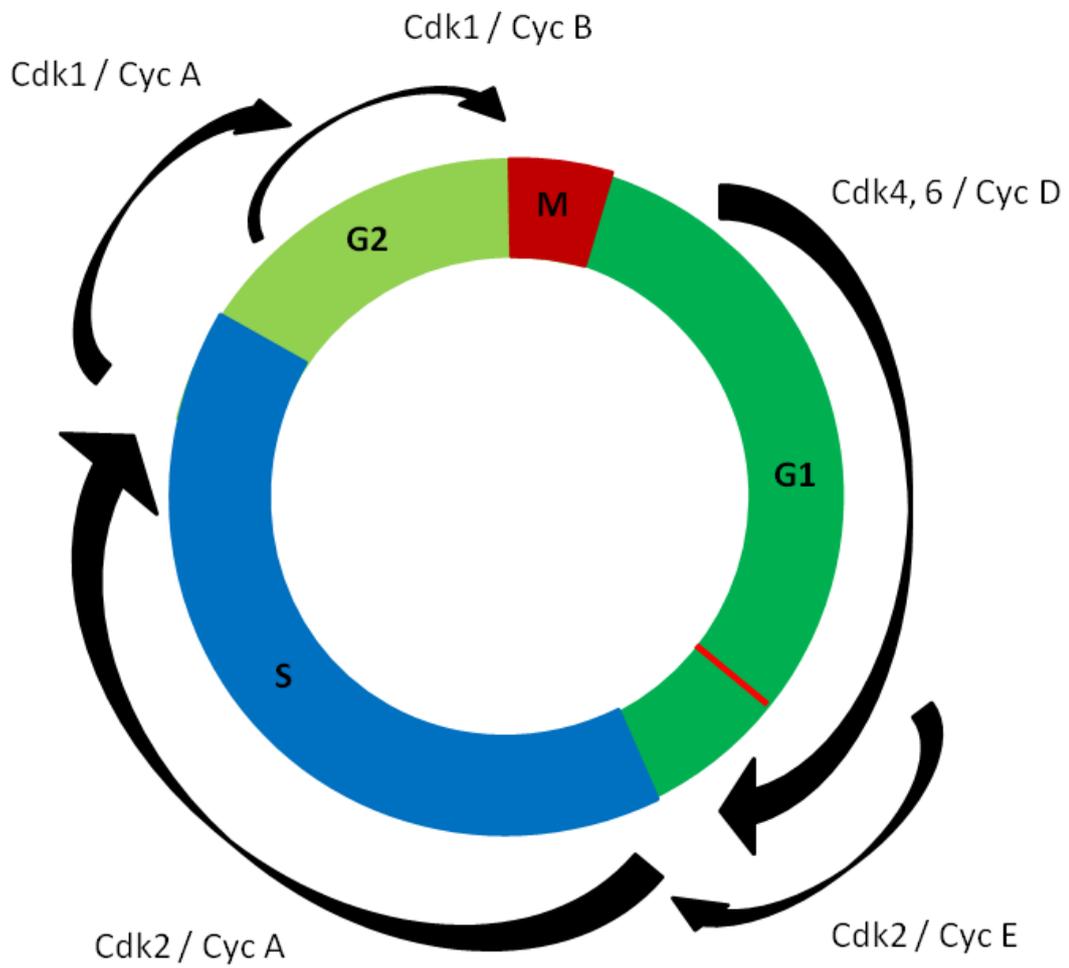


Figura 10. Fases del ciclo celular eucariota y complejos ciclina/Cdk que intervienen en la progresión a través del mismo. Una serie de proteínas denominadas ciclinas, que se activan e inactivan secuencialmente a lo largo del ciclo son responsables básicos de la regulación del ciclo celular.

## Interferencia de RNA (RNAi)

El descubrimiento del mecanismo de interferencia de RNA fue precedido de una serie de resultados inesperados en algunos experimentos. En 1990 se llevó a cabo la introducción de transgenes exógenos en petunias con la finalidad de modificar los colores de la flor mediante una modificación de la actividad de la chalcona sintasa, una enzima implicada en la producción de pigmentación específica en las flores de la petunia. Sin embargo, la sobreexpresión de esta enzima no produjo el resultado esperado de flores más oscuras, sino que en algunos casos se observó una pérdida total de color en las flores, lo que indicaba que los transgenes introducidos afectaban a la expresión de los genes endógenos, disminuyendo la actividad de la chalcona sintasa y dando como resultado flores parcialmente blancas (Napoli et al, 1990). Este fenómeno se denominó co-supresión, y más tarde fue renombrado como silenciamiento post – transcripcional (*post – transcriptional gene silencing, PTGS*) (Jorgensen et al, 1990; Van Blokland et al, 1994). En 1995 se observó la existencia de silenciamiento post – transcripcional mediado por RNA tanto de cadenas sentido como antisentido en *C. elegans* (Guo et al, 1995). En 1998 nuevos experimentos revelaron la existencia de un efecto génico silenciador tras la introducción de un RNA de doble cadena (dsRNA) en *C. elegans*. En este caso, el dsRNA silenciaba efectivamente el gen de interés. A partir de estos descubrimientos fue acuñado el término interferencia de RNA (*RNAi*) (Fire y Mello, 1998).

Hoy en día, la interferencia de RNA o silenciamiento post – transcripcional (PTGS) ha sido demostrado en diversos organismos, incluyendo *C. elegans*, insectos, planaria, *Tripanosoma brucei*, plantas, hongos y células de mamífero, incluyendo oocitos de ratón, embriones y células madre embrionarias.

El descubrimiento de RNAs bicatenarios de 25 nucleótidos, correspondientes con la secuencia del gen silenciado (tanto la secuencia sentido como la antisentido), en plantas infectadas con virus, fue básico para comprender el mecanismo de la interferencia de RNA. Estas moléculas de RNA bicatenario fueron observadas en

plantas que mostraban silenciamiento génico, pero no aparecían en aquellas que no presentaban evidencia alguna de co – supresión (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Posteriormente, estudios *in vitro* de la interferencia de RNA en extractos parcialmente purificados de las células S2 (Schneider 2) de *Drosophila* también demostraron la existencia de esas especies de RNA de unos 25 nucleótidos, homólogas al RNA mensajero objeto del silenciamiento, en fracciones que presentaban actividad de interferencia de RNA (Zamore et al, 2000; Hammond et al, 2000). Estudios posteriores en las células S2 y en embriones de *Drosophila* determinaron que esos pequeños RNAs de unos 21 – 25 nucleótidos eran el producto de la rotura del RNA bicatenario más largo mediada por una endonucleasa específica de RNA bicatenario denominada Dicer (Bernstein et al, 2001; Nykanen, Haley y Zamore, 2001). Los RNAs generados por Dicer fueron denominados RNAs pequeños interferentes (*siRNAs*, *short interfering RNAs*), y sirven de secuencias guía para inducir la rotura del RNA mensajero específico mediante el complejo RISC (*RNA – induced silencing complex*) (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore et al, 2000; Hammond et al, 2000; Yang et al, 2000). RISC contiene la proteína argonauta AGO2 de *Drosophila*, un miembro de la familia Argonauta, que se cree que es la endonucleasa que comienza la degradación del mRNA diana del proceso de interferencia (Hammond et al, 2001).

De un modo general, podemos decir que el mecanismo de interferencia de RNA es desencadenado por RNA bicatenario, que pasa a ser degradado en RNAs pequeños (*small RNAs*, *sRNAs*) mediante la maquinaria intracelular. En función de su origen o función podemos distinguir principalmente *siRNAs* (*short interfering RNAs*) y *miRNAs* (*micro RNAs*). En la naturaleza, el RNA bicatenario puede ser producido por virus (polimerización de RNA a partir de una hebra de RNA) o bien mediante hibridación de fragmentos solapantes (como secuencias repetitivas, del tipo de transposones). Estos RNAs bicatenarios dan lugar a *siRNAs*, que generalmente median la degradación del mRNA o bien la modificación de la cromatina. Por otra parte, existen transcritos endógenos que contienen repeticiones invertidas complementarias o semi – complementarias de unos 20 a 50 nucleótidos, que pueden plegarse formando

horquillas de RNA bicatenario. Este RNA bicatenario es procesado dando lugar a miRNAs que median la represión traduccional, aunque muchos de ellos también se encargan de guiar la degradación del mRNA.

## **Mecanismo de funcionamiento de la interferencia de RNA (RNAi)**

Basado en los datos anteriormente descritos, se ha propuesto el siguiente mecanismo de funcionamiento de la interferencia de RNA.

La maduración de las moléculas pequeñas de RNA es un proceso mediado por endonucleasas de tipo RNasa III específicas de RNA bicatenario, denominadas Drosha y Dicer, que presentan dominios catalíticos RNasa III y también de unión al RNA bicatenario. Drosha actúa específicamente en el procesamiento de precursores de miRNAs, pero no en el procesamiento de RNAs bicatenarios largos. Los miRNAs son transcritos como largos transcritos primarios, que son procesados en primer lugar por Drosha en el núcleo (Lee et al, 2002; Lee et al, 2003). Este precursor de miRNA es posteriormente exportado al citoplasma en donde vuelve a ser procesado, esta vez por Dicer.

Podemos decir que el eje central del mecanismo de interferencia de RNA es iniciado por la enzima Dicer, ya que en este punto es donde converge el mecanismo generado por las distintas moléculas pequeñas de RNA (sRNAs). Esta enzima procesa el RNA bicatenario en duplex de siRNA de 21 – 23 nucleótidos, con el extremo 3' cohesivo en donde sobresalen 2 ó 3 nucleótidos (Elbashir et al, 2001, Nature; Zamore et al, 2002; Bernstein et al, 2001), El siRNA resultante es incorporado al complejo siRNA – proteína RISC (Nykanen et al, 2001; Hammond et al, 2001). RISC es activada de manera ATP – dependiente a partir de una forma latente que contiene el siRNA a un complejo activado unido al siRNA desenrollado por una helicasa, con la separación de las cadenas del duplex de siRNA. RISC activado usa la cadena antisentido desenrollada del siRNA como guía para reconocer el RNA mensajero complementario. El RNA mensajero objetivo es entonces roto endonucleolíticamente cerca del centro de la

región cubierta por la cadena antisentido del siRNA (Elbashir et al, 2001, Genes. Dev.; Elbashir et al, 2001, EMBO J.) por una proteína de la familia Argonauta, componente del complejo RISC (Song et al, 2004; Liu et al, 2004)).

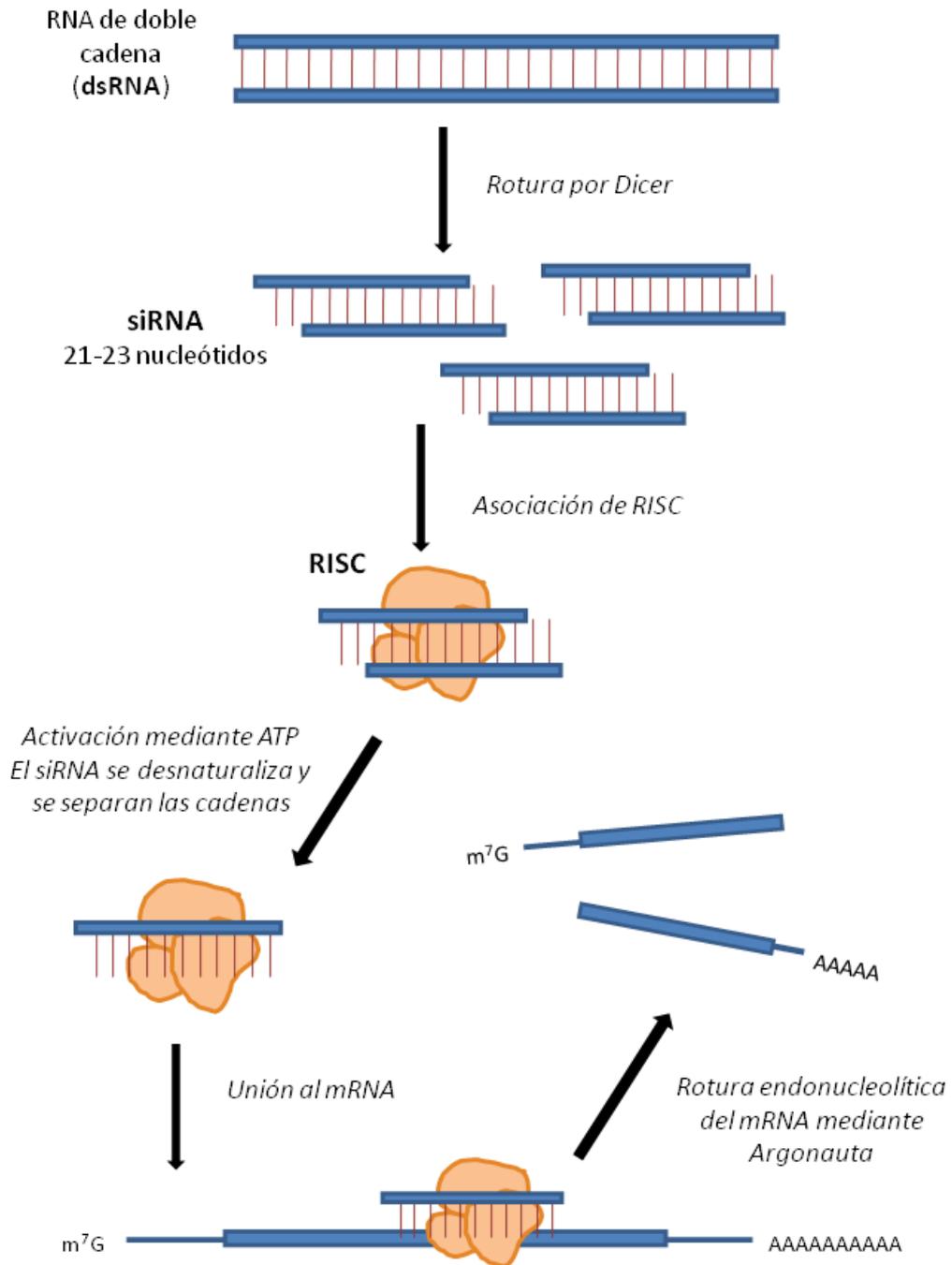


Figura 11. Mecanismo de funcionamiento de la interferencia de RNA. El RNA de doble cadena es roto por la enzima Dicer en pequeños fragmentos que se unirán al complejo RISC, siendo una de las dos cadenas usada como molde para reconocer la secuencia objetivo presente en el mRNA que será objeto de una rotura endonucleolítica, llevada a cabo por Argonata, enzima que forma parte del complejo RISC.

## RNAi como herramienta experimental

Antes de que la interferencia de RNA fuese aprovechada como herramienta experimental para silenciar determinados genes en mamíferos de un modo específico, tuvo que sobrepasarse un gran obstáculo. El problema residía en hacer que un RNA bicatenario exógeno dirigiese el silenciamiento génico de una manera específica sin desencadenar al mismo tiempo respuestas no específicas al RNA bicatenario como parte del “sistema antiviral” de la célula. Al principio se observó que la exposición de células de mamífero a moléculas largas de RNA bicatenario inducía rutas de respuesta inmune innata, incluyendo las respuestas reguladas por interferón que servían como mecanismo antiviral. La protein kinasa dependiente de RNA bicatenario (PKR, *dsRNA – dependent protein kinase*) se activa con la unión al RNA bicatenario, y da lugar a una represión de la síntesis proteica generalizada y a una destrucción de RNAs localizada pero independiente de secuencia y la consecuente muerte celular rápida con el fin de evitar la expansión por el organismo del virus que podría haber introducido ese RNA (Williams, 1997).

La existencia de estas rutas de respuesta inmune innata parecía incompatible con el uso de RNA bicatenario para silenciar un gen de interés concreto. Sin embargo, existían evidencias de la existencia de un mecanismo de interferencia de RNA en mamíferos, como el que aparezcan conservados componentes bioquímicos de la ruta (Bernstein et al, Nature 2001; Hammond et al, 2001). Además, se demostró que moléculas largas de RNA bicatenario podían mediar respuestas específicas cuando eran introducidas en embriones de mamíferos, o bien en líneas celulares embrionarias, en donde las respuestas antivirales no específicas al RNA bicatenario no son frecuentes.

Una vez se avanzó en el conocimiento del mecanismo de acción de la interferencia de RNA se llegó a la conclusión de que moléculas de RNA bicatenario inferiores a los 30 nucleótidos de longitud podían ser usadas para desencadenar el mecanismo de interferencia de RNA en mamíferos. También se observó que moléculas cortas de RNA bicatenario no desencadenaban la activación de PKR o de respuestas similares. Por lo tanto, parecía que podían ser capaces de dirigir una degradación

## Introducción

específica de secuencia de un mRNA homólogo, de un modo similar al que aparece en plantas, nematodos y moscas (Elbashir et al, Nature 2001). Los siRNAs de unos 20 nucleótidos, cuando eran introducidos en células de mamífero, se unían directamente a RISC y promovían el silenciamiento de la expresión de genes con la misma secuencia.

La interferencia de RNA se usa actualmente de un modo muy amplio en investigación biológica y biomédica, para estudiar el efecto del bloqueo de la expresión de un gen. Se trata de una herramienta que presenta un enorme potencial, permitiendo un análisis más rápido de las funciones de un gen que utilizando otros métodos como la recombinación homóloga.

Los siRNAs pueden ser introducidos en las células de mamífero usando una amplia variedad de métodos. En el caso de los sintetizados química o enzimáticamente *in vitro* pueden ser introducidos mediante métodos de transfección física (introducción exógena). De un modo alternativo, los siRNAs pueden ser expresados endógenamente mediante sistemas de expresión adecuados. Estas estrategias requieren de vectores basados en DNA o RNA y dependen de métodos de transferencia génica que incluyen métodos físicos o infección viral (Brummelkamp et al, 2002; Paddison et al, 2004). La eficacia y la duración del silenciamiento viene determinada por varios factores como son la eficiencia de transfección, la cantidad de siRNA introducido y el potencial de cada siRNA a la hora de suprimir el gen objetivo, es decir, su potencia.

El uso de siRNAs y shRNAs son enfoques complementarios en la aplicación de la interferencia de RNA como una herramienta genética en mamíferos, y el mejor enfoque depende del tipo de estudio que se esté llevando a cabo.

## II. OBJETIVOS

*“No hay viento favorable para el que no sabe  
dónde va”*

*Lucio Anneo Séneca*



1. Estudiar el posible papel de *pelota* en el ciclo celular de mamíferos.
2. Dilucidar la localización intracelular de la proteína expresada por el gen.
3. Estudiar la relación de *pelota* con los mecanismos de control de calidad del mRNA.



# III. MATERIALES Y MÉTODOS

*"Las máquinas me sorprenden con mucha frecuencia"*

*Alan Turing*



## REACTIVOS EMPLEADOS

- **DEPC** (*Diethyl pyrocarbonate*) Sigma D5758
- **Gly – Gly** (*Glycyl-glycine*) Sigma G3915
- **Ácido clorhídrico** (*Hydrochloric acid; HCl*) Merck 1.00317
- **FBS** (*Foetal Bovine Serum*) Gibco-Invitrogen 10270 - 106
- **SDS** (*Sodium Dodecyl Sulfate*) Sigma L4509
- **CaCl<sub>2</sub>** (*Calcium chloride*) Panreac 131232.1211
- **KCl** (*Potassium chloride*) Merck 1.04936
- **Glucosa** (*D(+)-Glucose*) Merck 1.08337
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** (*di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate*) Merck 1.06580
- **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (*Sodium dihydrogen phosphate dehydrate*) Merck 1.06345
- **NaCl** (*Sodium chloride*) Panreac 131659.1211
- **Acetato potásico** (*Potassium acetate*) Calbiochem 529543
- **Acetato magnésico** (*Magnesium acetate tetrahydrate*) Merck 1.05819
- **HEPES** (*4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid*) Sigma H3375
- **KOH** (*Potassium hydroxide*) Merck 1.05033
- **Triptona** (*BactoTriptona*) BD 214010
- **Extracto de levadura** (*Yeast extract granulated*) Merck 1.03753
- **MgSO<sub>4</sub>** (*Magnesium sulfate heptahydrate*) Sigma 230391
- **EGTA** (*Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) Sigma E3889
- **EDTA** (*Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*) Sigma E5134
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (*Sodium carbonate decahydrate*) Merck 1.06391
- **NaOH** (*Sodium hydroxide*) Panreac 131687.1211
- **BSA** (*Albumin from bovine serum*) Sigma A7888
- **RNasa** (*Ribonuclease A from bovine pancreas*) Sigma R6513
- **β-mercaptoetanol** (*2 – mercaptoethanol*) Sigma M3148
- **Triton® X-100** Sigma X100
- **NH<sub>4</sub>Cl** (*Ammonium chloride*) Sigma A9434
- **Azida sódica** (*Sodium azide; NaN<sub>3</sub>*) Merck 1.06688
- **Paraformaldehido** Merck 1.04005
- **Tris** (*Trizma® base*) Sigma T6066
- **Glicina** (*Glycine*) Sigma G7126
- **TEMED** (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*) Sigma T9281

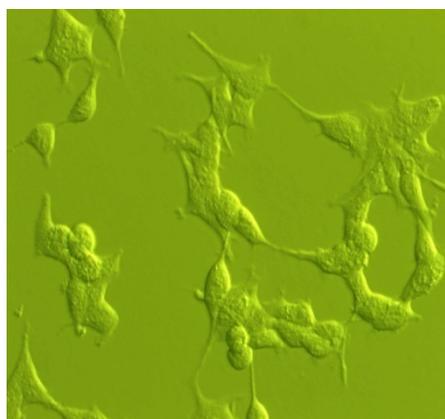
- **Acrilamida** (*Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution for electrophoresis, 29:1*) Sigma A3574
- **Azul de bromofenol** (*Bromophenol blue*) Merck 1.08122
- **$\epsilon$ -Aminocaproic acid** Sigma A2504
- **Isopropanol** (*2-Propanol*) Merck 1.09634
- **Tween®20** Sigma P9416
- **BioRad Protein Assay**. Dye Reagent Concentrate 500-0006
- **DTT** (*DL-Dithiothreitol*) Fluka 43815
- **Formaldehido** (*Formaldehyde solution min. 37% free from acid*) Merck 1.03999
- **Isobutanol** Merck 1.00984
- **Acetona** Panreac 131007.1611
- **Metanol** Merck 1.06009

1. Cultivo celular.

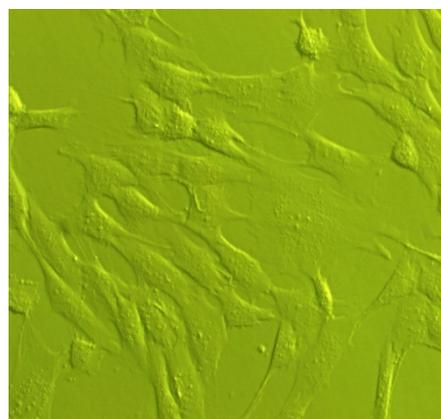
1.1. Líneas celulares y mantenimiento.

Las líneas celulares empleadas en el estudio han sido HEK 293, células embrionarias humanas de riñón transformadas con DNA del adenovirus tipo 5, SaOS2, línea celular derivada de osteosarcoma humano, y HCA2-hTERT, fibroblastos embrionarios humanos inmortalizados mediante la expresión ectópica del gen de la telomerasa, lo cual permite la restauración de la actividad de esta transcriptasa reversa. Las tres líneas se mantienen en un incubador de cultivos celulares, con unas condiciones constantes de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada.

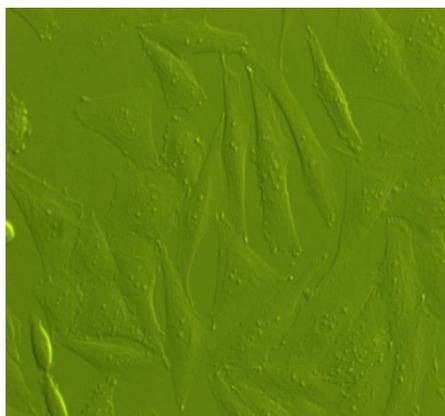
Las líneas HEK 293 y SaOS2 han sido cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Invitrogen) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781). La línea celular HCA2-hTERT ha sido cultivada en DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6429) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Invitrogen) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781).



HEK 293      *Objetivo 20X.*



HCA2-hTERT *Objetivo 20X.*



SaOS2      *Objetivo 20X.*

*Figura 12. Fotografía realizada con un microscopio invertido de las distintas líneas celulares empleadas en el estudio.*

## 1.2. Tripsinización

Al llegar las células a una confluencia del 80-90%, se subcultivaron por tripsinización siguiendo el protocolo. Se elimina el medio de la placa de cultivo y se lava la misma con solución salina tamponada (PBS, Phosphate Buffered Saline, Sigma D8537). Se añade la Tripsina – EDTA al 0'25% (Sigma T3924), normalmente 1 ml por placa de 90 mm y se dejan las células unos minutos en el incubador para que se despeguen. Cuando las células están despegadas se les añade el medio necesario para hacer la dilución deseada y se siembran las placas correspondientes.

## 1.3. Contaje celular

Cuando para la realización de un experimento era necesario sembrar un número determinado de células para mantener la reproducibilidad y exactitud del mismo, así como para lograr una confluencia adecuada de las células, se contaron las células empleando una cámara de Neubauer. Para ello se tripsinizan las células y se resuspenden en un volumen de medio adecuado. Se toman 10  $\mu$ l de la suspensión celular y se llena la cámara de contaje, contando las células situadas en el cuadrante central y en los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara. Para calcular el número de células que tenemos por cada ml se multiplica el número contado por 10.000 (en función del volumen de la cámara). El número total de células lo obtendremos de multiplicar este valor por el número de ml en el que resuspendimos inicialmente las células.

## 1.4. Congelación de líneas celulares

Para mantener la disponibilidad de las líneas celulares se congelaron una vez alcanzado un 90 % de confluencia en las placas de cultivo. Para ello se eliminó el medio de las placas de cultivo, que se lavaron con PBS. Se utiliza tripsina para despegar las células, que se recogen en 10 ml de medio en un tubo y se centrifugan a 1.000 rpm durante 5 minutos.

Se aspira el medio y se resuspenden las células en 1 ml de medio de cultivo completo con un 10 % de DMSO (Sigma D2650). Este ml se pasa a un vial de congelación (Nunc™ CryoTube™ Vials) debidamente marcado con el nombre de la línea celular, la fecha de congelación y el nombre del manipulador, y se dejan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, en una gradilla para que la congelación sea lo más lenta posible. Transcurrido ese tiempo se almacenan en Nitrógeno líquido, en donde permanecerán guardadas hasta que sea necesaria su descongelación.

#### 1.5. Descongelación de líneas celulares

Para descongelar células hay que procurar que esta sea lo más rápida posible, para evitar el posible daño que el DMSO pueda producir en las células. Para ello se saca el vial de congelación con las células del Nitrógeno líquido y se sumerge en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que se descongele el medio. Después se coge el contenido del vial con una pipeta y se mezcla lentamente con el medio de cultivo adecuado previamente atemperado y depositado en una placa. Algunas células más susceptibles, como es el caso de las HEK 293, necesitan un paso previo de centrifugación para eliminar el medio que contiene el DMSO, antes de ser resuspendidas en medio completo y depositadas en la placa de cultivo.

#### 1.6. Sincronización con timidina.

Para algunos experimentos fue necesaria la sincronización de todas las células en la misma fase del ciclo celular. Para ello se ha usado timidina (Sigma T1895), en un doble bloqueo, que sincroniza a todas las células al comienzo de la fase S del ciclo celular.

Es necesario que tanto el PBS como el medio de cultivo con y sin timidina estén a  $37^{\circ}\text{C}$ ; para ello es conveniente preparar alícuotas de cada uno de los compuestos, que serán atemperados con suficiente antelación en el incubador o bien en el baño.

## Materiales y métodos

- Se siembran un número de células apropiado por placa de cultivo que se han de cultivar alrededor de 24 horas en el incubador de cultivos celulares.
- Se cambia a cada placa el medio de cultivo por medio con timidina 2 mM. Para ello se parte de un stock de timidina 100 mM disuelto en el medio de cultivo y almacenado en alícuotas de 1 ml a -20°C.
- 14 horas después del cambio, se lavan las células 3 veces con PBS y se añade medio de cultivo sin timidina.
- 11 horas después, se cambia a medio de cultivo con timidina 2 mM.
- 14 horas (o 24 horas, según el momento en el que se deba recoger la muestra) después del cambio, se lava 3 veces con PBS y se añade el medio de cultivo sin timidina. Este momento es el que se considera  $t = 0$ .

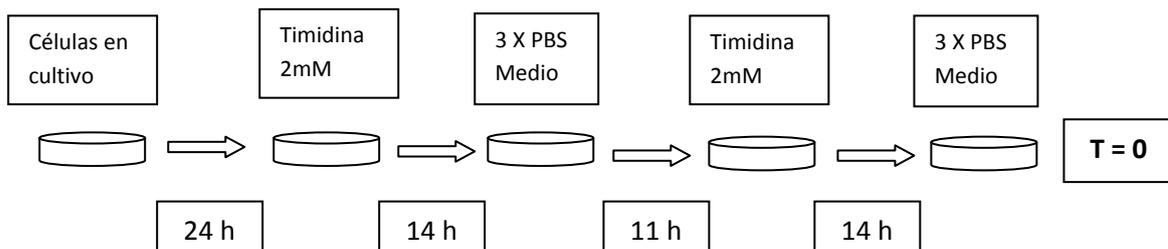


Figura 13. Esquema gráfico de la sincronización de líneas celulares mediante el doble bloqueo con timidina.

### 1.7. Transfecciones

Mediante el proceso de transfección introducimos DNA purificado en células eucariotas en cultivo para conseguir la producción de una determinada proteína en cuestión, o bien la inhibición de la misma en el caso de trabajar con shRNAs. El DNA utilizado para transfectar ha sido DNA plasmídico.

### 1.7.1. Transfección mediante fosfato de calcio

Este método fue originalmente descrito por Graham y Van der Eb (1973). El DNA plasmídico es introducido en la monocapa del cultivo celular mediante la formación de un precipitado que se adhiere a la superficie celular. El protocolo básico usa una solución tamponada con HEPES para formar un precipitado de fosfato de calcio directamente sobre las células

El precipitado, que contiene fosfato de calcio y el DNA, se forma mezclando gradualmente una solución salina tamponada con HEPES con una solución que contiene cloruro de calcio y el DNA. Este precipitado se adhiere a la superficie de las células y debería ser visible en el microscopio de contraste de fases el día siguiente al de la transfección.

El protocolo a seguir es el siguiente:

- El día anterior al de la transfección se tripsinizan las células y se siembran a una dilución en la cual las células resulten estar a una confluencia de un 70 % en el momento de la transfección.
- Una hora antes de la transfección se cambia el medio de las células por uno nuevo.
- Se hacen las mezclas de DNA correspondientes junto con H<sub>2</sub>O y CaCl<sub>2</sub> 0,5M.
- En otro tubo se pone el HBSS y burbujeando esta solución se añaden las mezclas de DNA sobre la misma gota a gota.
- Dejar reposar 15-20 minutos.
- Añadir el volumen correspondiente de cada mezcla.
- Poner las células en el incubador de 5% de CO<sub>2</sub>.
- Dejar 16 -24 horas.
- Lavar 3 veces con PBS cada pocillo.
- Añadir medio completo.
- Esperar una hora y cambiar el medio de nuevo.
- Recoger las células transcurrido el tiempo conveniente para cada experimento (en nuestro caso, los ensayos fueron realizados 48 horas post-transfección, contadas a partir del momento de lavado de los cristales de fosfato de calcio).

	Número de células a sembrar (HEK 293)	µg de DNA total	Volumen medio placa cultivo	Volumen H <sub>2</sub> O + plásmido	Volumen CaCl <sub>2</sub>	Volumen HBSS	Volumen mezcla a añadir por placa.
<b>p60</b>	700.000	10 µg	4 ml	100 µl	100 µl	200 µl	400 µl
<b>p90</b>	2·10 <sup>6</sup>	25 µg	8 ml	200 µl	200 µl	400 µl	800 µl

Para la realización de transfecciones en placas de cultivo de otro tamaño, el cálculo de la mezcla se hará en función del volumen de medio que contiene la placa, mientras que el número de células a sembrar se calcula en función de la superficie de la placa de cultivo a utilizar.

Soluciones empleadas:

<b>CaCl<sub>2</sub> 0'5 M</b>	
Se prepara la solución a la molaridad indicada y se filtra en cámara de cultivo para que la solución esté estéril, usando filtros de 0'22 µm.	

<b>HBSS</b>	
<b>HEPES</b>	50 mM
<b>KCl</b>	10 mM
<b>Glucosa</b>	12 mM
<b>NaCl</b>	280 mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1'5 mM
Es muy importante ajustar el pH a 7'05 antes de enrasar. Esta solución se debe de filtrar usando filtros de 0'22 µm en cámara de cultivo, para que esté estéril en el momento de utilizarla.	

### 1.7.2. Electroporación

En este caso, la introducción del DNA en las células en cultivo se lleva a cabo mediante la aplicación de pulsos eléctricos a las células, lo que provoca la apertura de poros en la membrana de éstas, con la consiguiente penetración del DNA presente en el medio de electroporación.

Para realizar la electroporación hemos usado el Nucleofector™ II de Amaxa, y el kit utilizado ha sido el Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa Ref. 565VCA – 1003).

Las líneas celulares electroporadas fueron SaOS2, usando el programa D – 024, y HCA2 – hTERT usando el programa T – 024.

Para realizar el procedimiento se ha seguido el protocolo indicado para el kit V.

- Cambiar el medio cada 2-3 días.
- Tripsinizar las células 2-3 días antes de la electroporación.
- Las células deben ser electroporadas a una confluencia del 70 – 85 %

Por muestra de electroporación se emplea:

- $10^6$  –  $5 \times 10^6$  células.
- 1-5  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico en un volumen máximo de 5  $\mu\text{l}$  o 2 nM - 2  $\mu\text{M}$  siRNA (concentración final de 3 ng – 3  $\mu\text{M}$  por muestra).
- 100  $\mu\text{l}$  de solución de nucleofección.

Protocolo a seguir:

- Cultivar el número requerido de células.
- Preparar 1 – 5  $\mu\text{g}$  de DNA por cada muestra.
- Precalentar la solución de nucleofección a temperatura ambiente. Precalentar una alícuota de medio de cultivo a 37°C (500  $\mu\text{l}$  por muestra).
- Preparar placas de cultivo con el volumen de medio adecuado y precalentarlas en en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.



*Nucleofector™ II de Amaxa*

## *Materiales y métodos*

- Eliminar el medio de las células en cultivo. Lavar con PBS.
- Tripsinizar las células, con tripsina-EDTA y recoger en medio de cultivo.
- Contar las células y hacer alícuotas que contengan  $10^6$  células.
- Centrifugar a 900 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Eliminar completamente el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en la solución de nucleofección. Evitar que la suspensión celular permanezca más de 15 minutos en esta solución, ya que podría reducir la viabilidad celular y la eficiencia de transfección.
- Añadir el DNA a cada suspensión celular (2  $\mu$ g DNA o 0,5 – 3  $\mu$ g siRNA).
- Transferir la muestra a una cubeta apropiada para la electroporación, evitando la formación de burbujas de aire, y tapar la cubeta.
- Seleccionar el programa de electroporación adecuado (dependiendo principalmente del tipo celular).
- Para evitar el daño celular quitar la muestra de la cubeta inmediatamente después de la finalización del programa de electroporación. Añadir 500  $\mu$ l de medio previamente precalentado a 37 °C y transferir la muestra a la placa de cultivo previamente preparada, empleando para ello las pipetas de plástico que se suministran con el kit, para prevenir el daño celular y evitar la pérdida de células.
- Incubar las células en el incubador de cultivos celulares a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de la transfección, analizar la expresión del gen a los tiempos correspondientes.

## 2. Modificaciones enzimáticas del DNA.

Para realizar la subclonación de los genes o fragmentos de interés en distintos plásmidos, fue necesario realizar el corte de los mismos con distintas enzimas de restricción y el posterior ligado de los distintos fragmentos, dando como resultado un nuevo vector plasmídico.

### 2.1. Corte con enzimas de restricción.

El corte con enzimas de restricción se realiza para linealizar un vector que usaremos en una subclonación posterior, para liberar un fragmento del mismo, o bien para realizar cortes de tipo diagnóstico para la identificación de vectores plasmídicos.

Se realiza en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las cantidades y reactivos empleados son los siguientes:

<b>Plásmido</b>	<b>1 <math>\mu</math>g</b>
<b>Tampón enzima 10X</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>BSA 10X (opcional en función del enzima)</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>Enzima de restricción</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Completar a 20 <math>\mu</math>l</b>

En el caso de realizar el corte con varias enzimas de restricción, se usará para el mismo un tampón que sea compatible con ambas, en función de las descripciones del fabricante. Todas las enzimas de restricción y sus correspondientes tampones han sido pedidos a New England Biolabs.

Los cortes enzimáticos fueron realizados durante unas 2 horas a 37°C.

### 2.2. Ligado de fragmentos de DNA.

Para ligar un vector plasmídico con un inserto, utilizamos la enzima T4 DNA Ligasa, que usa un tampón propio y funciona a temperatura ambiente. El volumen final para el ligado es de 10  $\mu$ l, y normalmente usaremos una relación 1:3 molar del vector respecto al inserto, en función de la cuantificación realizada corriendo los fragmentos purificados en un gel de agarosa al 1% y por comparación con un marcador de pesos

moleculares y concentraciones conocidas. El proceso de ligado se lleva a cabo durante un mínimo de 1 hora a toda la noche a temperatura ambiente.

### 3. Electroforesis en geles de agarosa.

Se realizó la separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis. Para ello se usaron geles de agarosa al 1% en TAE 1X y con un 0'05% de Bromuro de Etidio (Sigma). A las muestras les añadimos tampón de carga para DNA 6X, la cantidad necesaria para que quede a una concentración 1X.

Para comparar la intensidad de las bandas o bien reconocer el fragmento de nuestro interés en función de su peso molecular, usamos un marcador de peso molecular preteñido  $\lambda$  EcoRI / HindIII (Promega).

Soluciones empleadas:

TAE	
<b>Trizma base</b>	40 mM
<b>EDTA</b>	1 mM
<b>Ácido acético glacial</b>	0'012 % (v/v)

Tampón de carga para DNA (6X)	
<b>Glicerol</b>	50 %
<b>EDTA pH 8</b>	1 mM
<b>Azul de bromofenol</b>	0'4 %

### 3.1. Aislamiento de fragmentos de DNA después de electroforesis en geles de agarosa.

En primer lugar se realiza una purificación de la agarosa usando el kit comercial GeneClean® Kit (Q – Biogene).

Tras la purificación, corremos 1 µl del volumen final en un gel de agarosa al 1% para estimar la concentración y cantidad de DNA que hemos conseguido aislar y calcular los volúmenes a utilizar para su posterior uso (por comparación con un marcador de pesos moleculares y concentraciones conocidas).

## 4. Plásmidos y RNA de interferencia

### 4.1. Relación de plásmidos empleados.

#### **pSUPER (Brummelkamp et al., 2002)**

Obtenido del Dr. R. Agami (The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, Netherlands). Vector de expresión en mamíferos que dirige la síntesis de pequeños transcritos del tipo de shRNA. Este vector emplea el promotor de la polimerasa III – H1 - RNA.

#### **pSUPER 293, pSUPER 558 y pSUPER 1138**

Desarrollados a partir del vector pSUPER. Codifican para distintos shRNAs dirigidos contra distintas secuencias de la región codificante del gen *pelota*.

#### **pcDNA 3.1 / Zeo (+)**

Vector derivado de pcDNA 3.1. Presenta el promotor CMV (citomegalovirus humano).

### **pcDNA 3.1 / Zeo (+) myc *pelota***

Subclonamos la secuencia codificante para *pelota* a partir de pBluescript KS *pelota*. Corte del vector vacío (pcDNA 3.1 / Zeo (+)) y del vector pTRE myc *pelota* con BamHI y XbaI y ligado del fragmento myc – *pelota* liberado y del vector vacío.

### **pCMV $\beta$**

Vector reporter diseñado para expresar  $\beta$  – galactosidasa en células humanas mediante el promotor CMV (citomegalovirus).

### **pBluescript KS**

### **pBluescript KS *pelota***

Subclonamos la secuencia codificante del gen *pelota* de ratón en este vector por su mayor facilidad, para su posterior subclonación en un vector de expresión. Para ello extrajimos RNA de la línea celular MEFs Tet Off, a partir del cual amplificamos la secuencia codificante del gen *pelota* usando los oligos *mpelup* y *mpeldo*. Cortamos con HindIII y Not I y ligamos en el vector vacío.

### **pEGFP – C1**

Codifica para una variante del GFP *wild – type*, que ha sido optimizado para obtener una mejor fluorescencia y una mayor expresión en células de mamífero.

### **pEGFP – C1 *pelota***

Subclonamos en este vector la secuencia codificante para *pelota* obtenida a partir de pBluescript *pelota*. Corte del vector vacío (pEGFP – C1) y de pBluescript

*pelota* con HindIII y SacII y posterior ligado del vector vacío linealizado con el fragmento de *pelota* liberado.

### **pECFP – C1**

Codifica una variante fluorescente cian mejorada del gen GFP de *Aequorea victoria*. El gen ECFP presenta seis sustituciones aminoacídicas que le confieren espectros de emisión y excitación similares a otras variantes cian, al mismo tiempo que aumentan el brillo y la solubilidad de la proteína. Este vector contiene un origen de replicación SV40 y un gen de resistencia a neomicina para su uso en células eucariotas.

### **pECFP – C1 *pelota***

Subclonamos en este vector la secuencia codificante para *pelota* obtenida a partir de pBluescript *pelota*. Corte del vector vacío (pECFP – C1) y de pEGFP – *pelota* con HindIII y SacII, y ligado posterior del vector vacío linealizado con el inserto de *pelota* liberado.

### **pGL STOP, pGL non STOP**

Obtenidos del Dr. Akimitsu (Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi, Tsukubashi, Ibaraki, Japan). Vectores utilizados para estudiar el sistema NonStop Mediated Decay. El segundo vector es el reporter, ya que carece de codón stop en pauta y da lugar a un mRNA susceptible de ser degradado mediante NonStop Mediated Decay.

### pGL STOP SL, pGL non STOP SL

Obtenidos del Dr. Akimitsu (Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi, Tsukubashi, Ibaraki, Japan). Vectores utilizados para estudiar el sistema NoGo Decay. El segundo vector es el reporter, ya que presenta una horquilla muy estable en su estructura y la ausencia de un codón stop previo, dando lugar a un mRNA susceptible de ser degradado mediante NoGo Decay.

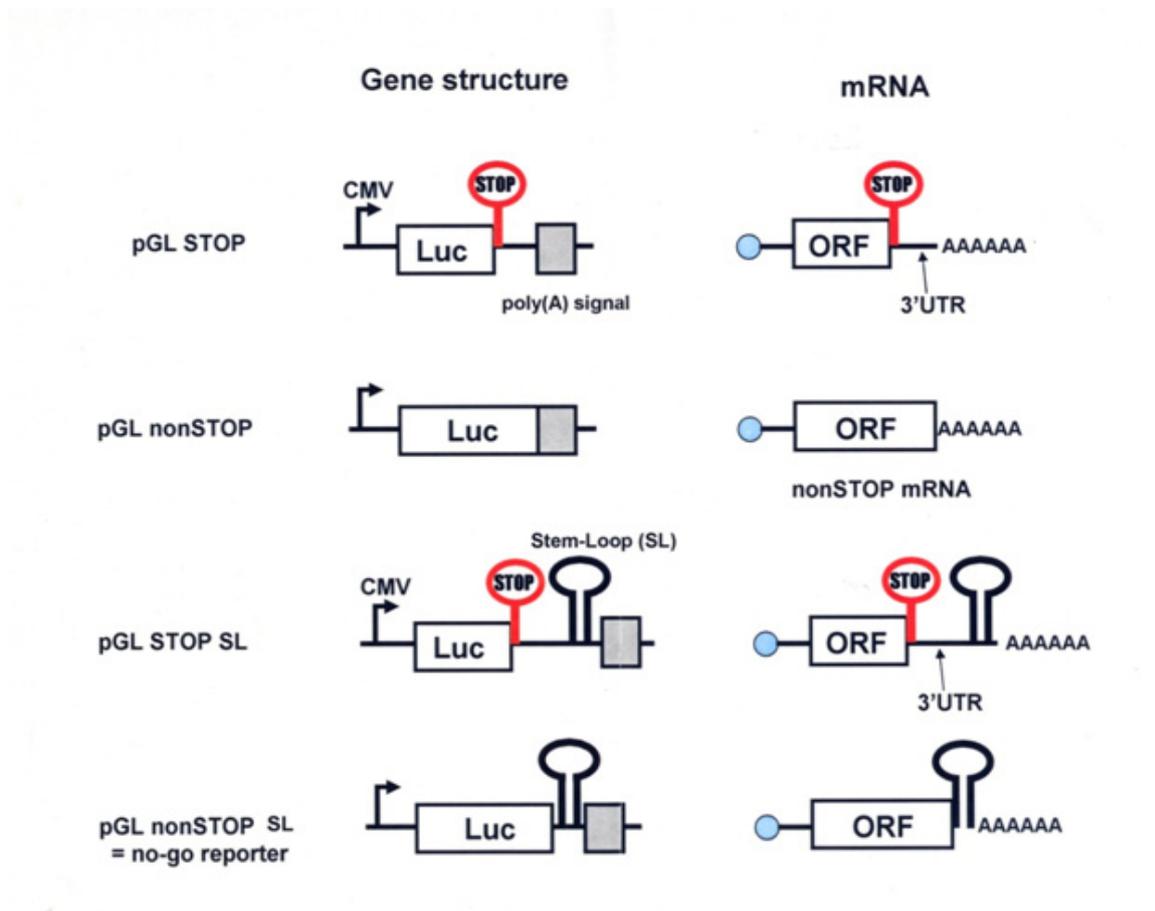


Figura 14. Mapas de los vectores reportero de los sistemas NonStop y NoGo Decay. En las figuras están representados tanto la estructura del gen como la del mRNA al que dan lugar. Los vectores reportero del sistema NonStop son pGL Stop (control) y pGL nonStop (reporter). Los vectores reportero del sistema NoGo son pGL stop SL (control) y pGL nonStop SL (reporter).

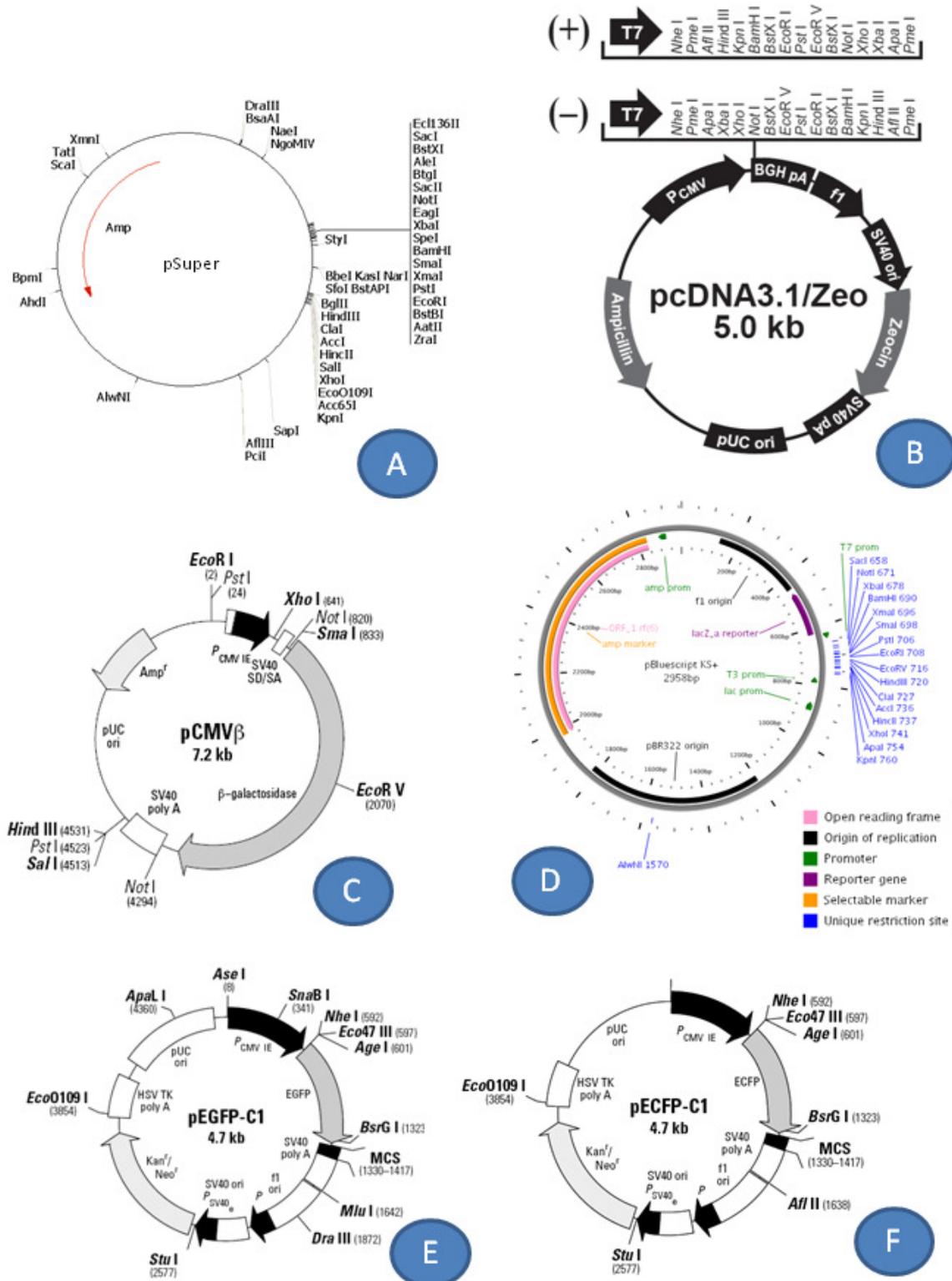


Figura 15. Mapas de los plásmidos empleados, con sus características principales indicadas así como los lugares de corte de las principales enzimas de restricción.

A: pSuper. B: pcDNA 3.1 / Zeo (+). C: pCMVβ. D: pBluescript KS (+). E: pEGFP - C1. F: pECFP - C1.

4.2. Construcción de plásmidos y RNA de interferencia (oligos empleados).

Para los experimentos en los que empleamos RNA de interferencia, construimos en un primer momento tres plásmidos distintos, dirigidos contra distintas regiones de la secuencia de nuestra proteína. Estas regiones fueron seleccionadas siguiendo el protocolo recomendado para la construcción de shRNAs utilizando el vector pSUPER (Brummelkamp et al. 2002).

<b>shRNA 293</b>		<b>Secuencias</b>
<b>Secuencia</b>	<b>CCGGGTCCGCACTACCCTC</b>	
<b>Oligo forward</b>	gatcccc <b>CCGGGTCCGCACTACCCT</b> Cttcaagaga <b>GAGGGTAGTGCGGACCCGGt</b> tttgaaa	
<b>Oligo reverse</b>	agcttttcaaaaa <b>CCGGGTCCGCACTACCCTC</b> tctcttgaa <b>GAGGGTAGTGCGGAC</b> <b>CCGG</b> ggg	

<b>shRNA 558</b>		<b>Secuencias</b>
<b>Secuencia</b>	<b>GATGGGGGCTTACCACACC</b>	
<b>Oligo forward</b>	gatcccc <b>GATGGGGGCTTACCACACC</b> tcaagaga <b>GGTGTGGTAAGCCCCATCt</b> tttgaaa	
<b>Oligo reverse</b>	agcttttcaaaaa <b>GATGGGGGCTTACCACACC</b> tctcttgaa <b>GGTGTGGTAAGCCCC</b> <b>CATC</b> ggg	

<b>shRNA 1138</b>		<b>Secuencias</b>
<b>Secuencia</b>	<b>CCGGATCGAGCTTTCTATG</b>	
<b>Oligo forward</b>	gatcccc <b>CCGGATCGAGCTTTCTATG</b> ttcaagaga <b>CATAGAAAGCTCGATCCGGt</b> tttgaaa	
<b>Oligo reverse</b>	agcttttcaaaaa <b>CCGGATCGAGCTTTCTATG</b> tctcttgaa <b>CATAGAAAGCTCGATC</b> <b>CGG</b> ggg	

Las distintas secuencias fueron seleccionadas a partir de la secuencia de mRNA codificante para *pelota* humana. Se trata de secuencias de 19 nt, que preferiblemente se encuentran flanqueadas en el mRNA por AA en el extremo 5' y por TT en el extremo 3'. También dan buenos resultados las secuencias flanqueadas solamente por AA en 5'. Las regiones a seleccionar en el mRNA han de encontrarse preferiblemente en la región codificante, a unos 100 pares de bases del inicio y terminación de la transcripción. La riqueza en GC de la secuencia ha de ser preferiblemente superior a un 30%. Los oligos construidos constan de 64 nt cada uno.

Los oligos de 64 nt fueron encargados a Thermo Scientific, y sintetizados a una escala de 0'02  $\mu$ M.

Para la construcción de los vectores se procedió del siguiente modo:

a. Anillado de oligos.

- Disolver los oligos a una concentración de 3  $\mu$ g/ $\mu$ l.
- Pipetear en un tubo eppendorf 1  $\mu$ l de cada oligo (forward + reverse).
- Añadir 48  $\mu$ l de tampón de anillado (annealing buffer).
- Incubar 4 minutos a 95°C.
- Incubar 10 minutos a 70°C.
- Enfriar lentamente los oligos anillados a 4°C (o 10°C).
- Las muestras enfriadas pueden almacenarse a -20°C.

b. Fosforilación de oligos.

- Utilizar 2  $\mu$ l de los oligos anillados.
- Añadir 1  $\mu$ l de tampón de T4 PNK (polynucleotide kinase).
- Añadir 1  $\mu$ l de ATP 1 mM (el stock es 10 mM).
- Añadir 1  $\mu$ l de T4 PNK.
- Añadir 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
- Incubar 30 minutos a 37 °C.
- Incubar 10 minutos a 70°C (paso de inactivación por calor de la PNK).

## Materiales y métodos

### c. Ligado en pSUPER.

- Pipetear 2  $\mu$ l de los oligos anillados y fosforilados.
- Añadir 1  $\mu$ l de tampón de la enzima ligasa.
- Añadir 1  $\mu$ l de pSUPER digerido con BglII y HindIII y defosforilado.
- Añadir 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
- Añadir 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa.
- Incubar durante una hora a temperatura ambiente.

### d. Transformación de bacterias competentes.

### e. Minipreps y comprobación del inserto mediante corte con EcoRI y HindIII.

Los clones positivos deberían liberar insertos de unos 300 pb, mientras que el inserto liberado por un vector vacío ronda los 240 pb.

### f. Maxiprep de los clones positivos.

Soluciones empleadas:

Tampón de anillado (Annealing buffer)	
<b>Acetato potásico</b>	100 mM
<b>HEPES – KOH pH 7.4 0'1M</b>	30 mM
<b>Acetato magnésico 0'1 M</b>	2 mM

## 5. Aislamiento de ácidos nucleicos

### 5.1. Transformación de bacterias competentes (DH5 $\alpha$ , Invitrogen)

Una vez obtenido el vector de nuestro interés, se procede a transformar bacterias competentes, para que una vez introducido en ellas, poder obtener un número elevado de copias del mismo. Para la transformación se ha empleado el siguiente protocolo:

- Descongelar en hielo una alícuota de DH5α de 50 μl.
- Añadir de 1 a 5 μl de DNA (1-10 ng) a las células y mezclar con cuidado. No pipetear.
- Incubar las células en hielo durante 30 minutos.
- Dar un choque térmico a las células durante 20 segundos en un baño a 37°C sin agitación.
- Poner los tubos en hielo durante 2 minutos.
- Añadir 950 μl de medio SOB previamente atemperado a cada tubo.
- Recuperar las bacterias agitando los tubos a 37°C durante 1 hora a 225 rpm.
- Sembrar 100-200 μl de cada transformación en placas de LB agar con el antibiótico necesario, previamente atemperadas.
- Las placas se mantienen en una estufa a 37°C, entre 12 y 20 horas, sin sobrepasar este tiempo para evitar la aparición de colonias satélites.
- Transcurrido este tiempo, se sacan las placas de la estufa, se sellan con parafilm y se guardan a 4°C hasta el momento de su uso.

Soluciones:

SOB (para 1 litro)	
<b>Triptona</b>	20 g
<b>Extracto de levadura</b>	5 g
<b>NaCl</b>	0'5 g
<b>Autoclavar después de preparar.</b>	

LB (para 1 litro)	
<b>Triptona</b>	10 g
<b>Extracto de levadura</b>	5 g
<b>NaCl</b>	10 g
<b>Autoclavar después de preparar.</b>	

En caso de utilizar con antibiótico, añadir en el momento de su uso.

Para preparar las placas: añadir 0'15 g/ml de agar, autoclavar y distribuir (25 ml por placa).

## 5.2. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (Miniprep).

Para obtener una pequeña cantidad de DNA plasmídico que nos sirva para comprobar las características del plásmido que estamos intentando hacer, crecemos una colonia de bacterias en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche, con una agitación constante de 225 rpm, y a 37°C. Para la purificación de DNA plasmídico a pequeña escala empleamos el kit comercial (Miniprep Express™ Matrix, Q-BIO gene).

Protocolo:

- En la cámara de bacterias llenamos en tubo eppendorf con el medio de cultivo en el que han crecido las bacterias toda la noche. Centrifugamos durante 3 minutos a 13000 rpm. Tiramos el sobrenadante.
- Añadimos al pellet 100µl de solución I (solución de resuspensión) y resuspendemos con una pipeta.
- Añadimos 200 µl de solución II (solución de lisis) y mezclamos invirtiendo el tubo varias veces.
- Añadimos 150 µl de solución III (solución de neutralización), mezclamos y centrifugamos durante 2 minutos a 13000 rpm.
- Pasamos el sobrenadante a tubos limpios.
- Añadimos 400 µl de Miniprep Express™ Matrix, asegurándonos de agitarla completamente antes) y mezclamos invirtiendo unas cuantas veces los tubos.
- Centrifugamos 5-10 segundos y tiramos el sobrenadante.
- Añadimos 500 µl de etanol al 80% y resuspendemos el precipitado agitando.
- Centrifugamos 5-10 segundos y tiramos el sobrenadante.
- Dejamos que el etanol se evapore totalmente durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

- Resuspendemos el precipitado seco en 50  $\mu$ l de TE con RNasa (20  $\mu$ g/ml) con una pipeta (es importante resuspender completamente para obtener la máxima cantidad de plásmido posible).
- Centrifugamos durante 1 minuto y pasamos el sobrenadante con el DNA a un nuevo tubo.
- El plásmido está listo para su digestión enzimática.

### 5.3. Aislamiento de DNA plasmídico a gran escala (Maxiprep).

Para obtener grandes cantidades de plásmido que posteriormente usaremos para realizar los experimentos de transfección, realizamos el aislamiento a gran escala. Para ello, se hace un precultivo a partir de una colonia de bacterias (o a partir de bacterias congeladas que contienen el plásmido) en 6 ml de LB más el antibiótico correspondiente, durante unas 6 – 12 horas, en agitación constante (225 rpm) y a 37°C. Este precultivo se pasa a un volumen mayor, normalmente unos 250 ml de LB más el antibiótico correspondiente que se deja crecer toda la noche a 37°C y en agitación constante (225 rpm) para permitir la aireación correcta del cultivo.

Para la purificación de grandes cantidades de plásmido, utilizamos un kit comercial (Nucleobond® Xtra Maxi Plus, Macherey – Nagel). El protocolo básico para este tipo de kits comerciales consiste en un paso de centrifugación, que formará un pellet con las bacterias que han crecido en el medio de cultivo. Este pellet se resuspende en un volumen determinado de solución de resuspensión. Tras esto, se procede con la fase de lisis bacteriana, que usa una solución de lisis alcalina (NaOH / SDS) que romperá las bacterias liberando su contenido celular. Las proteínas, así como el DNA cromosómico y plasmídico, son desnaturalizadas bajo estas condiciones. El RNA es degradado por la RNasa A libre de DNasa. Posteriormente se añade una solución de neutralización, que contiene acetato potásico, lo que provoca una precipitación del SDS en forma de KDS (potassium dodecyl sulfate), arrastrando proteínas, DNA cromosómico y otros restos celulares. Esta solución también neutraliza el lisado. El DNA plasmídico puede revertir a su forma súper-enrollada nativa y permanece en la solución.

Después de la lisis alcalina, se hace pasar la muestra por unas columnas cromatográficas, a cuya resina el DNA plasmídico queda unido por afinidad y de donde será eluido mediante un cambio de pH de 6.5 a 9.0. En estas condiciones alcalinas, la carga positiva de la resina de la columna es neutralizada y el DNA plasmídico es liberado. Es necesario un último paso de precipitación para eliminar restos de sales o alcohol que pueden interferir en reacciones posteriores en las que se quieran emplear los plásmidos.

La concentración del plásmido se calcula midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. La calidad del plásmido se puede comprobar corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%, lo que nos dará información de la integridad estructural y conformacional del DNA plasmídico aislado, por ejemplo, mostrando si en la muestra predomina la forma súper – enrollada, circular o lineal.

#### 5.4. Aislamiento de RNA total a partir de cultivos celulares.

Se llevó a cabo la recogida de RNA total de las células usando Trizol® Reagent (Invitrogen), basado en una extracción fenol – cloroformo.

En primer lugar se realiza una homogenización, para lo cual añadimos 1 ml de Trizol® por placa de cultivo y recogemos el lisado pipeteando.

A continuación se lleva a cabo una separación de fases. En primer lugar se incuba 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.

Posteriormente se añade 0'2 ml de cloroformo por ml inicial de Trizol® usado, y se agitan los tubos manualmente durante 15 segundos.

Se incuban estas muestras durante 2 – 3 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugan a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm.

Después de la centrifugación, se separan una fase inferior fenol – cloroformo roja, una interfase y una fase acuosa superior incolora. El RNA se encuentra en la fase acuosa.

El paso siguiente es el de precipitación del RNA, para lo cual se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo. Se precipita el RNA de esta solución acuosa añadiendo isopropanol. Se usan 0'5 ml de isopropanol por ml de trizol usado para la homogeneización inicial.

Se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se centrifugan a 12.000 rpm durante otros 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA, a menudo visible antes de centrifugar, se forma en el lateral y fondo del tubo.

A continuación, se procede al lavado del RNA, para lo cual eliminamos el sobrenadante y lavamos el pellet de RNA con etanol al 75 % (en H<sub>2</sub>O DEPC, libre de RNAsas), añadiendo al menos 1 ml de etanol por ml de Trizol usado inicialmente. Se vortean las muestras y se centrifugan a 7.600 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Para redisolver el RNA se deja secar el pellet de RNA y se disuelve en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas resuspendiendo con una pipeta. Se incuba durante 10 minutos a 60°C.

H <sub>2</sub> O DEPC (libre de RNAsas)	
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	1 l
<b>DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma D5758)</b>	1 ml
<b>Se agita bien la mezcla y se deja a 37 °C un mínimo de 12 horas o bien a 65°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo es necesario autoclavar la solución para inactivar el DEPC.</b>	

## 6. Análisis de mRNA

### 6.1. RT-PCR

#### 6.1.1. Retrotranscripción.

Se realiza en primer lugar la retrotranscripción del RNA a cDNA usando el enzima MMLV (Invitrogen). Esta técnica es de gran sensibilidad, y requiere la manipulación de las muestras con guantes, preferentemente con puntas con filtro para evitar contaminaciones, y la manipulación de las muestras en hielo para evitar su degradación.

## Materiales y métodos

El procedimiento empleado fue el siguiente:

Partimos de una cantidad de RNA inicial de 1 – 2 µg. Se añade por muestra:

<b>Random primers (Invitrogen)</b>	<b>1 µl (de una dilución 1:10 del original)</b>
<b>dNTPs 2'5 mM (Invitrogen)</b>	4 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	completar hasta 12 µl

Calentamos a 65°C durante 5 minutos y pasamos las muestras a hielo. Tras una centrifugación breve añadimos:

<b>First Strand Buffer 5X</b>	<b>4 µl</b>
<b>0'1 M DTT</b>	2 µl
<b>Inhibidor de RNAsas (RNase OUT, Invitrogen)</b>	1 µl

Mezclamos con cuidado e incubamos 2 minutos a 37°C. Añadimos 1 µl de MMLV (200 uds, Invitrogen) a cada muestra.

El programa usado en el termociclador fue el siguiente:

1. 25°C 10 minutos
2. 37°C 50 minutos
3. 70°C 15 minutos

Para el subclonado de la secuencia codificante del gen *pelota*, partimos de 3 µg iniciales de RNA (obtenido de la línea celular MEFs Tet Off) para la retrotranscripción a cDNA.

### 6.1.2. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Mediante esta técnica amplificamos un fragmento de DNA a partir del cDNA previamente obtenido tras la retrotranscripción. Para la PCR empleamos la enzima **Taq DNA polimerasa** (Invitrogen).

Para realizar la PCR, partimos de 5  $\mu$ l de cDNA en el caso de Luc2 y de 10  $\mu$ l de cDNA en el caso de  $\beta$ gal. Realizamos una mezcla con todos los reactivos excepto el cDNA, añadiendo por muestra de PCR:

- 5  $\mu$ l de tampón de PCR 10X sin  $MgSO_4$
- 1,5  $\mu$ l de  $MgSO_4$  50 mM
- 4  $\mu$ l dNTPs 2,5 mM
- 1  $\mu$ l oligo forward
- 1  $\mu$ l oligo reverse
- 0,4  $\mu$ l Taq DNA polimerasa (Invitrogen)
- Completamos con  $H_2O$  hasta 50  $\mu$ l

Programas empleados en el termociclador:

#### Luc2:

- Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C
- Desnaturalización: 30 segundos a 94 °C
- Hibridación: 30 segundos a 52 °C
- Extensión: 30 segundos a 72 °C
- 
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C
- Temperatura final: 4 °C

27 ciclos

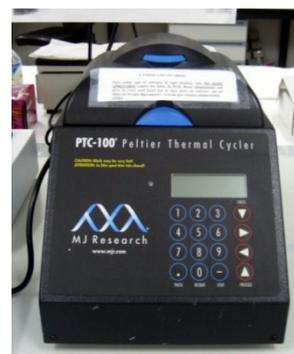


Termociclador Biometra

**βgal**

- Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94 °C
- Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
- Hibridación: 30 segundos a 55 °C
- Extensión: 1 minuto a 72 °C
- 
- Extensión final: 10 minutos a 72°C
- Temperatura final: 4 °C

35 ciclos



Termociclador PTC-100  
(Peltier Thermal Cycler)

Para el subclonado de la secuencia codificante del gen *pelota*, empleamos la polimerasa **Pwo** (Roche), por su nivel de errores más bajo. La mezcla de reactivos empleada fue la siguiente:

<b>dNTPs 2'5 mM</b>	<b>8 μl</b>
<b>Oligos <i>mpelup</i> / <i>mpeldo</i> (15 μM)</b>	<b>2 μl de cada uno</b>
<b>cDNA (reacción de retrotranscripción)</b>	<b>3 μl</b>
<b>Buffer 10 X sin MgSO<sub>4</sub></b>	<b>10 μl</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>6 μl</b>
<b>Pwo</b>	<b>0'5 μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>completar hasta un volumen total de 100 μl</b>

Añadimos unos μl de aceite para cubrir la superficie de la mezcla de reacción y evitar su evaporación debida a las altas temperaturas a las que se verá sometida.

Ciclamos en un termociclador usando el siguiente programa:

1. 94 °C 2 minutos
2. 94 °C 30 segundos
3. 58 °C 30 segundos
4. 72 °C 1 minuto
5. Repetir pasos 2 a 4 nueve veces

6. 94 °C 30 segundos
7. 58 °C 30 segundos
8. 72 °C 1 minuto + 5 segundos por ciclo
9. Repetir pasos 6 a 8 diecinueve veces.
10. 72 °C 7 minutos
11. 4 °C para siempre
12. End

Oligos empleados:

Pedidos a Thermo Scientific. Sintetizados a una escala de 0'02 µM, purificados por HPLC y liofilizados.

Luc2 left	5' – GGACTTGGACACCGGTAAGA – 3'
Luc2 right	5' – GTCGAAGATGTTGGGGTGTT – 3'
βgal L	5' – ACCTACCGGATTGATGGTAGTG – 3'
βgal R	5' – ATATTCAGCCATGTGCCTTCTT – 3'
<i>mpelup</i>	(5' – ACGCA <b>AAGCTT</b> GGAAGCTCGTGAGGAAGGATATC – 3') en negrita: diana de restricción para Hind III
<i>mpeldo</i>	(5' – AACGATATC <b>GCGGCCG</b> CTTAATCCTCTTCAGAACTTGAATC – 3') en negrita: diana de restricción para Not I

Con los productos de PCR obtenidos realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 1%, que visualizamos con un transiluminador y cuantificamos usando en programa Quantity One (BioRad).

## 7. Análisis de genes reporter

### 7.1. Ensayos luciferasa y betagalactosidasa

El plásmido control CMV  $\beta$ gal es utilizado como control de la transfección. Su promotor SV40 actúa induciendo la expresión del gen lacZ que codifica para la enzima betagalactosidasa, cuya actividad será medida como control de la transfección (Millar et al., 1972).

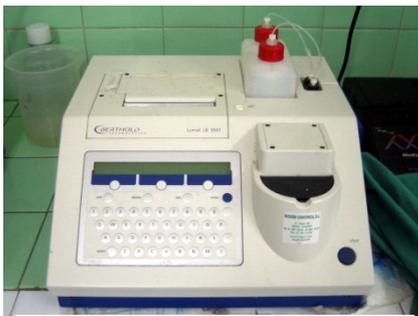
#### 7.1.1. Recogida de muestras

Las muestras para la realización de estos ensayos fueron recogidas 48 horas postransfección, usando un buffer de lisis comercial (Passive Lysis Buffer 5x, Promega), del siguiente modo:

- Lavar las células 3 veces con PBS frío.
- Añadir el volumen correspondiente del tampón de lisis 1x en función de la superficie de la placa de cultivo e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Recoger las células.
- Centrifugar a 12000 RPM durante 15 minutos a 4°C.
- Recoger el sobrenadante y guardar a -20°C.

#### 7.1.2. Ensayo luciferasa

Este ensayo nos permite determinar los niveles de expresión del gen transfectado midiendo la actividad luciferasa expresada. Para realizar la medición, se



*Luminómetro LUMAT 9507*

añaden ATP y el sustrato luciferina al lisado celular en un luminómetro (LUMAT 9507). La enzima cataliza una oxidación rápida del sustrato, dependiente de ATP, que ocurre en dos pasos, y que produce AMP, CO<sub>2</sub> y que emite luz procedente de un intermediario activado de la luciferina. La emisión

total de luz es medida en el luminómetro, y cuando se mide en presencia de un exceso de sustrato, es proporcional a la concentración del enzima.

Para realizar la medición se colocan en tubos de luciferasa 40  $\mu$ l de cada muestra, junto con 35  $\mu$ l de tampón LAB (Luciferase Assay Buffer).

En un bote aparte, y protegido de la luz, se prepara la solución de luciferina a partir de la solución stock (25  $\mu$ l por muestra + 25  $\mu$ l tubo 0 + 1 ml de volumen muerto que cubrirá el circuito del luminómetro). La concentración final de luciferina es 145 mM, que se diluye en glicil glicina 25 mM.

Seguimos el protocolo adecuado para medir las muestras en el luminómetro, introduciendo los tubos siguiendo las instrucciones del aparato.

Soluciones empleadas:

LAB (Luciferase Assay Buffer)
25 mM glicil glicina pH 7.8 (Sigma G2265)
15 mM buffer fosfato pH 7.8
15 mM MgSO <sub>4</sub>
4 mM EGTA
2 mM ATP (Sigma A3377)
1 mM DTT (añadido antes de usar)

Solución de luciferina stock
1 mM luciferina (D – Luciferin, synthetic crystalline, Sigma L9504)
25 mM glicil glicina pH 7.8
10 mM DTT
Guardar en alícuotas de 1ml en oscuridad a -80°C.

**Solución de trabajo de luciferina:** se prepara a partir de la solución stock, a una concentración de 145  $\mu$ M, en glicil glicina 25 mM pH 7.8.

### 7.1.3. Ensayo betagalactosidasa

El ensayo betagalactosidasa se utiliza para normalizar la eficiencia de transfección. Nos permite corregir los valores obtenidos de expresión de luciferasa, por posibles diferencias que hayan sido debidas al proceso de transfección, mediante la cotransfección con un plásmido que exprese betagalactosidasa y el posterior análisis de su actividad.

El ensayo betagalactosidasa se basa en la eficiencia de la enzima para catalizar la hidrólisis del ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D- galactopyranoside) a o-nitrophenol, que absorbe luz a 420 nm.

Para realizar este ensayo, se cogen 50  $\mu$ l del extracto proteico y se añaden 250  $\mu$ l de buffer Z (volumen total 300  $\mu$ l).

Se añaden 60  $\mu$ l de ONPG a cada muestra (congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y protegido de la luz).

Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que se ponga amarillo.

Parar la reacción añadiendo a la muestra 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. La muestra se mantiene estable a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Medir la absorbancia a 420 nm (visible).



*Espectrofotómetro BioMate*

*Thermo Spectronic*

Hay que hacer un blanco para calibrar el espectrofotómetro, con 50  $\mu$ l del buffer de lisis, 250  $\mu$ l de buffer Z, 60  $\mu$ l de ONPG y 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, que se procesa al igual que el resto de las muestras.

Soluciones empleadas:

Buffer Z
60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM KCl
1 mM MgSO <sub>4</sub>
50 mM β – mercaptoetanol
Ajustar a pH 7.0.
Guardar en alícuotas de 10 ml a -20°C.

ONPG
ONPG (4mg/ml) (Sigma N1127)
100 mM phosphate buffer pH 7.0
Guardar en alícuotas de 1,5 ml a -20°C protegido de la luz.

## 8. Citometría de flujo

Para ver la distribución de las células de una población en las distintas fases del ciclo celular hemos realizado análisis de citometría de flujo. Para ello hemos empleado un FACScan (Beckton Dickinson).

Para realizar este análisis se siguió un protocolo para el análisis de DNA por FACS de células fijadas.

- Se tripsinizan las células si son adherentes y se resuspenden en medio completo. Se centrifugan a 900 rpm durante 5 minutos.



FACScan (Beckton Dickinson)

## Materiales y métodos

- Tras eliminar el sobrenadante se vuelven a resuspender en 10 ml de PBS para lavarlas y eliminar los posibles restos de medio de cultivo y se vuelven a centrifugar.
- Tras esta centrifugación, se decanta para que el pellet de las células quede cubierto con un poco de PBS que será en donde se resuspendan las células.
- Estas células resuspendidas en PBS han de ser añadidas a 7,5 ml de etanol al 70 %, que tendremos preparado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se deja toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  (las células pueden quedar en este paso por lo menos una semana).
- Cuando se vaya a realizar el análisis por FACS, se centrifugan las células durante 15 minutos a 1500 rpm y sin freno, tras lo cual se elimina todo el sobrenadante que sea posible.
- Añadimos 500  $\mu\text{l}$  de solución de RNasa e incubamos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
- Transcurrido este tiempo se añaden 500  $\mu\text{l}$  de una solución de yoduro de propidio (Calbiochem Cat. No. 537059), tras lo cual se debe proteger de la luz. Una vez en esta suspensión, las células pueden ser pasadas por el citómetro de flujo.

Soluciones empleadas:

Solución de RNasa	
<b>RNasa 10 mg/ml</b>	1 ml
<b>PBS</b>	100 ml

Yoduro de propidio	
<b>Yoduro de propidio (Calbiochem)</b>	10 mg
<b>PBS</b>	100 ml
<b>Triton X – 100</b>	100 $\mu\text{l}$
<b>EDTA</b>	3,7 mg

## 9. Inmunofluorescencia

Para estudiar la localización intracelular de nuestra proteína realizamos técnicas de inmunohistoquímica, aplicadas a líneas celulares. Para ello las células han de cultivarse sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro, previamente esterilizados por calor seco, que son colocados en el interior de los pocillos de una multiwell de 24, donde previamente se siembra el número adecuado de células.

Los protocolos seguidos varían en el tipo de fijación y bloqueo de sitios inespecíficos en función de la línea celular y del anticuerpo utilizados. El protocolo general utilizado fue el siguiente:

- Lavar las células con PBS. Se hacen varios lavados de aproximadamente 1 ml cada uno para eliminar el medio de cultivo totalmente.
- Fijar las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hora a 4°C.
- Permeabilizar las células con Triton X-100 al 0'1% en PBS durante 10 minutos.
- Lavar nuevamente las células con PBS.
- Bloquear incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con cloruro de amonio (NH<sub>4</sub> Cl) 50 mM, en agitación.
- Incubación con el anticuerpo primario. En una placa petri grande se pone papel de filtro en el fondo y se moja para tener una atmósfera húmeda. Se pone un trozo de parafilm sobre el papel de filtro mojado, y sobre este se coloca el anticuerpo diluido en gotas, y sobre ellas los cubres con las células hacia abajo. Tapar la placa con papel de aluminio para que permanezca en oscuridad.
- Lavar con PBS (3 lavados de 10 minutos cada uno). Para ello se pasan los cubres de nuevo a una multiwell de 24 pocillos (con las células hacia arriba).
- La incubación con el anticuerpo secundario se realiza en las mismas condiciones que el primario. Se incuba durante una hora a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS. Se realizan 5 lavados de 5 minutos cada uno.
- Acabado el procedimiento se monta en portas con una pequeña gota (5 µl) de gel de montaje para preparaciones de inmunofluorescencia (Gel / Mount™,

## *Materiales y métodos*

Biomeda corp.). Se deja secar unos 5 – 10 minutos tras lo cual se sella con esmalte de uñas. Guardar a 4°C protegido de la luz.

Un protocolo alternativo emplea metanol – acetona (50:50, V/V) a -20°C para fijar y permeabilizar las células, y se bloquea empleando medio completo reconstituido para diluir el anticuerpo.

Para las inmunofluorescencias realizadas con el anticuerpo anti – pelo, se empleó formalina – PBS (10%) para fijar, durante 10 minutos a 4°C. Tras esto se pasan los cubres a acetona previamente enfriada a -20°C durante 5 minutos exactos, y se pasan los cubres a PBS 1X – Azida sódica (0'2%), en donde pueden guardarse durante varios meses a 4°C. El bloqueo se realiza con 1X PBS– Azida sódica (0'2 %) – BSA (0'5 %).

Soluciones empleadas:

<b>Paraformaldehido 4% pH 7.4</b>	
<b>Paraformaldehido</b>	4 gr.
<b>PBS 1X</b>	100 ml.
<b>Disolver el paraformaldehido en unos 70 ml de PBS en un baño a 60°C, durante toda la noche. Dejar enfriar a temperatura ambiente y ajustar el pH a 7.4. Enrasar y guardar a 4°C protegido de la luz.</b>	

Anticuerpos empleados:

- Rabbit Anti - Human PELO polyclonal unconjugated (Proteintech Group 10582-1-AP). Dilución 1:5.000.
- Anti  $\alpha$  – tubulina. (Sigma T - 5168). Dilución 1: 10.000.
- Anti  $\gamma$  – tubulina (Sigma T - 6557). Dilución 1:5.000.
- Alexa Fluor® 488 goat anti – rabbit IgG (H+L) 2 mg/ml (A11008). Molecular Probes (Invitrogen).

- Alexa Fluor® 594 goat anti – mouse IgG (H+L) 2 mg/ml (A11005). Molecular Probes (Invitrogen).
- Alexa Fluor® 546 goat anti – mouse IgG (H+L) 2 mg/ml (A11030). Molecular Probes (Invitrogen).
- Alexa Fluor® 594 goat anti – rabbit IgG (H+L) 2 mg/ml (A11012). Molecular Probes (Invitrogen).

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Leica TCS – SP2 y procesados usando el software de la misma compañía (LCS Lite).

## 10. Análisis de proteína.

### 10.1. Obtención de extractos proteicos totales de cultivos celulares.

Para recoger los extractos proteicos se retira el medio de las placas de cultivo y se lavan con PBS. Se añade la tripsina y se recoge cada una en 5 ml de medio completo nuevo. Esta suspensión celular se centrifuga durante 5 minutos a 1000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se lava con PBS, volviendo a centrifugar otra vez en las mismas condiciones. A continuación, y siempre manipulando las muestras en hielo, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en un volumen adecuado de buffer de extracción, en función del número de células (volumen del pellet), y se dejan lisando unos 20 minutos en hielo, vorteadando bien las muestras cada 5 minutos, para facilitar el proceso.

Se centrifugan las muestras durante 15 minutos a 4 °C y 14.000 rpm para eliminar restos celulares. El sobrenadante se pasa a otro tubo y se guarda a -80 °C hasta el momento de su uso.

Soluciones empleadas:

<b>EBC</b>	
<b>Tris pH8</b>	<b>50 mM</b>
<b>NaCl</b>	<b>120 mM</b>
<b>NP – 40 / Igepal CA – 630 (Sigma I3021) / Tergitol™ Solution (Sigma NP40S)</b>	<b>0'5 %</b>

Antes de utilizar, hay que añadir los inhibidores de proteasas:

<b>Aprotinina (Sigma A6279)</b>	<b>1 µg / ml</b>
<b>PMSF 0'1 M (Sigma P7626)</b>	<b>1 mM</b>
<b>Ortovanadato sódico 100 mM (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma S6508)</b>	<b>1 mM</b>
<b>DTT 1 M (Fluka 43815)</b>	<b>1 mM</b>

## 10.2. Cuantificación de extractos proteicos.

Para cuantificar la cantidad de proteína total presente en nuestros extractos, seguimos el método de Bradford® (Bradford, 1976), que se basa en la variación en la absorbancia visible del colorante Coomassie Blue G – 250 al unirse a la proteína. Para ello utilizamos un reactivo comercial (Bio – Rad Protein Assay Cat.No. 500 – 0006) y medimos la absorción de las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro BioMate3 de Thermo Spectronic. Como estándar para la cuantificación usamos BSA o IgG.

## 10.3. Western-Blot.

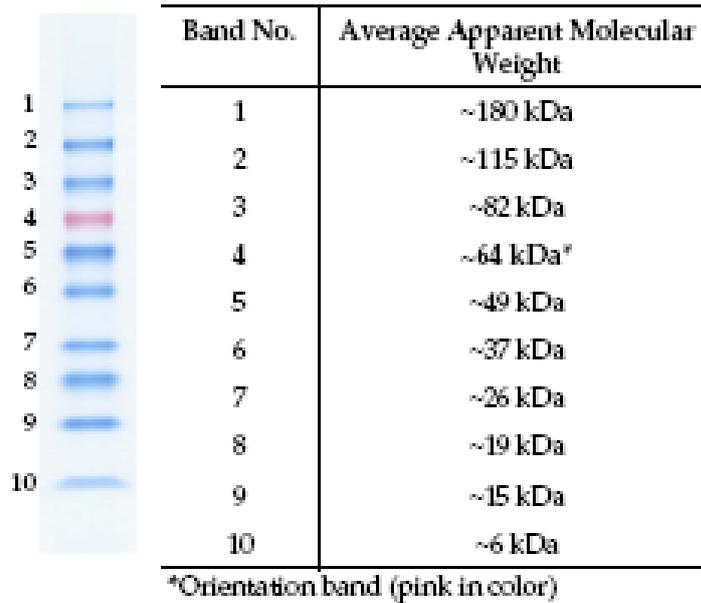
## 10.3.1. Electroforesis en gel de acrilamida.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS – PAGE). Este gel está compuesto por dos fases, una superior o de concentración (*stacking*), que permite la concentración de las proteínas, y una inferior, o separador, que permite la separación de las proteínas en función de su tamaño. El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del peso de la proteína que se quiere estudiar. En nuestro caso fueron realizados al 10 %.

<b>Gel 10 %</b>	<b>10 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4'0 ml
<b>30 % Acrylamide Mix</b>	3'3 ml
<b>1'5 M Tris (pH 8'8)</b>	2'5 ml
<b>10 % SDS</b>	0'1 ml
<b>10 % APS</b>	0'1 ml
<b>TEMED</b>	0'004 ml

Tras la cuantificación de la proteína se separó el volumen de extracto crudo que contuviera la cantidad de proteína que se iba a cargar en el gel (15 µg por muestra). Se añadió la cantidad de tampón de carga 5X necesaria para que al diluirlo la muestra quedase 1X. Por último, se igualó el volumen de las muestras con tampón de carga 1X. Previamente a la carga de las muestras en el gel, se calentaron las muestras durante 5 minutos a 95°C, para desnaturalizar las proteínas haciendo que pierdan la estructura tridimensional y queden en su forma lineal.

Para identificar la proteína de interés según su peso, se cargó en el gel como referencia un marcador de peso molecular preteñido que comprende un rango de 180 kDa a 6 kDa (Benchmark Prestained Protein Ladder, 10748 – 010, Invitrogen).



Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen

El proceso de electroforesis se realizó en tampón de electroforesis a 120 V durante unas 3 horas.

Soluciones empleadas:

Tampón de electroforesis	
<b>Tris</b>	50 mM
<b>Glicina</b>	400 mM
<b>SDS</b>	0'20 %

Tampón de carga 5X de Laemmli	
<b>Glicerol</b>	50 %
<b>SDS</b>	10 %
<b>β – mercaptoetanol</b>	5 %
<b>Azul de bromofenol</b>	0,4 %
<b>Tris pH 6.8</b>	400 mM

## 10.3.2. Transferencia a membrana.

Tras la electroforesis, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0'45  $\mu\text{m}$  de poro. La transferencia se realizó mediante el procedimiento denominado semi – seco, durante 90 minutos, usando una intensidad constante de 0'8 mA por  $\text{cm}^2$ . La membrana utilizada para la transferencia ha sido Immobilon-P (PVDF filter type) Millipore. Se coloca en el siguiente orden: 6 papeles Whatman (cortados al tamaño del gel y de la membrana) mojados en solución C, 3 papeles Whatman mojados en solución B, la membrana previamente activada (5 minutos en metanol) e hidratada (3 lavados de 1 minutos con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), el gel de acrilamida y por último 6 papeles Whatman mojados en solución A.

Soluciones empleadas:

Solución de transferencia A	
<b>0'4 M <math>\epsilon</math>- aminocaproic acid 0'25</b>	100 ml
<b>M Tris base</b>	
<b>Isopropanol</b>	200 ml
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	700 ml

Solución de transferencia B	
<b>1'25 M Tris base</b>	20 ml
<b>Isopropanol</b>	200 ml
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	780 ml

Solución de transferencia C	
<b>0'25 M Tris base</b>	200 ml
<b>Isopropanol</b>	200 ml
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	600 ml

### 10.3.3. Inmunodetección.

Después de la transferencia, la membrana ha de ser bien lavada con TNT 0'05 %, tras lo cual se bloquean los sitios inespecíficos, para lo que se usa leche en polvo al 5 % disuelta en el TNT 0'05 %. Se bloquea en esta solución durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C.

Tras el bloqueo, la membrana se lava dos veces durante 15 minutos con TNT 0'05 % para eliminar los restos de leche, y tras esto ya se puede proceder a la incubación con anticuerpos.

La inmunodetección se realizó mediante un kit de quimioluminiscencia que emplea un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP, horseradish peroxidase), SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).

Los pasos a seguir fueron:

- Incubación con el anticuerpo primario diluido en una solución de TNT 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien toda la noche a 4°C en agitación.
- Lavados del anticuerpo primario, 3 lavados de 15 minutos con TNT 1 % en agitación.
- Incubación con el anticuerpo secundario, durante 45 minutos – 1 hora a temperatura ambiente, dilución 1:5.000 en TNT 0'5 % en agitación.
- Lavados del anticuerpo secundario, 3 lavados de 15 minutos con TNT 0'5 % en agitación.
- Incubación con el sustrato de la peroxidasa durante 5 minutos en oscuridad.
- Se elimina el exceso de líquido de la membrana por contacto con papel de filtro, y se coloca la membrana en una bolsa de hibridación.
- Se expone dentro de un casete de autoradiografía con una película fotográfica. El tiempo de exposición necesario depende de cada anticuerpo.

Anticuerpos utilizados:

- Rabbit Anti - Human PELO polyclonal unconjugated (Proteintech Group 10582-1-AP). Dilución 1:5.000.
- Anti  $\alpha$  – tubulina. (Sigma T - 5168). Dilución 1: 2.500.
- Anti GAPDH (Calbiochem Anti GAPDH 6C5 Ref. CB 1001). Dilución 1:10.000.

Soluciones empleadas:

TNT	
<b>NaCl (stock 5M)</b>	150 mM
<b>Tris HCl (stock 1 M pH 7.5)</b>	25 mM
<b>Tween® 20 (Sigma P9416)</b>	0'05% / 0'5% / 1%

#### 10.3.4. Reutilización de la membrana.

En ocasiones, una misma membrana es utilizada para inmunodetectar distintas proteínas en la misma muestra. Para ello, antes de reutilizar la membrana, ésta ha de ser tratada con una solución de disociación (*stripping buffer*) que elimina los anticuerpos previamente fijados a la membrana. La membrana de PVDF ha de ser activada antes al igual que para realizar la transferencia (5 minutos en metanol) e hidratada después (3 lavados de 1 minuto en agua destilada). Tras ser disociado el anticuerpo de la membrana se lava con TNT (varios lavados de 5 minutos), tras lo cual ya está lista para ser bloqueada de nuevo y continuar con la detección proteica.

Soluciones empleadas:

<i>Stripping buffer</i>	50 ml
<b>Tris HCl 1M pH 6.8</b>	3'125 ml
<b>10 % SDS</b>	10 ml
<b><math>\beta</math> mercaptoetanol</b>	354 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	36'5 ml

#### 10.4. Inmunoprecipitación.

Las muestras proteicas se cuantifican al igual que para Western Blot, usando el método de Bradford®, y todas ellas han de ser llevadas a igual volumen (1 ml) en el mismo tampón de lisis usado para la extracción proteica. Las muestras se incubarán con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C, en agitación constante. A los complejos inmunes formados se les añaden 30 µl de Proteína G – Agarosa (Roche, Ref. 11 243 233 001) previamente equilibrada en el tampón empleado para la extracción de la proteína, y en una proporción proteína G: tampón 1:1, tras lo cual se deja en agitación durante un mínimo de 1 hora a 4°C. Tras esto, se realizan 4 lavados con 1 ml del tampón de extracción proteica. Tras el último lavado, se aspira el sobrenadante que queda con una jeringa, y se diluye el precipitado en 35 µl de solución de carga 1X. Las muestras se calientan durante 5 minutos a 95°C, después se centrifugan durante 1 minuto a 13.000 rpm y se recoge el sobrenadante para cargarlo en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y proceder así al estudio proteico por Western Blot.

##### 10.4.1. Preparación de Proteína G - Agarosa.

Para realizar la inmunoprecipitación empleamos Proteína G – Agarosa, que se debe preparar antes de su uso. Esta Proteína G se encuentra en una suspensión 1:1.

- Se pasa el doble de volumen que se quiere utilizar a un eppendorf.
- Se centrifuga durante 10 segundos a máxima velocidad empleando una centrifuga refrigerada.
- Se aspira el sobrenadante y se añade el doble de volumen de las bolas empaquetadas de EBC (en nuestro caso, o el tampón de extracción proteica utilizado que corresponda en cada caso). Se centrifuga y se vuelve a aspirar el sobrenadante. Se repite hasta un total de 3 lavados.
- Se estima el volumen final de bolas empaquetadas por comparación de las bolas después de hacer la última aspiración con un volumen conocido de agua en otro eppendorf.
- Se añade un volumen de EBC, y se guardan a 4°C hasta el momento de su uso.

## 10.5. Proteómica.

Para estudiar las posibles interacciones de nuestra proteína con otras, realizamos un análisis de identificación por huella peptídica. Para ello, realizamos una inmunoprecipitación de 5 mg de proteína total de la línea celular HEK 293 extraída con EBC, junto con 1 µg del anticuerpo anti – *pelota*. Como control negativo empleamos una IgG de conejo inespecífica.

Tras la inmunoprecipitación, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, prestando especial atención en la manipulación, para evitar la posible contaminación con queratinas procedentes de la piel, que pudieran interferir en el estudio posterior.

El gel de acrilamida se tiñó con plata siguiendo el protocolo para el kit *PlusOne™ Silver Staining Kit* de Amersham Biosciences. Tras esto, las bandas reveladas por la tinción de plata fueron cortadas en aquellos casos en los que presentaban una diferencia respecto al control negativo. Posteriormente estas bandas fueron digeridas en gel con tripsina y se llevó a cabo el análisis de los fragmentos trípticos obtenidos mediante MALDI – TOF. Para el análisis de los resultados se llevó a cabo una búsqueda en bases de datos, usando MASCOT.

### 10.5.1. MALDI – TOF.

Las masas de los péptidos individuales de una mezcla digerida de una proteína son medidas y usadas para crear un espectro de masas. En este tipo de análisis, la proteína es digerida previamente con una enzima, tripsina en este caso, que rompe específicamente en los residuos Arginina y Lisina del lado carboxílico).

Tras ser digerida, la muestra es embebida en una matriz sólida que a menudo consiste de un material orgánico como ácido trans-3-indoleacrílico y sales inorgánicas como cloruro de sodio o trifluoroacetato de plata. Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización. Esta muestra se incorpora junto con la matriz en la placa Maldi (*Matrix-Assisted Laser*

*Desorption/Ionization*, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) para su medida posterior.

La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y complejación con pequeños cationes. Los péptidos digeridos son ionizados mediante un láser y acelerados por un campo eléctrico hacia el detector (analizador de tiempo de vuelo TOF, *Time-Of-Flight*), donde el valor  $m/z$  (relación masa/carga) de cada ión va determinado por el tiempo de vuelo medido desde la fuente al detector.

Posteriormente, usando bases de datos (MASCOT, SwissProt), buscamos la correspondencia de cada uno de los picos con los péptidos correspondientes a una proteína, comparando los valores obtenidos en la inmunoprecipitación inespecífica con los obtenidos en el caso de la inmunoprecipitación de *pelota*.

## IV. RESULTADOS

*"Las preguntas no son nunca indiscretas. Las respuestas  
a veces sí."*

*Oscar Wilde*



## 1. Subclonado de la secuencia codificante del gen *pelota*.

Para proceder al estudio de *pelota* en células de mamífero necesitábamos contar con las herramientas adecuadas. Lo primero que nos interesaba era la obtención del cDNA de *pelota*. Para ello, el RNA fue extraído de la línea celular MEFs Tet Off empleando Trizol Reagent (Invitrogen). Empleamos los oligos *mpelup* y *mpeldo* (que incluyen dianas de restricción en sus extremos para facilitar la posterior clonación) para la retrotranscripción del RNA a cDNA. El cDNA obtenido fue amplificado mediante PCR utilizando la polimerasa Pwo (Roche), siendo necesaria la realización de PCRs secuenciales por la escasa cantidad obtenida al principio. El fragmento obtenido (1154 pb) fue cortado con las enzimas de restricción HindIII y NotI, y clonado en primer lugar en el vector pBluescript.

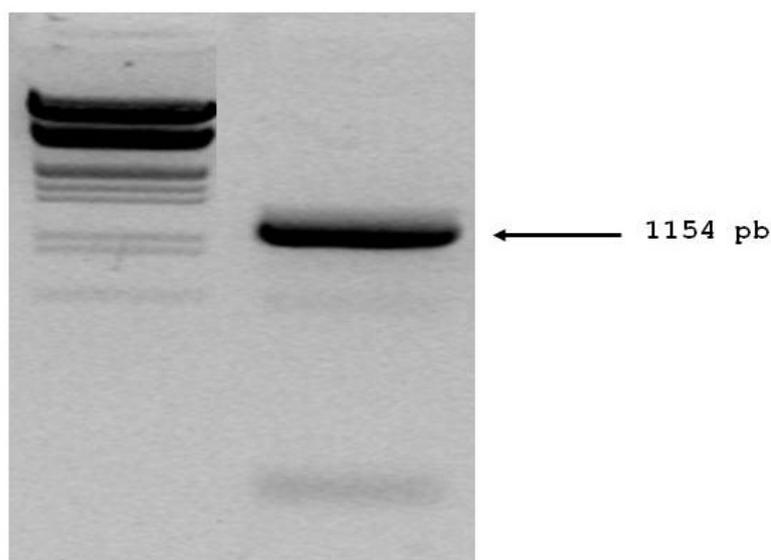


Figura 16. Subclonado de la secuencia codificante del gen *pelota*. En la figura se puede ver la banda producto de PCR en la cual se obtuvo una amplificación suficiente de la secuencia codificante del gen *pelota*, de un tamaño de 1154 pb.

Este vector fue enviado a secuenciar para comprobar la secuencia de *pelota* introducida. Como se puede observar, la secuencia de nuestro inserto era casi igual a la secuencia publicada de *pelota* de ratón. A nivel de proteína sólo nos encontramos con cuatro diferencias, tres de ellas en residuos que son distintos entre ratón y

## Resultados

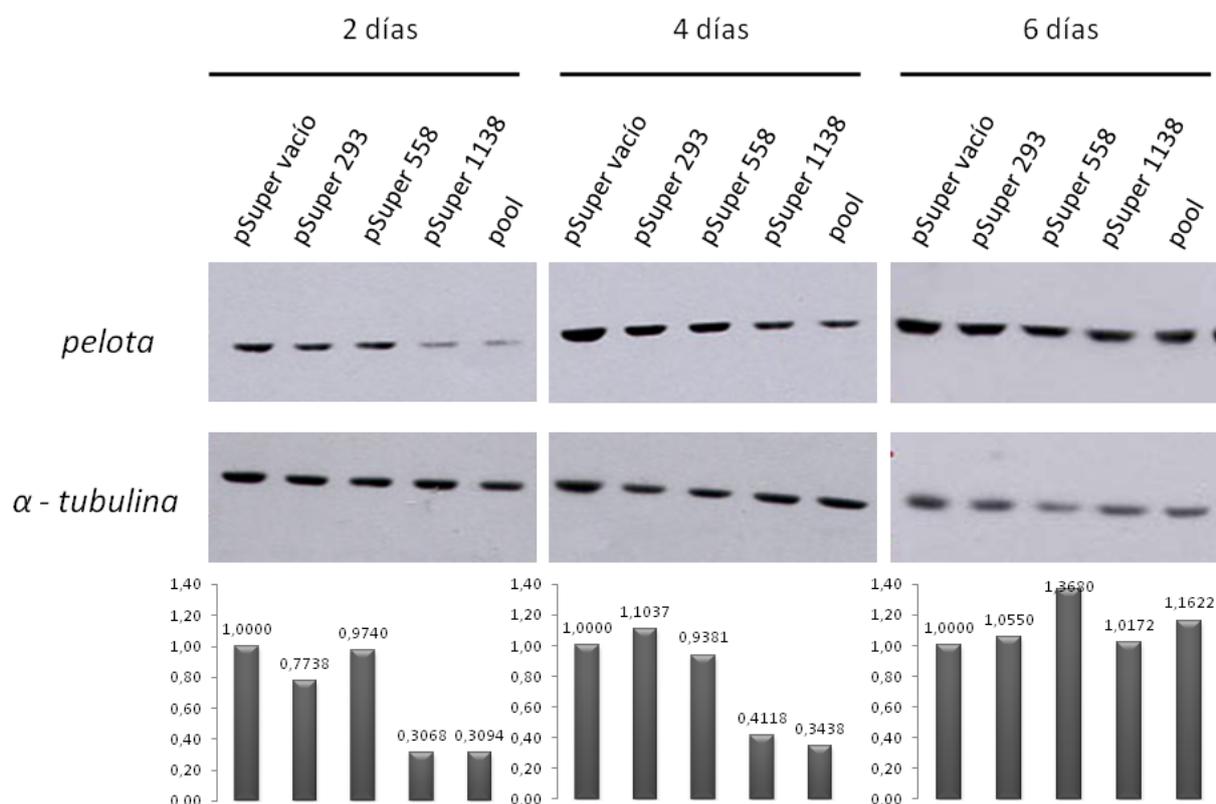
humano, apareciendo en nuestra secuencia el residuo descrito para *pelota* humano. La otra diferencia es en una sustitución conservativa de tirosina (Tyr; Y) por fenilalanina (Phe; F), ya que ambos son aminoácidos aromáticos.

<i>Secuencia</i>	1	MKLVRKDIEKDNAGQVTLVPEEPEDMWH <b>T</b> FNLVQVGD <del>S</del> LRAS <b>T</b> IRK <b>V</b> QTE
<i>pelota ratón</i>	1	MKLVRKDIEKDNAGQVTLVPEEPEDMWH <b>T</b> YNLVQVGD <del>S</del> LRAS <b>T</b> IRK <b>V</b> QTE
<i>Pelota humana</i>	1	MKLVRK <b>N</b> IEKDNAGQVTLVPEEPEDMWH <b>T</b> YNLVQVGD <del>S</del> LRAS <b>T</b> IRK <b>V</b> QTE
<i>Secuencia</i>	51	SSTGSVGSNRVRTTLTLCVEAIDFDSQACQLRVKGTNIQENE <b>V</b> KMGAYH
<i>pelota ratón</i>	51	SSTGSVGSNRVRTTLTLCVEAIDFDSQACQLRVKGTNIQENE <b>V</b> KMGAYH
<i>Pelota humana</i>	51	SSTGSVGSNRVRTTLTLCVEAIDFDSQACQLRVKGTNIQENE <b>V</b> KMGAYH
<i>Secuencia</i>	101	TIELEPNRQFTLAKKQWDSVVL <b>R</b> IEQACDPAWSADVA <b>A</b> VVMQ <b>E</b> GLAHVC
<i>pelota ratón</i>	101	TIELEPNRQFTLAKKQWDSVVL <b>R</b> IE <b>F</b> EQACDPAWSADVA <b>A</b> VVMQ <b>E</b> GLAHVC
<i>Pelota humana</i>	101	TIELEPNRQFTLAKKQWDSVVL <b>R</b> IEQACDPAWSADVA <b>A</b> VVMQ <b>E</b> GLAH <b>I</b> C
<i>Secuencia</i>	151	LVT <b>P</b> SMTL <b>T</b> RAKVEVNIPRKRKG <b>N</b> CSQH <b>D</b> RAL <b>R</b> FYEQV <b>V</b> QAIQ <b>R</b> HIN <b>F</b> E
<i>pelota ratón</i>	151	LVT <b>P</b> SMTL <b>T</b> RAKVEVNIPRKRKG <b>N</b> CSQH <b>D</b> <b>P</b> AL <b>R</b> FYEQV <b>V</b> QAIQ <b>R</b> HIN <b>F</b> E
<i>Pelota humana</i>	151	LVT <b>P</b> SMTL <b>T</b> RAKVEVNIPRKRKG <b>N</b> CSQH <b>D</b> RAL <b>R</b> FYEQV <b>V</b> QAIQ <b>R</b> H <b>I</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>D</b>
<i>Secuencia</i>	201	VVKC <b>V</b> LVASPGFVREQFC <b>D</b> YMFQ <b>Q</b> AVK <b>T</b> DN <b>K</b> V <b>L</b> LENRSK <b>F</b> LQ <b>V</b> HASS <b>G</b> HK
<i>pelota ratón</i>	201	VVKC <b>V</b> LVASPGFVREQFC <b>D</b> YMFQ <b>Q</b> AVK <b>T</b> DN <b>K</b> V <b>L</b> LENRSK <b>F</b> LQ <b>V</b> HASS <b>G</b> HK
<i>Pelota humana</i>	201	VVKC <b>L</b> LVASPGFVREQFC <b>D</b> YMFQ <b>Q</b> AVK <b>T</b> DN <b>K</b> <b>L</b> LENRSK <b>F</b> LQ <b>V</b> HASS <b>G</b> HK
<i>Secuencia</i>	251	YSLKEALCDPTVASRLSDTKAAGEVKALDDFYK <b>M</b> LQHEPDRAFYGLK <b>Q</b> VE
<i>pelota ratón</i>	251	YSLKEALCDPTVASRLS <b>H</b> TKAAGEVKALDDFYK <b>M</b> LQHEPDRAFYGLK <b>Q</b> VE
<i>Pelota humana</i>	251	YSLKEALCDPTVASRLSDTKAAGEVKALDDFYK <b>M</b> LQHEPDRAFYGLK <b>Q</b> VE
<i>Secuencia</i>	301	RANEAL <b>A</b> IDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSL <b>H</b>
<i>pelota ratón</i>	301	RANEAL <b>A</b> IDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSL <b>H</b>
<i>Pelota humana</i>	301	<b>K</b> ANE <b>A</b> <b>M</b> AIDTLLISDELFRHQDVATRSRYVRLVDSVKENAGTVRIFSSL <b>H</b>
<i>Secuencia</i>	351	VSGEQLGQ <b>L</b> TGVAAILRFPVPELSDQEDD <b>S</b> SEED
<i>pelota ratón</i>	351	VSGEQLGQ <b>L</b> TGVAAILRFPVPELSDQEDD <b>S</b> SEED
<i>Pelota humana</i>	351	VSGEQL <b>S</b> Q <b>L</b> TGVAAILRFPVPELSDQ <b>E</b> <b>G</b> DSSEED

Figura 17. Comparación de la secuencia de aminoácidos de nuestra secuencia inserto con las descritas para *pelota* de ratón y humana. Se señalan las diferencias de secuencia en color.

## 2. Comprobación del funcionamiento de los shRNAs.

De cara a enfocar nuestro estudio, también quisimos tener la posibilidad de inhibir la expresión de *pelota* en células en cultivo, para lo cual desarrollamos shRNAs como se detalla en materiales y métodos. Para comprobar el funcionamiento de estos shRNAs, realizamos transfecciones transitorias en células HEK293 y SaOS2, tanto con fosfato de calcio como mediante electroporación, tras las cuales recogimos extractos proteicos a los 2, 4 y 6 días, y realizamos un Western Blot contra *pelota*. Como se ve en las figuras 18 y 19, la transfección de los shRNAs contra *pelota* indujo una inhibición de la expresión de *pelota* en las dos líneas estudiadas, en especial a los 2 y 4 días.



**Figura 18.** Comprobación del funcionamiento de los shRNAs en la línea celular HEK 293. La línea celular HEK 293 fue transfectada empleando el protocolo de fosfato de calcio. Los extractos proteicos se recogieron a los tiempos indicados en cada caso, y se prepararon para Western Blot usando un anticuerpo anti-*pelota* y  $\alpha$  tubulina como control de carga (paneles superiores). Los niveles de *pelota* se estimaron mediante densitometría y se expresaron como intensidad *pelota*/intensidad  $\alpha$  tubulina (paneles inferiores).

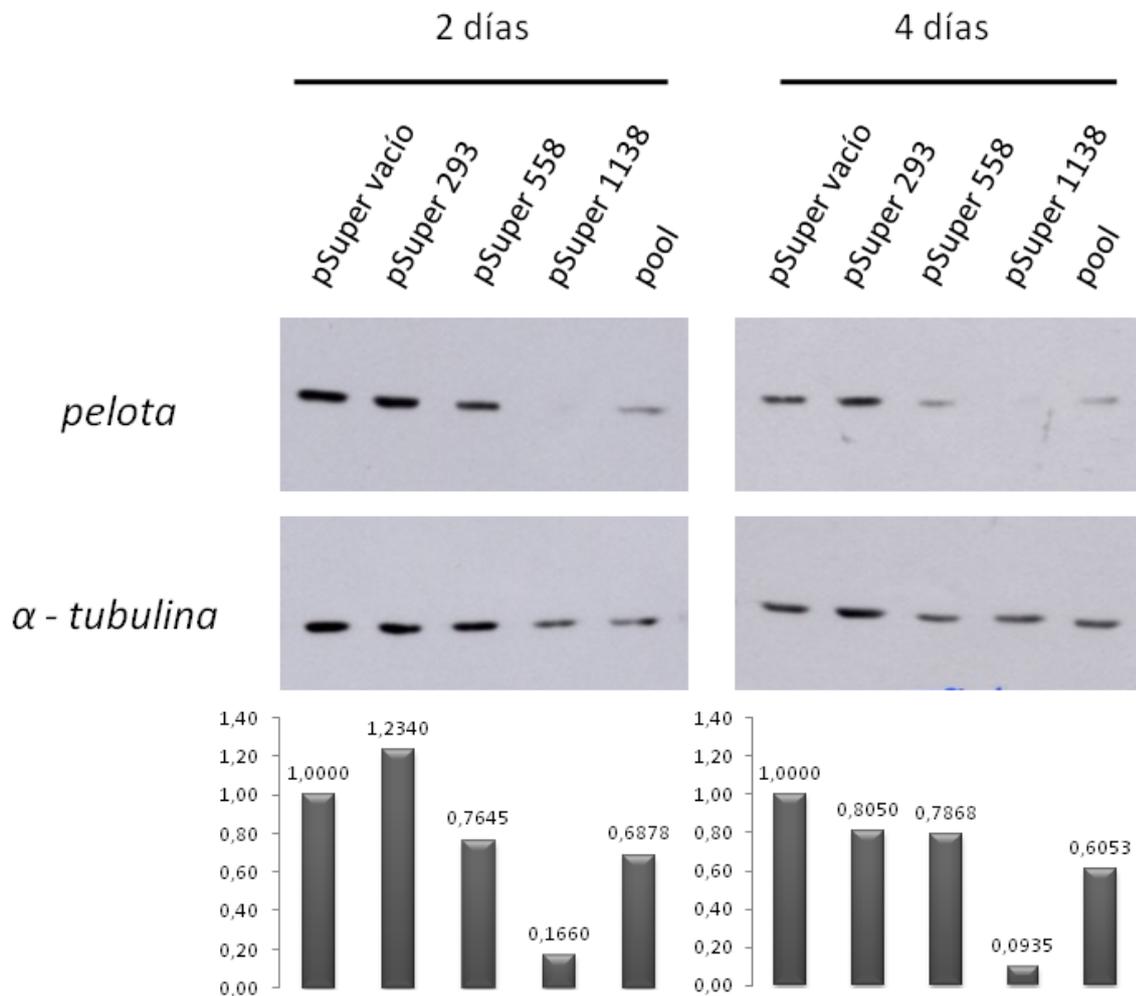


Figura 19. Comprobación del funcionamiento de los shRNAs en la línea celular SaOS2. La línea celular SaOS2 fue electroporada empleando el Nucleofector Kit V (Amaya). Los extractos proteicos se recogieron a los tiempos indicados en cada caso y se prepararon para Western Blot con un anticuerpo anti-*pelota* y otro contra  $\alpha$  tubulina como control de carga (paneles superiores). Los niveles de *pelota* se estimaron mediante densitometría y se expresaron como intensidad *pelota*/intensidad  $\alpha$  tubulina (paneles inferiores).

### 3. El gen *pelota* y el ciclo celular.

#### 3.1. La expresión de *pelota* no varía a lo largo del ciclo celular.

Una vez obtenidas las herramientas necesarias procedimos al estudio de la biología de *pelota*, y comenzamos por el estudio de su expresión a lo largo del ciclo celular. Varios de los resultados obtenidos anteriormente con *pelota* y sus homólogos hacían interesante el estudio de la influencia o posibles implicaciones de esta proteína en el ciclo celular. Estudios en ratones *knockout* para *pelota* determinaron la presencia de cantidades anormales de DNA en embriones homocigotos para *pelota*, datos consistentes con una posible parada del ciclo celular en la transición G<sub>2</sub>/M. Anteriormente, en levaduras, se había visto cómo la presencia de este gen era necesaria para la transición G<sub>2</sub>/M, tanto en mitosis como en meiosis.

Para estudiar los niveles de expresión de la proteína *pelota* a lo largo del ciclo celular, empleamos líneas celulares sincronizadas mediante doble bloqueo con timidina, consiguiendo de este modo que las células que constituyen la línea celular comiencen a ciclar todas al mismo tiempo a partir de la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular en la que han sido detenidas por efecto de la timidina, y logrando así un mayor número de células en la misma fase del ciclo celular al mismo tiempo, lo cual nos permitirá estudiar su comportamiento a lo largo del mismo. La línea celular utilizada fue SaOS2, de la cual recogimos muestras proteicas mediante EBC cada tres horas tras el tiempo 0 (liberación del doble bloqueo con timidina).

Datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, determinaban la correspondencia de las distintas fases del ciclo celular en esta línea celular con las horas a las que deben ser recogidas las muestras tras la liberación del doble bloqueo de timidina (tabla 1). Las horas estimadas fueron 6 horas para la fase S (aprox. 60 % de la población celular en esta fase del ciclo transcurridas esas horas) y 18 horas para la fase G<sub>1</sub> (aprox. 60 % de la población celular).

SaOS2	% G <sub>1</sub>	% G <sub>2</sub>	% S
Asincronicas	44,32	23,33	32,35
t=0	61,82	7,11	31,01
t=6	23,25	14,68	<b>62,07</b>
t=15	49,16	35,85	14,99
t=18	<b>63,52</b>	22,79	13,70

Tabla 1. Sincronización de la línea celular SaOS2 mediante doble bloqueo con timidina. Las líneas celulares fueron sincronizadas mediante doble bloqueo con timidina. Los extractos proteicos fueron recogidos a los tiempos indicados, tras lo cual se realizó un análisis de DNA por citometría de flujo para determinar la distribución de las células que constituyen la línea celular en cada fase del ciclo. Se muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a los tiempos indicados.

Tras la sincronización, las muestras proteicas fueron analizadas mediante Western Blot, usando un anticuerpo específico contra nuestra proteína, para ver si ésta experimentaba alguna variación ligada a alguna de las fases del ciclo celular, o bien a la progresión de las células en el mismo.

Los resultados del WB muestran que aparentemente la expresión de *pelota* es igual a lo largo del ciclo celular, ya que no se aprecian variaciones evidentes (figura 20).

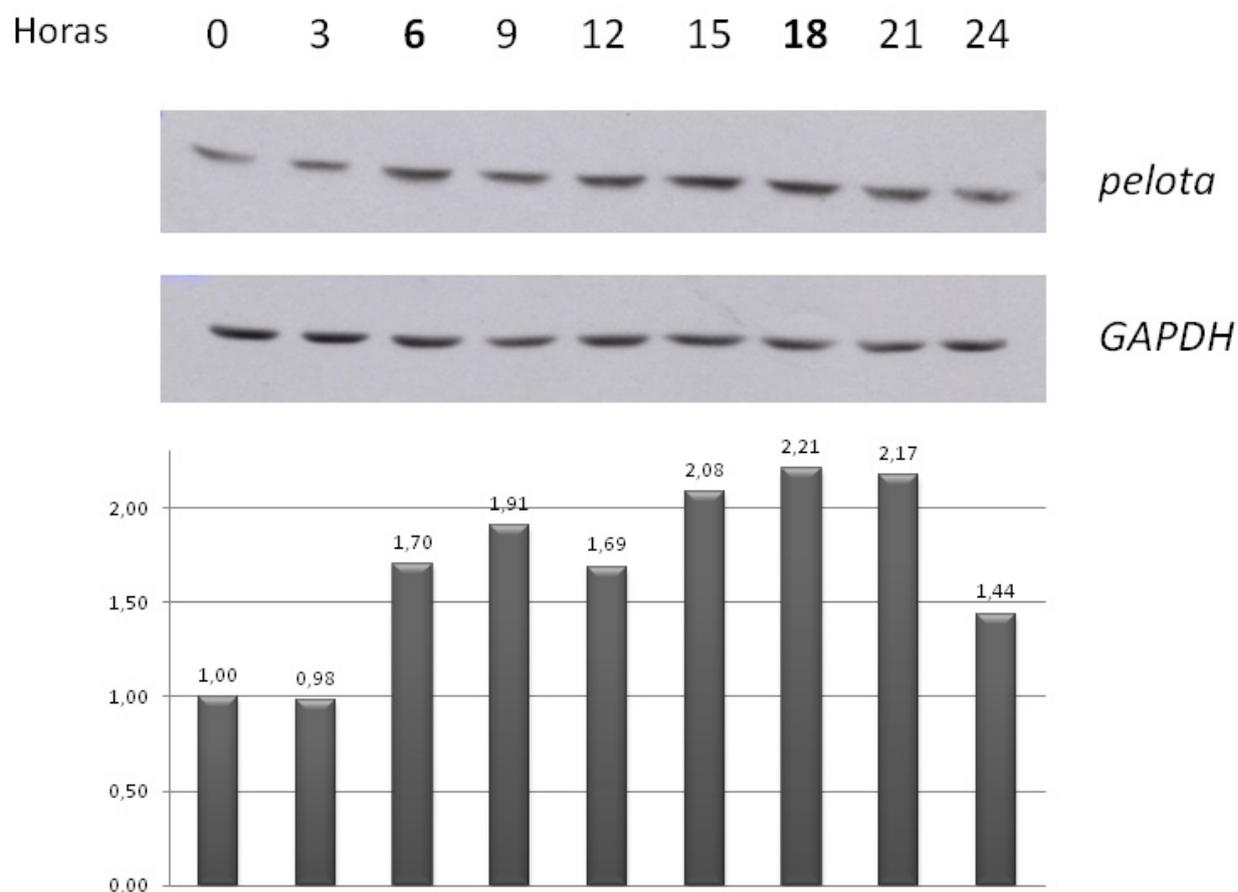


Figura 20. Western blot de muestras proteicas obtenidas de la línea celular SaOS2 sincronizada mediante doble bloqueo de timidina siguiendo el protocolo descrito y a las horas indicadas. La línea celular SaOS2 fue sincronizada mediante doble bloqueo con timidina, tras lo cual fueron recogidos extractos proteicos a los tiempos indicados en cada caso. Se muestra un Western Blot contra *pelota* (panel superior) y contra GAPDH como control de carga (panel medio). Los niveles de *pelota* se estimaron mediante densitometría y se expresaron como intensidad *pelota*/intensidad GAPDH (panel inferior).

3.2. La inhibición del gen *pelota* no produce efectos aparentes en el ciclo de las líneas celulares estudiadas.

La expresión de *pelota* no parece variar a lo largo de la progresión del ciclo celular, sin embargo, es posible que su expresión constitutiva sea necesaria para la transición a través de la fase S del ciclo, como parece ser el caso en varios organismos no mamíferos e incluso en células embrionarias de ratón, o en la transición G<sub>2</sub>/M como puede sugerir el fenotipo de los ratones deficientes en la proteína. El siguiente paso llevado a cabo fue estudiar si la falta de la proteína provocaba algún tipo de alteración en el ciclo celular.

Para ello empleamos los shRNAs antes mencionados (shRNA 1138), cuya efectividad inhibiendo la expresión proteica de *pelota* ha sido demostrada previamente (figuras 18 y 19). Con estos shRNAs realizamos transfecciones transitorias en la línea celular SaOS2 y analizamos la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, tanto en células control como en las transfectadas con los diferentes shRNAs.

En la figura 21 podemos ver el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, a los 2 y 4 días tras la transfección con el shRNA responsable de la inhibición de *pelota*, momento en el que fueron recogidas las células electroporadas y preparadas para su análisis mediante citometría de flujo. En esta figura podemos apreciar cómo la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular no varía con la inhibición de *pelota*, ya que es similar tanto en el control como en la muestra que presenta *pelota* inhibida, al igual que en las muestras en las que los shRNAs no han conseguido inhibir la expresión de la proteína. En concreto, no existía ninguna acumulación significativa en la fase G<sub>2</sub> del ciclo, como sería esperable en base a los resultados obtenidos con el *knockout* realizado en ratón.

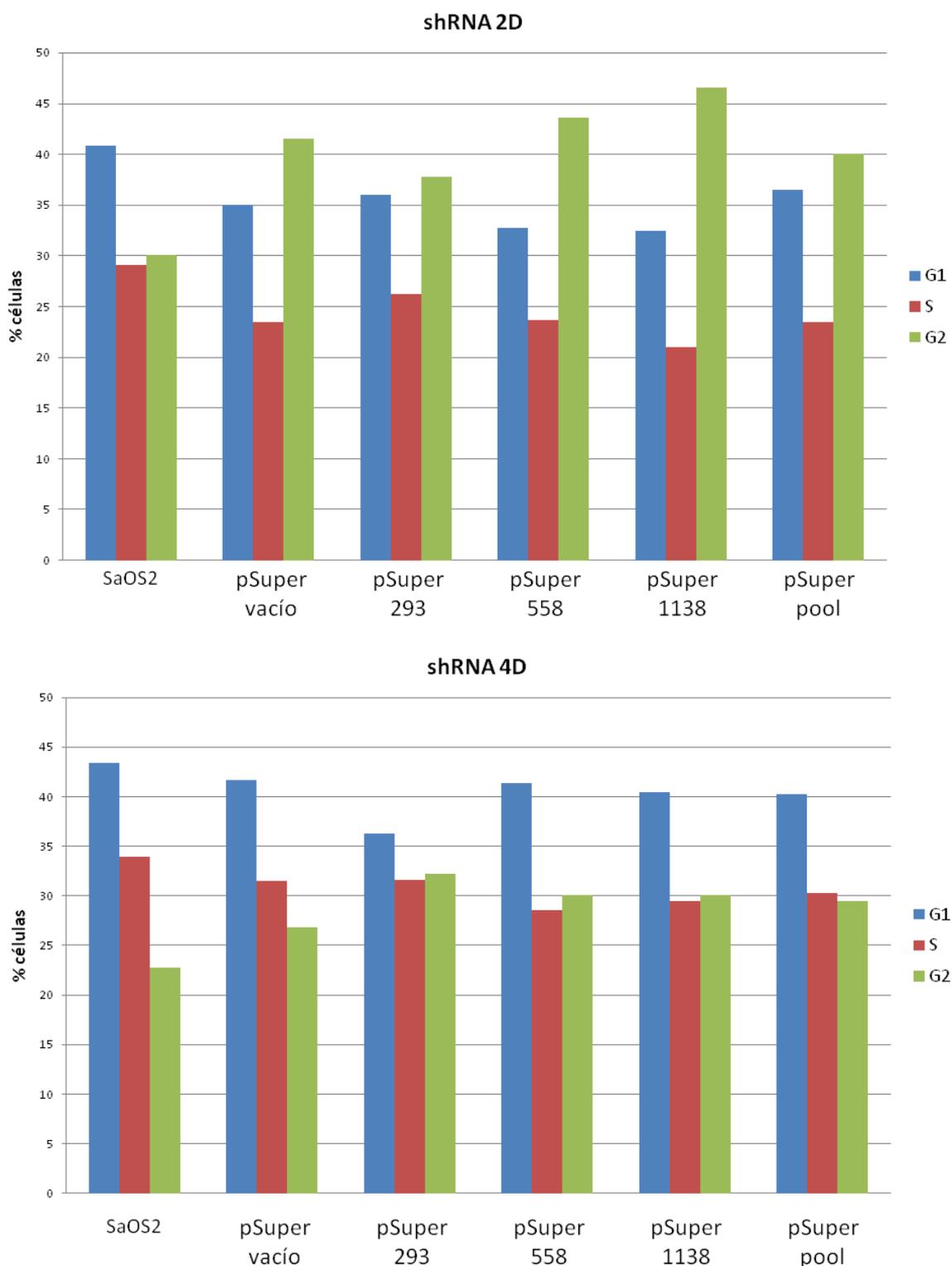
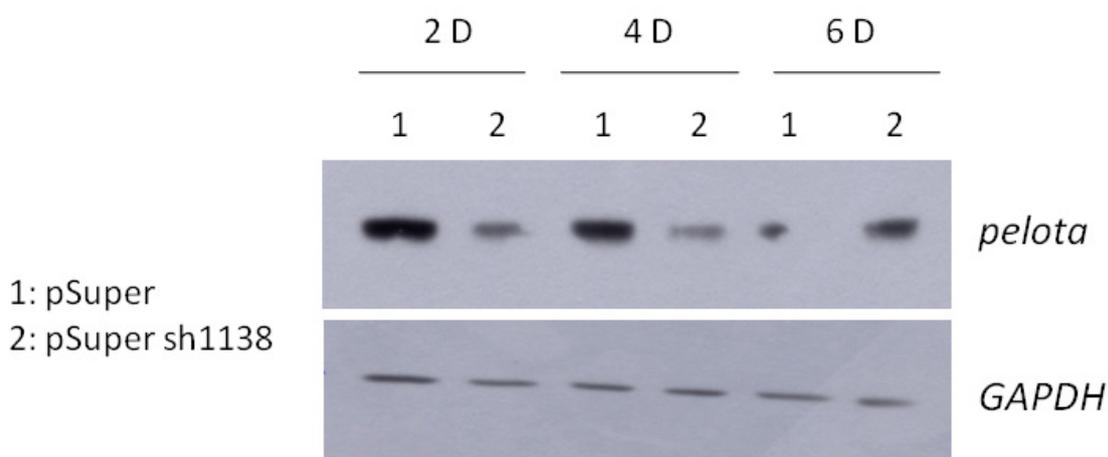


Figura 21. Análisis de DNA por citometría de flujo de SaOS2 recogidas a los tiempos indicados tras la introducción de varios shRNAs dirigidos contra el mRNA de *pelota*. La línea celular SaOS2 fue electroporada para la introducción de los distintos vectores que expresan el shRNA. Tras ello, el contenido de DNA de las células fue analizado mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. Se determinó el porcentaje de células en cada fase del ciclo. La población control es la marcada como pSuper (vector vacío). La primera serie de valores se corresponde con células SaOS2 asincrónicas.

## Resultados

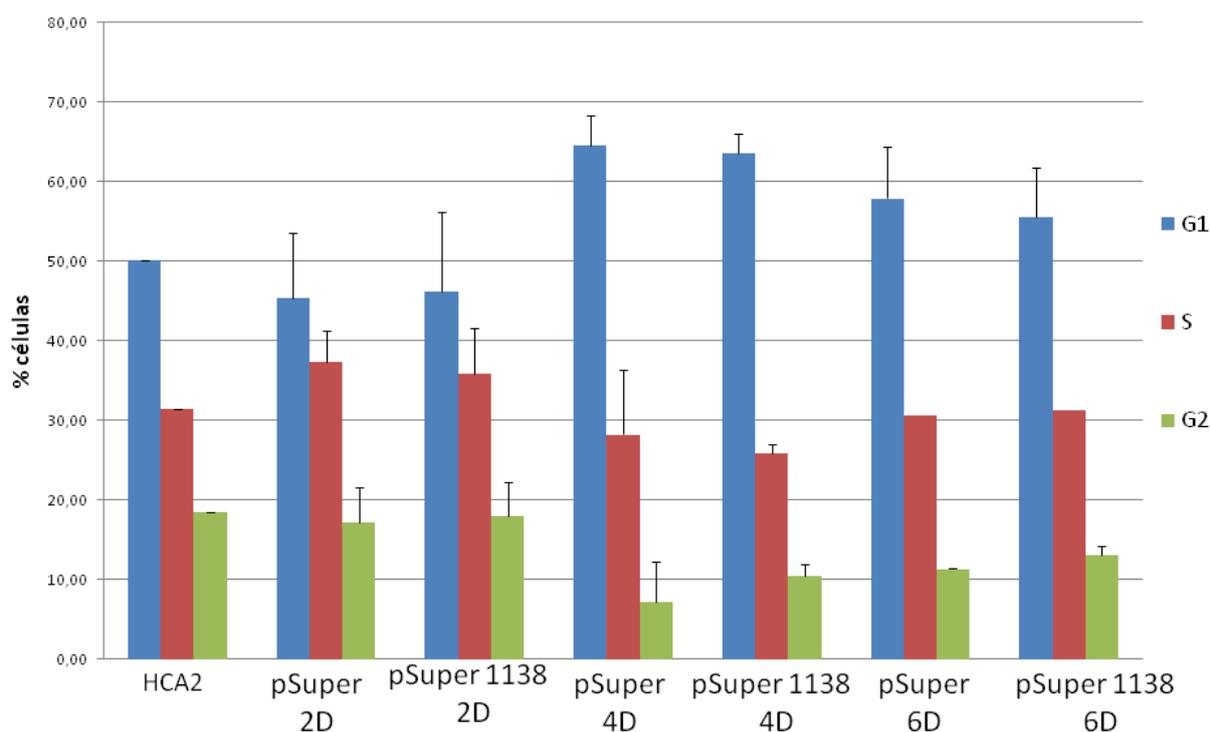
Empleando el shRNA que hemos visto que funcionaba inhibiendo *pelota* (pSuper sh1138) realizamos electroporaciones en la línea celular HCA2 – hTERT. Esta línea celular son fibroblastos embrionarios humanos inmortalizados mediante la expresión ectópica del gen de la telomerasa. La restauración de esa actividad permite la inmortalización de las células sin que se vean afectadas otras características biológicas de las mismas, incluyendo la regulación del ciclo celular, como sucede en el caso de la línea anteriormente empleada, SaOS2, que es Rb y p53 negativa, y presenta por tanto una regulación anormal del ciclo.

En primer lugar comprobamos si el shRNA funcionaba también en estas células. Para ello recogimos extractos a distintos tiempos tras la electroporación. Como se puede ver en la figura 22, el shRNA es efectivo también en esta línea celular, lo que nos permite estudiar el efecto de la inhibición de *pelota* también en estas células.



*Figura 22. Western Blot de extractos proteicos recogidos con EBC de la línea celular HCA2 – hTERT a los tiempos indicados tras la electroporación del shRNA 1138. La línea celular HCA2-hTERT fue electroporada para la introducción del vector que expresa el shRNA 1138. Los extractos proteicos fueron recogidos a los tiempos indicados tras la electroporación y se prepararon para Western Blot usando un anticuerpo anti-*pelota* (panel superior) y anti GAPDH como control de carga (panel inferior).*

Una vez comprobada la efectividad del shRNA 1138 (figura 22), analizamos sus efectos sobre la distribución de las HCA2 – hTERT en las diferentes fases del ciclo. Como se puede ver en la figura 23, en esta línea celular, al igual que sucedía en las SaOS2, la inhibición de *pelota* no afecta a la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular.



**Figura 23.** Análisis de DNA por citometría de flujo de HCA2 – hTERT recogidas a los tiempos indicados tras la introducción de varios shRNAs. La línea celular HCA2-hTERT fue electroporada para la introducción de los distintos vectores que expresan el shRNA. Tras ello, el contenido de DNA de las células fue analizado mediante citometría de flujo a los tiempos indicados. La población control es la marcada como pSuper (vector vacío). La primera serie de valores se corresponde con células HCA2 – hTERT asincrónicas recogidas como control.

#### 4. La proteína codificada por el gen *pelota* localiza intracelularmente en el citoplasma.

Valiéndonos de técnicas de inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-*pelota* y de vectores que expresaban una proteína de fusión con *pelota* conjugada, llevamos a cabo un análisis de la distribución intracelular de nuestra proteína, con el fin de avanzar en el conocimiento de su función. Como ya ha sido descrito previamente, *pelota* contiene una señal de localización nuclear, que en el caso de levaduras se ha visto que no es relevante para su función. Por otra parte, Sallam señalaba una localización centromérica de *pelota* en células ES de ratón (Sallam, 2001).

En primer lugar empleamos un anticuerpo comercial (antiPELO) para estudiar la distribución intracelular de la proteína expresada por el gen *pelota*. Como se puede ver en la figura 24, este anticuerpo es específico contra nuestra proteína, reconociendo una única banda correspondiente a la misma, y reconociendo también específicamente la proteína *pelota* transfectada modificada con un epitopo (myc).

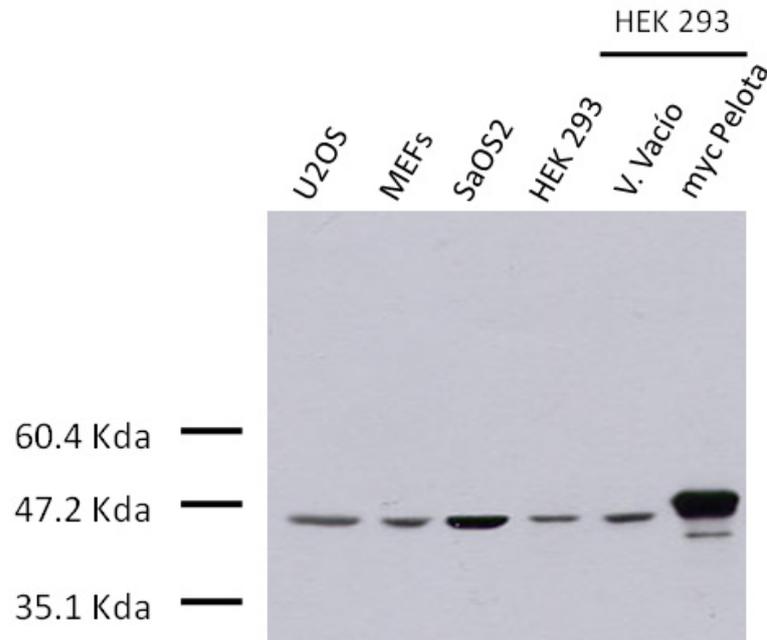


Figura 24. Western Blot de extractos proteicos recogidos con EBC de las distintas líneas celulares indicadas. Se recogieron extractos proteicos de las distintas líneas celulares en crecimiento asincrónico. En el caso de las HEK 293 transfectadas, los extractos proteicos han sido recogidos 48 horas después de la transfección mediante fosfato de calcio. Se muestra un Western Blot con el anticuerpo anti-*pelota* en donde se ve cómo el anticuerpo reconoce específicamente la proteína endógena, así como la exógena sobreexpresada.

Cuando utilizamos el anticuerpo anti-*pelota* en inmunofluorescencia pudimos ver cómo la proteína *pelota* se distribuye por todo el citoplasma, excluyendo el núcleo celular y sin acumularse en ningún punto específico de la célula (figuras 25, 26, 27 y 28). Estos resultados no son dependientes de la línea celular empleada para realizar los experimentos, porque hemos obtenido los mismos tanto en HCA2 – hTERT (figuras 25 y 26) como en HEK 293 (figuras 27 y 28).

Dado que se ha descrito que *pelota* podría acumularse en el centrosoma de la célula, estábamos especialmente interesados en saber si se localizaba al menos parcialmente en esta estructura. Además, en algunas tinciones detectábamos aparentes concentraciones de inmunorreactividad de *pelota* en puntos concretos de la célula. Por todo ello, realizamos cotinciones en células HEK 293 y HCA2 - hTERT de *pelota* y gamma-tubulina, una proteína que se sabe se concentra en centrosoma. En las figuras 26 y 28 se ve cómo *pelota* endógena no colocaliza con  $\gamma$  – tubulina, y que incluso las concentraciones de inmunorreactividad de *pelota* que se observan en algunas células no suelen coincidir con zonas positivas para  $\gamma$  – tubulina.

Al mismo tiempo realizamos en las mismas células cotinciones de *pelota* y  $\alpha$  – tubulina, que marca los microtúbulos de la célula y nos podría dar alguna indicación de su localización intracelular general. En las figuras 25 y 27, vemos como en estas cotinciones se observa claramente la exclusión de tinción en el núcleo, y que *pelota* tampoco se concentra en puntos determinados de la célula.

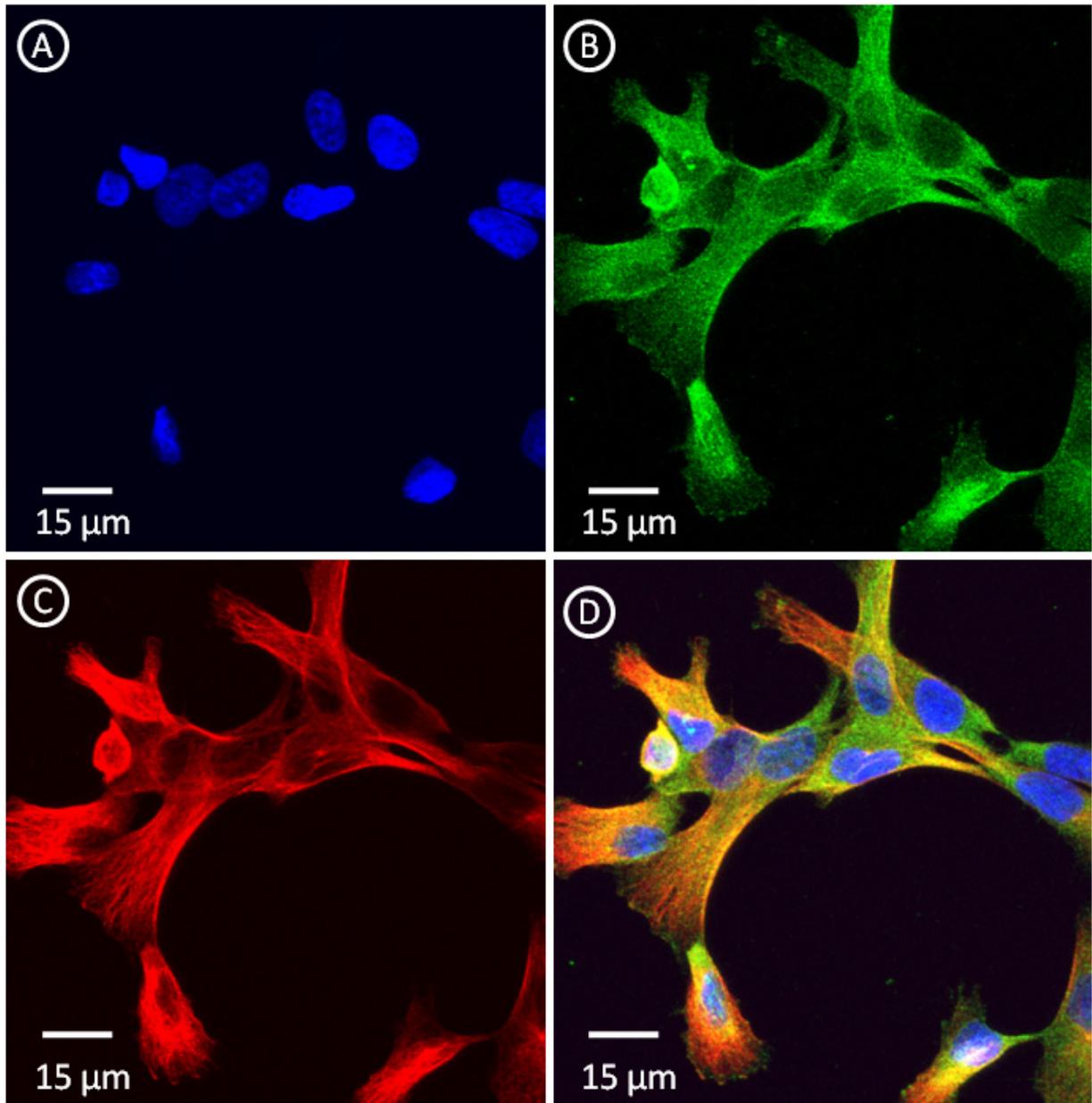


Figura 25. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HCA2 – hTERT. Las células empleadas fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti pelota 1:25; anti  $\alpha$  – tubulina 1:10.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. Distribución intracelular de pelota, que excluye núcleo. Fig. C. Distribución de  $\alpha$  – tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

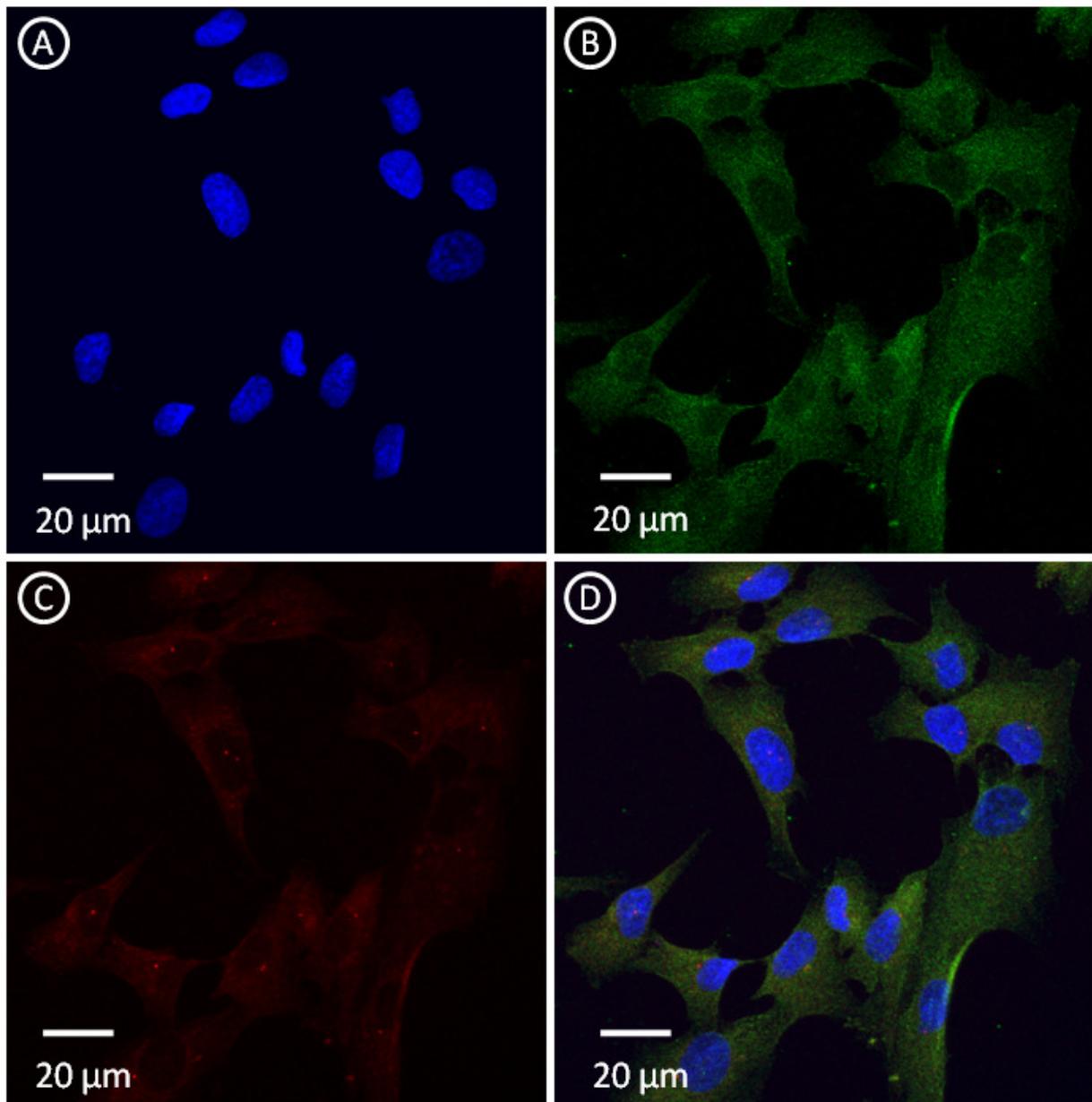


Figura 26. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HCA2 – hTERT. Las células empleadas fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti pelo 1:25; anti  $\gamma$  – tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. Distribución intracelular de pelota, que excluye núcleo. Fig. C. Distribución de  $\gamma$  – tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

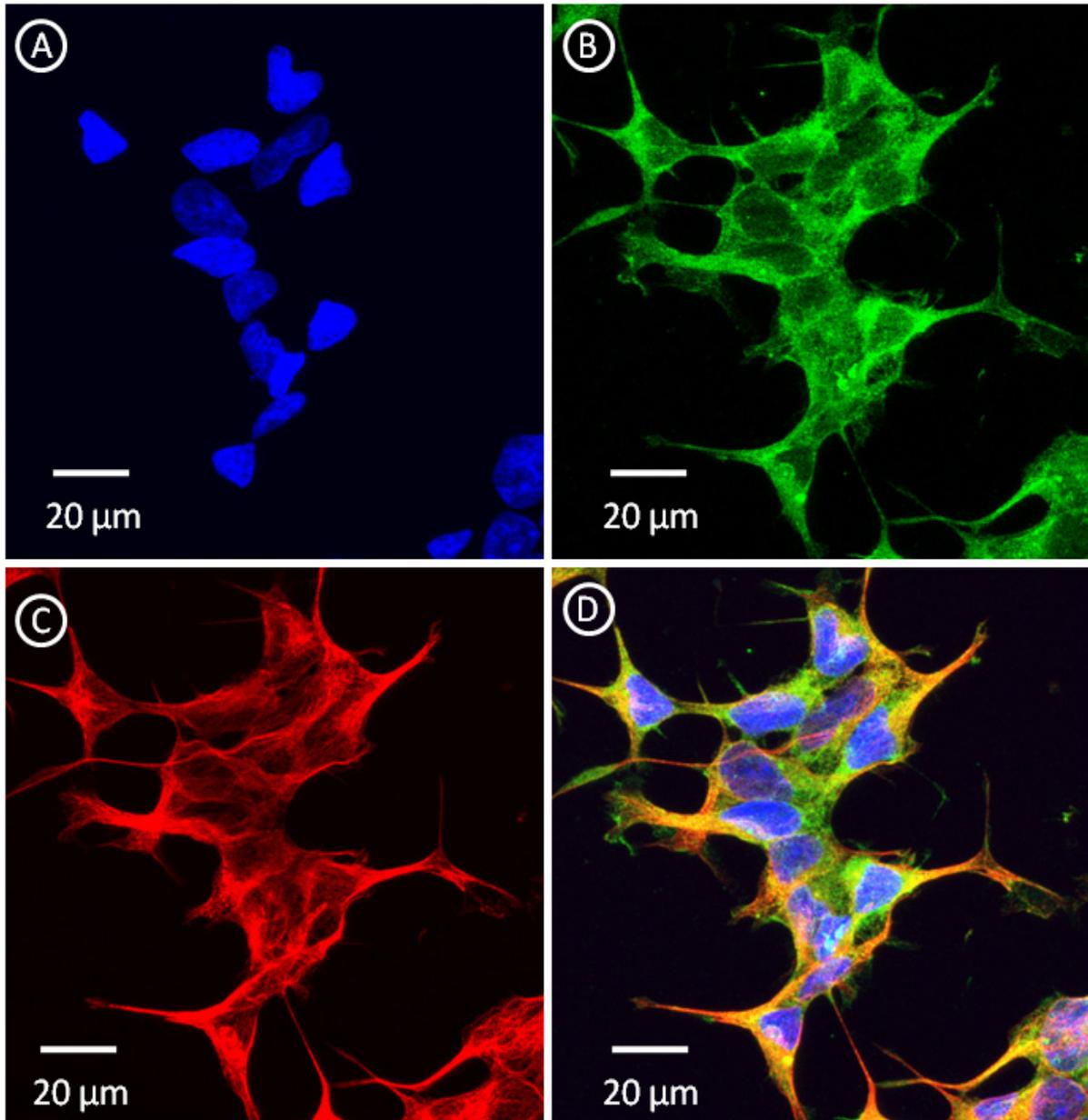
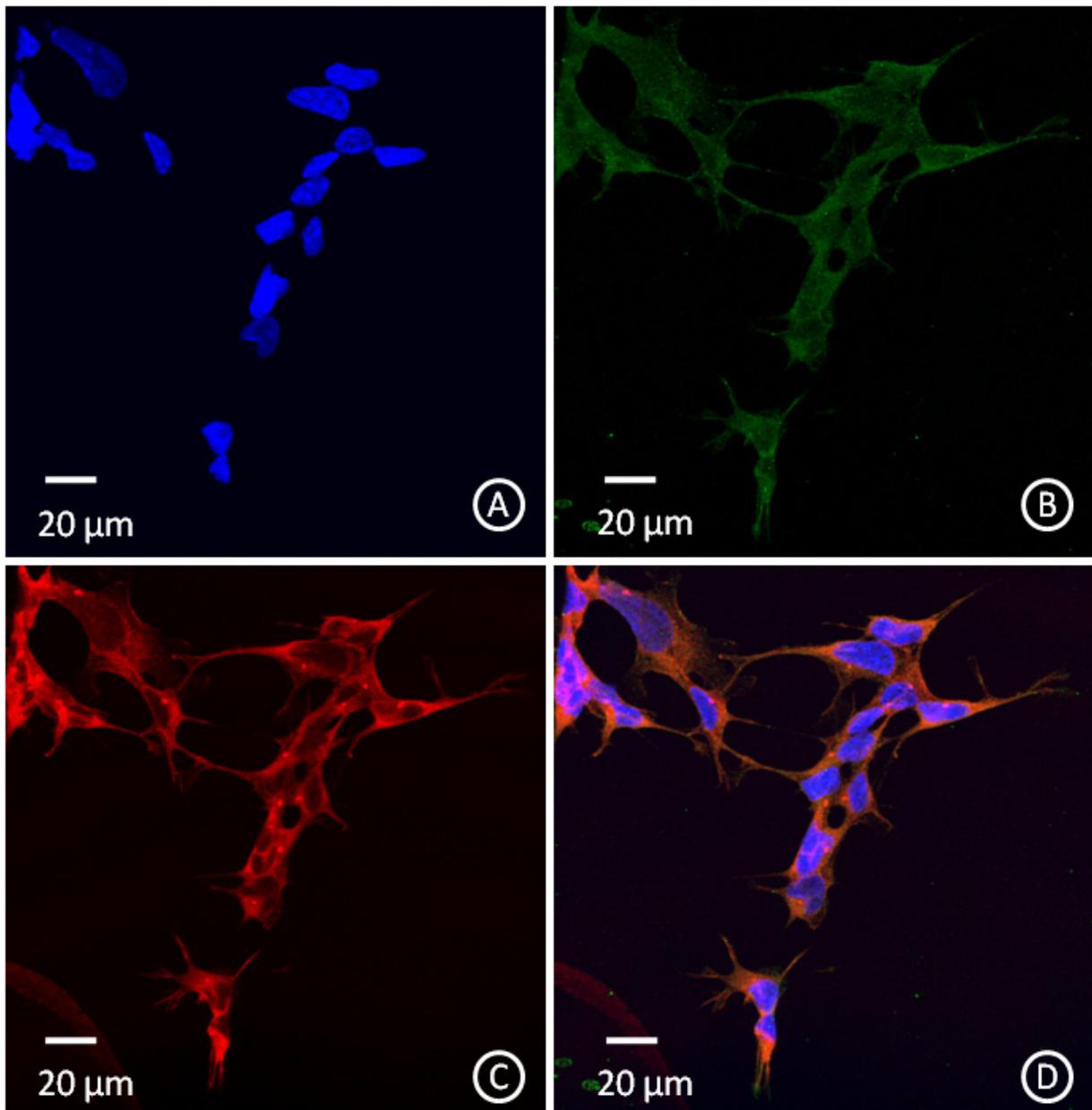


Figura 27. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293. Las células empleadas fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti pelota 1:25; anti  $\alpha$  - tubulina 1:10.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. Distribución intracelular de *pelota*, que excluye núcleo. Fig. C. Distribución de  $\alpha$  - tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.



**Figura 28.** Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293. Las células empleadas fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti pelo 1: 500; anti  $\gamma$  - tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. Distribución intracelular de *pelota*, que excluye núcleo. Fig. C. Distribución de  $\gamma$  - tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

## Resultados

Posteriormente realizamos inmunofluorescencias empleando vectores que expresaban una proteína de fusión unida a *pelota*. Con esto queríamos corroborar la localización de *pelota* con un método independiente de anticuerpo y de fijación de las células.

En primer lugar empleamos un vector que expresaba GFP. Para realizar los experimentos con el vector que expresaba GFP – *pelota* (pEGFP – C1 *pelota*) la línea celular HEK 293 fue sembrada en placas de 60 mm y transfectada con los vectores correspondientes (pEGFP – C1 o bien pEGFP – C1 *pelota*) usando el protocolo de fosfato de calcio. Se usaron porcentajes variables de los plásmidos de interés (1%, 4% y 10%, indicado en las imágenes) completando el total de DNA usado para la transfección con un vector vacío (pBluescript), para evitar un exceso de sobreexpresión que podría oscurecer la localización de *pelota*.

En estas imágenes podemos ver que mientras el vector control vacío (pEGFP – C1) se distribuye uniformemente por toda la célula, entrando en el núcleo (figura 29), en el caso del vector que expresa la proteína de fusión GFP – *pelota* (pEGFP – C1 *pelota*) la distribución de la misma es en el citoplasma de las células estudiadas, excluyendo núcleo de una manera clara (figura 30). En el caso de esta proteína de fusión, podemos ver que colocaliza con  $\gamma$  – tubulina en una minoría de células.

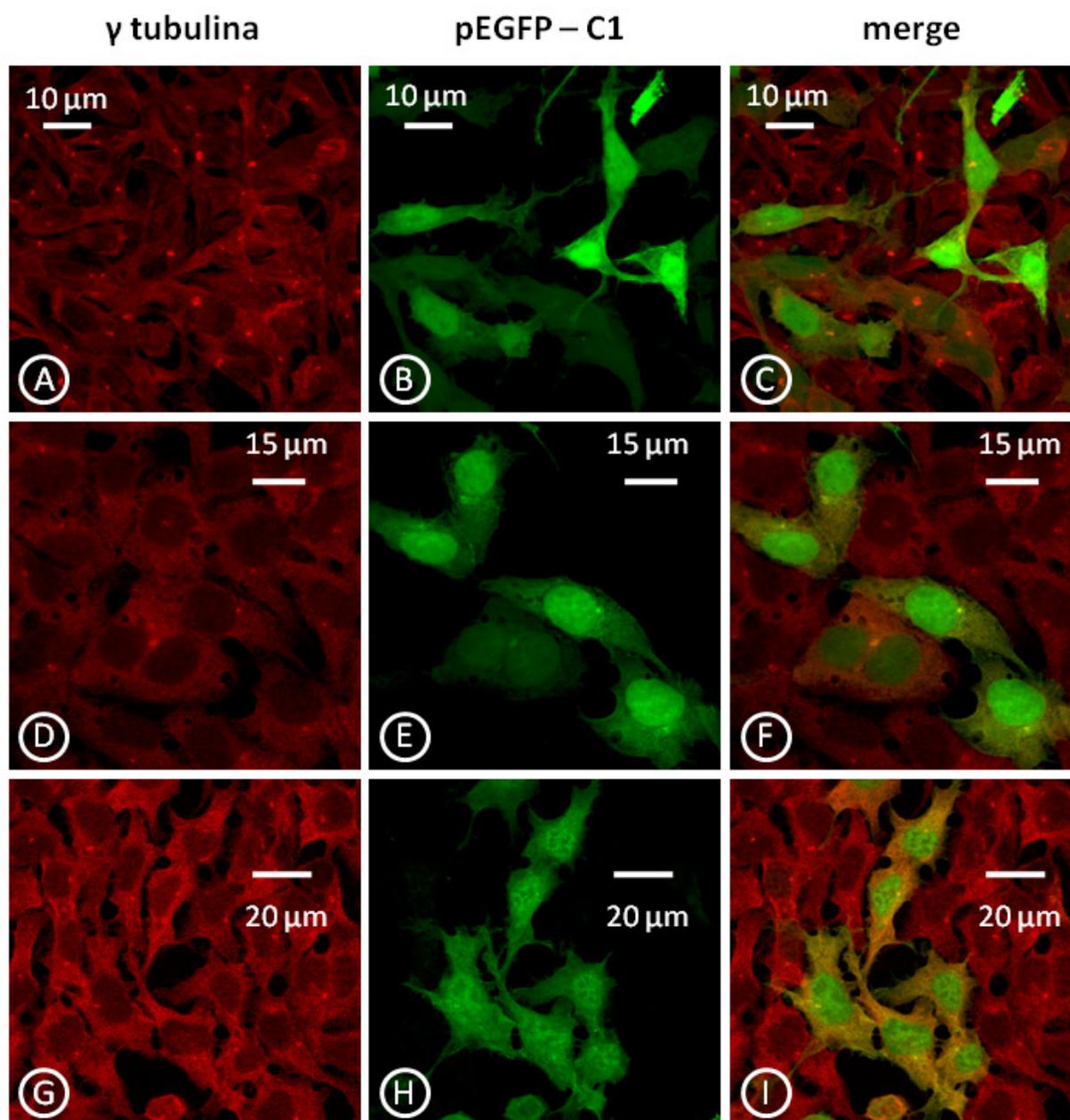
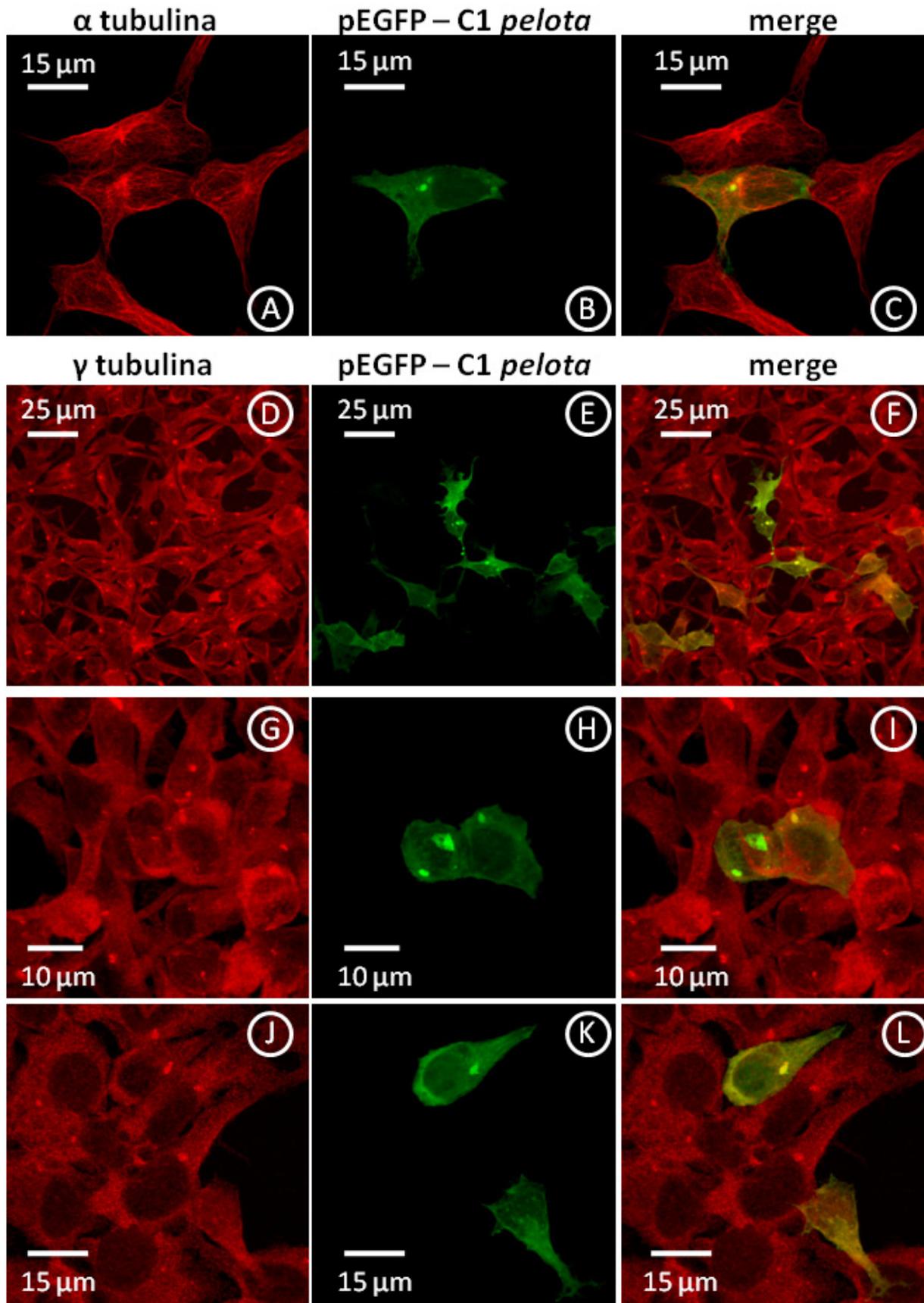


Figura 29. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293, transfectada con un vector que expresa GFP (FIGs. B, E, H). La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores que expresan las proteínas de fusión indicadas. Tras ello, las células fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes de microscopía confocal (Figs. A - C, transfección con 4% de plásmido, objetivo 100X (HCX PL APO CS 100X/1.40 Oil); Figs D - F, transfección con 10 % de plásmido, objetivo 100X, zoom 1.5; Figs. G - I, transfección con 1% de plásmido, objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil), zoom 2). Anticuerpos usados: anti  $\gamma$  - tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Figs. B, E, H. GFP mostrando una distribución celular ubicua en toda la célula. Figs. A, D, G. Distribución de  $\gamma$  - tubulina en las mismas células. Fig. C, F, I. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.



**Figura 30.** Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293, transfectada con un vector que expresa GFP - *pelota* (FIGs. B, E, H, K). La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores que expresan las proteínas de fusión indicadas. Tras ello, las células fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes de microscopía confocal (Figs. A - C y J - L, transfección con 1 % de plásmido, objetivo 100X (HCX PL APO CS 100X/1.40 Oil), zoom 2; Figs. D - F, transfección con 1 % de plásmido, objetivo 100X (HCX PL APO CS 100X/1.40 Oil), zoom 2); Figs. G - I, transfección con 4 % de plásmido, objetivo 100X (HCX PL APO CS 100X/1.40 Oil), zoom 2). Anticuerpos usados: anti  $\alpha$  - tubulina 1:10.000; anti  $\gamma$  - tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Figs. B, E, H, J. GFP -*pelota* mostrando una distribución celular que excluye el núcleo de la célula. Fig. A. Distribución de  $\alpha$  - tubulina en las mismas células. Figs. D, G, K. Distribución de  $\gamma$  - tubulina en las mismas células. Fig. C, F, I, L. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

Tras usar los vectores que expresaban GFP, pasamos a realizar estos experimentos con un vector que expresaba una proteína de fusión distinta, CFP (color cian), para corroborar los resultados vistos anteriormente.

Al igual que para las inmunofluorescencias realizadas con GFP, en el caso de este vector vemos que el vector vacío (pECFP - C1) se distribuye por toda la células, entrando en el núcleo (figura 31), mientras que el vector que expresa la proteína de fusión (pECFP - C1 *pelota*) se distribuye por el citoplasma celular, excluyendo claramente el núcleo de las células (figura 32). Los acúmulos de la proteína que aparecen en las muestras no muestran una colocalización clara con ninguna estructura celular.

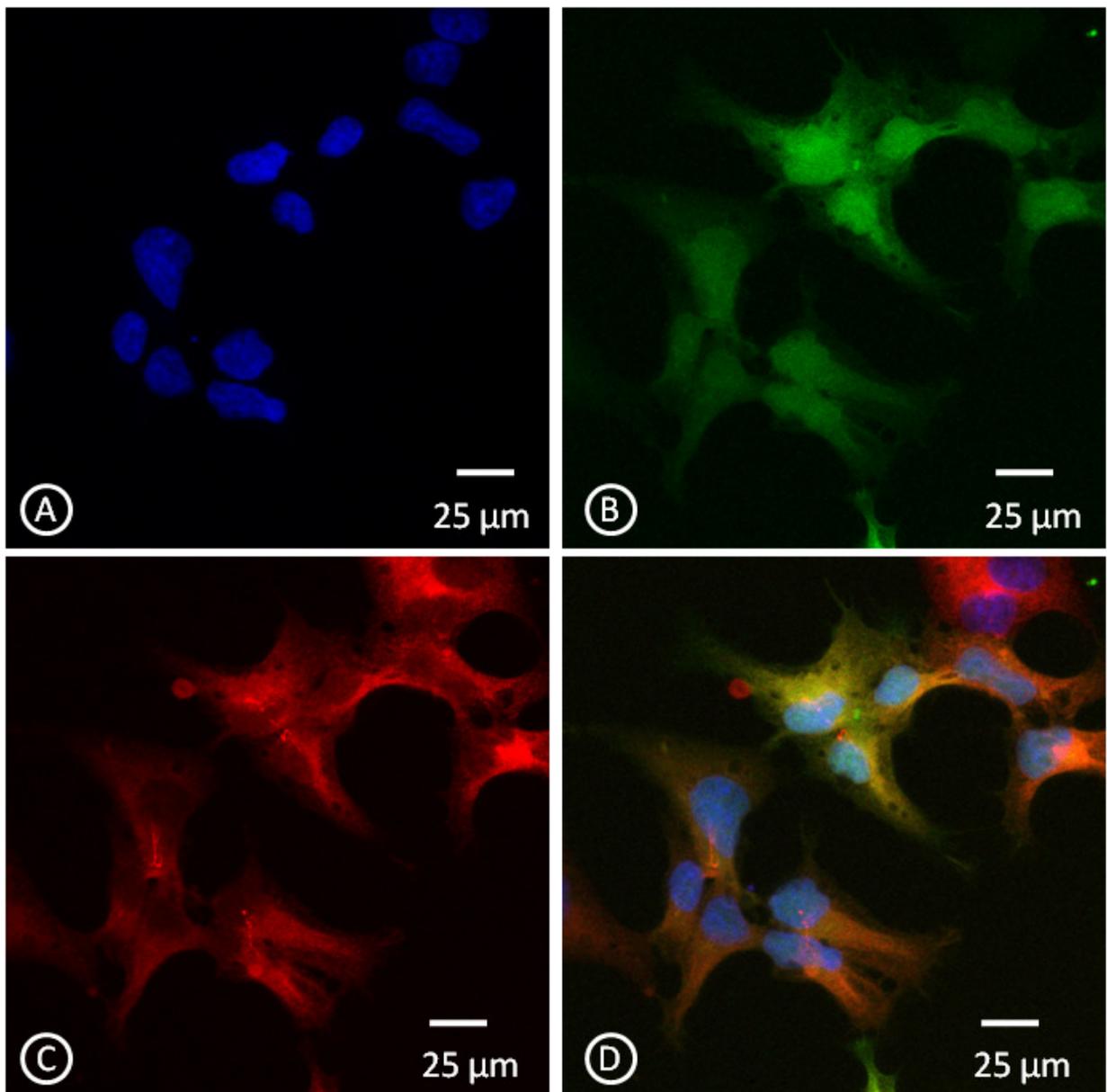


Figura 31. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293, transfectada con un vector control que expresa CFP (FIG. B). La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores que expresan las proteínas de fusión indicadas. Tras ello, las células fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti  $\gamma$  - tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1: 250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. CFP distribuido ubicuamente por toda la célula. Fig. C. Distribución de  $\gamma$  - tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

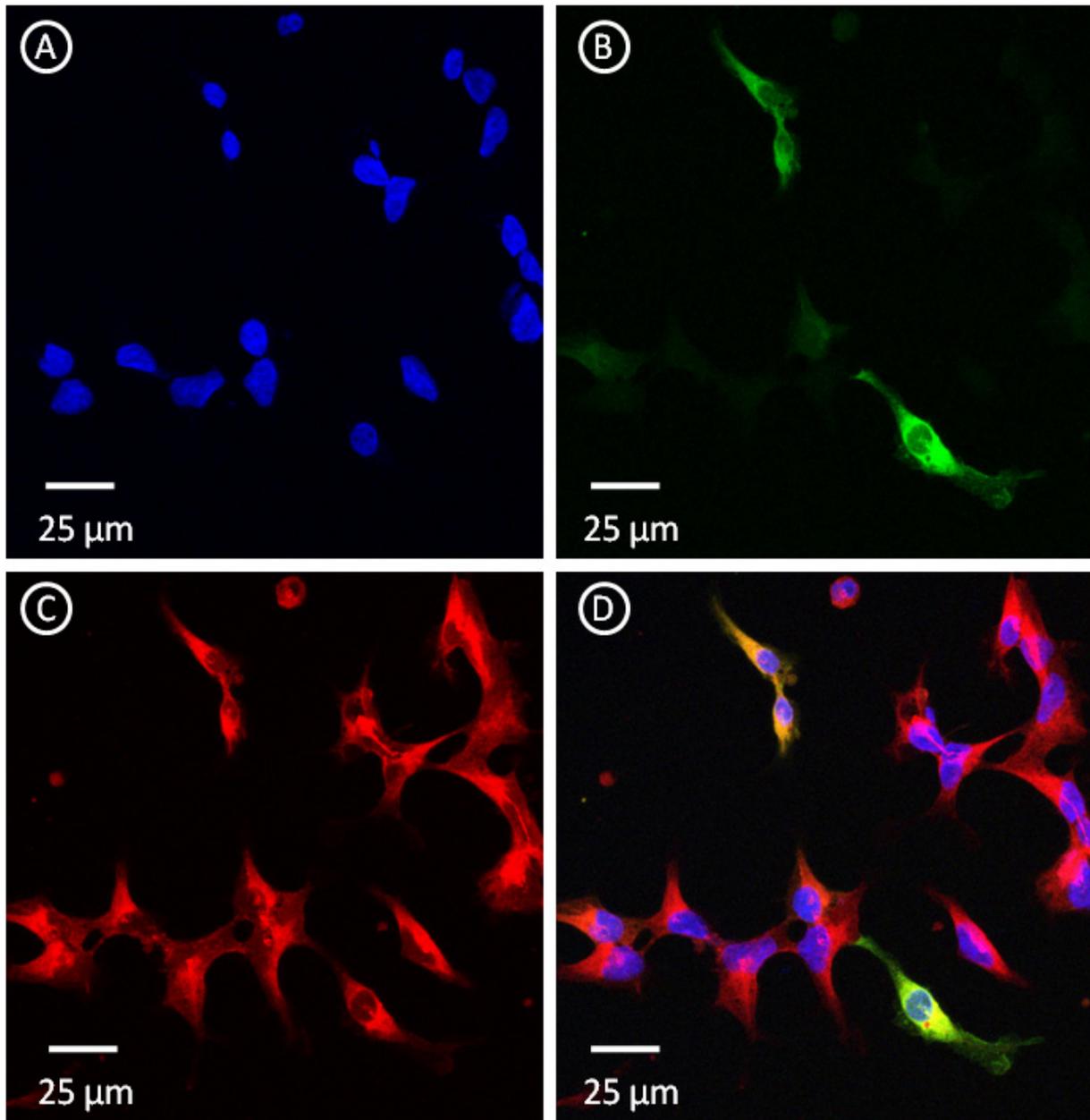


Figura 32. Inmunofluorescencia realizada en la línea celular HEK 293, transfectada con un vector que expresa CFP- *pelota* (FIG. B). La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores que expresan las proteínas de fusión indicadas. Tras ello, las células fueron sembradas y fijadas en cubreobjetos circulares, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos indicados en cada caso. Imágenes tomadas en un microscopio confocal con un objetivo 63X (HCX PL APO lbd. BL 63X/1.40 Oil). Anticuerpos usados: anti  $\gamma$  - tubulina 1:5.000; Alexa Fluor® 546 goat anti mouse 1:250. Fig. A. Núcleo celular teñido con Hoechst. Fig. B. CFP- *pelota* mostrando una distribución celular que excluye claramente el núcleo. Fig. C. Distribución de  $\gamma$  - tubulina en las mismas células. Fig. D. Fusión de las anteriores imágenes correspondientes a los distintos campos.

## 5. Estudio del papel de *pelota* en mecanismos de control de calidad del mRNA.

Un homólogo de *pelota*, Dom34 en *S. cerevisiae*, ha sido descrito como un componente fundamental dentro del mecanismo NoGo Decay de control de calidad del mRNA. Este mecanismo ha sido descrito en levaduras, y se desconoce si existe en otro tipo de organismos. A partir de los datos previos nos interesaba estudiar si *pelota*, al igual que su homólogo, con el que comparte numerosas características, estaba implicada en este sistema, al mismo tiempo que comprobábamos el funcionamiento del mecanismo en células humanas. En paralelo realizamos los mismos experimentos con reporter para el mecanismo del NonStop Decay, que además de permitirnos ver si *pelota* está implicada en algún mecanismo de este tipo nos sirve de control, ya que este mecanismo sí ha sido estudiado en células de mamífero, en donde se ha visto que no existe degradación de los mRNAs aberrantes, aunque sí una disminución de la síntesis de proteína a partir de ellos.

### 5.1. Vectores reporter.

Los vectores reporter empleados para el estudio de estos mecanismos fueron cedidos amablemente por el Dr. Akimitsu (Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi, Tsukubashi, Ibaraki, Japan).

Estos reporter expresan una luciferasa con la expresión mejorada por optimización de codones. La estructura de estos reporter está diseñada de tal modo que sean susceptibles a la actividad de estos mecanismos de control de calidad del mRNA, de tal forma que nos proporcionan un modo de cuantificar el funcionamiento del mecanismo de nuestro interés y las posibles variaciones inducidas en él en los distintos experimentos.

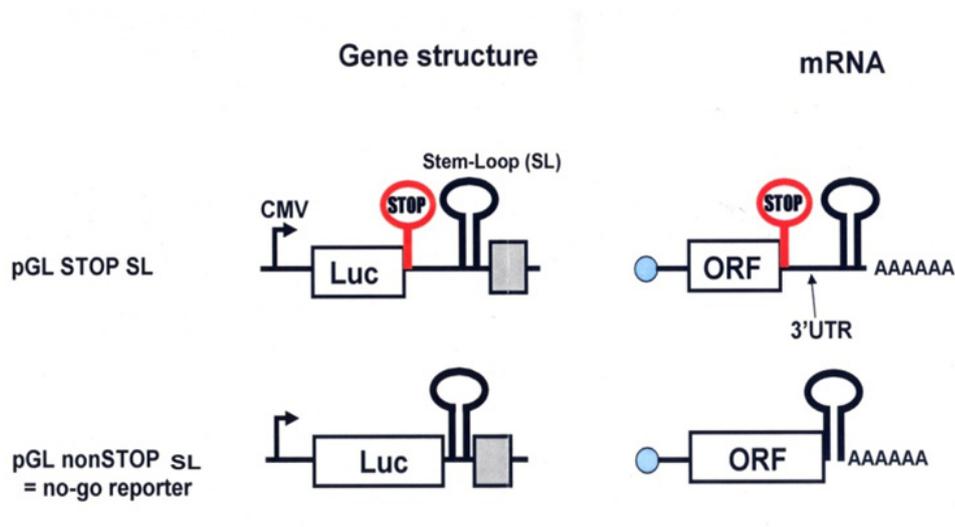
No Go Decay

Figura 33. Estructura de los vectores reporter empleados para estudiar el sistema NoGo Decay, tanto a nivel del gen como del mRNA que expresan. Ambos vectores presentan en su estructura una horquilla muy estable, capaz de detener al ribosoma responsable de la traducción.

Para el estudio del mecanismo de NoGo Decay se han empleado los vectores pGL Stop SL y pGL NonStop SL. Ambos vectores presentan una horquilla muy estable ( $\Delta G = -74,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) en su estructura. Este tipo de estructura ya había demostrado ser capaz de detener al ribosoma que esté traduciendo el mRNA, siendo esta parada la señal desencadenante para el mecanismo de NoGo Decay, que provoca la degradación del mRNA defectuoso.

Para evitar posibles efectos debidos a la presencia de la horquilla e independientes de la traducción, usamos un vector control que presenta la misma estructura 3' respecto a la región codificante para luciferasa, pero que además tiene un codón stop previo y un UTR en 3'.

NonStop Decay

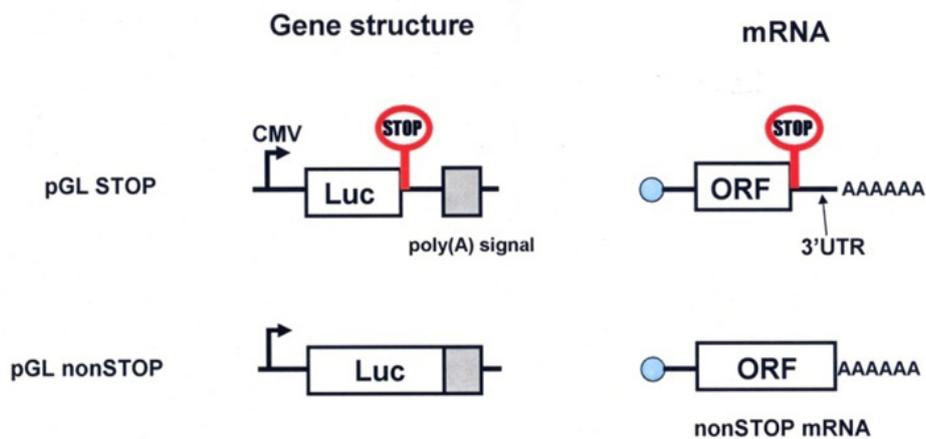


Figura 34. Estructura de los vectores reporter empleados para estudiar el sistema NonStop mRNA Decay, tanto a nivel del gen como del mRNA que expresan. Mientras que el vector control presenta una estructura normal, el reporter carece de codón de terminación de la transcripción en pauta.

Para el estudio del NonStop Decay, los vectores empleados han sido pGL Stop, y pGL NonStop. De estos dos vectores reporter, el primero es el vector control, ya que presenta una estructura normal, tanto el gen como el mRNA resultante, mientras que el pGL NonStop es el vector reporter, dado que presenta en su estructura la ausencia de un codón stop (de terminación de la transcripción en pauta), dando lugar por lo tanto a un mRNA incorrecto, que sería susceptible de ser degradado mediante el mecanismo de NonStop Decay.

## 5.2. NoGo mRNA Decay.

### 5.2.1. No existen evidencias del mecanismo de No Go Decay en las líneas celulares humanas empleadas (HEK 293).

En primer lugar quisimos ver cómo se comportaban los reporteros del NGD en nuestras células y su respuesta a los mecanismos de control, para lo cual realizamos una transfección de los vectores reportero en la línea celular HEK 293 empleando el protocolo de fosfato de calcio. Cotransfectamos pGL Stop SL y pGL NonStop SL junto con pCMV $\beta$  (que expresa  $\beta$  – galactosidasa) como control de transfección para la corrección de los valores de luciferasa. 48 horas post – transfección recogimos extractos celulares para medir los niveles de luciferasa y  $\beta$  galactosidasa, RNA para realizar una RT – PCR para sus mRNAs, y extractos proteicos para estudiar los niveles de expresión de *pelota*.

#### 5.2.1.1. Los vectores reportero del NoGo Decay muestran una disminución importante de la expresión de la proteína luciferasa.

En primer lugar cuantificamos la expresión de los vectores (tanto control como reportero), para ver si el mecanismo funcionaba en las líneas celulares empleadas. En la tabla 2 podemos ver cómo la expresión proteica del mRNA con la horquilla en su región codificante (pGL nonStop SL) disminuye considerablemente respecto a su control (pGL Stop SL) lo que nos indica que la expresión de este mRNA se afecta en gran medida por la presencia de la horquilla.

Luc / $\beta$ gal HEK 293	pGL Stop SL	pGL nonStop SL
pSuper	1,0 $\pm$ 0,1204	0,0026 $\pm$ 0,0017

Tabla 2. Expresión de luciferasa para las transfecciones indicadas. La cuantificación de la expresión de luciferasa ha sido corregida en función de la expresión de  $\beta$  - galactosidasa, siguiendo el protocolo indicado. Los datos se muestran como expresión relativa de los vectores reporter con respecto al control. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recojidas 48 horas después de la transfección.

5.2.1.2. Los vectores reporter del NoGo no muestran disminución a nivel de mRNA.

Tras la cuantificación de los niveles de expresión de proteína luciferasa, miramos los niveles de expresión de la misma pero a nivel de mRNA, para comprobar si el mecanismo de NoGo Decay estaba actuando sobre el vector reporter en el caso de estas transfecciones degradando el mRNA en donde aparecía una horquilla y por tanto disminuyendo sus niveles. Para ello extrajimos RNA de las células transfectadas, HEK293, y realizamos RT-PCRs utilizando oligonucleótidos específicos para luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. En la figura 35 se puede observar que los niveles de mRNA transcritos de los vectores que deberían estar sometidas a NoGo decay no son significativamente diferentes de los de los vectores control.

Estos resultados nos muestran que pese a la disminución de la expresión proteica de luciferasa del vector reporter con respecto al vector control, el mRNA no está siendo degradado.

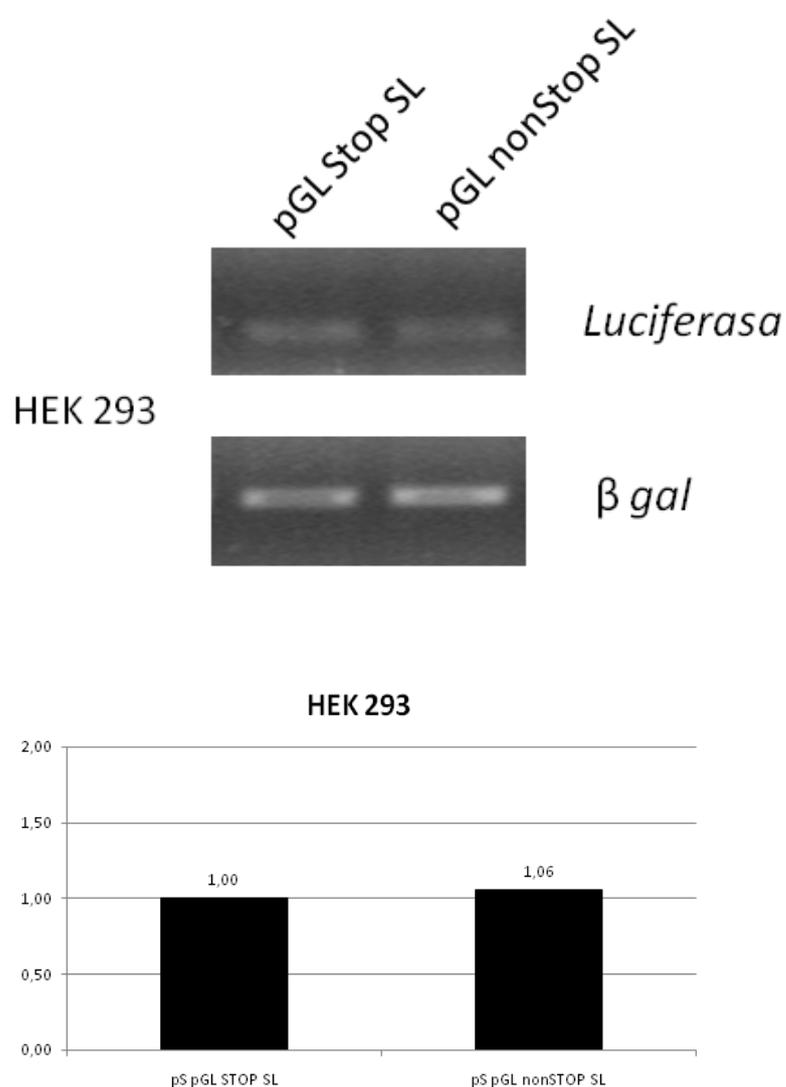


Figura 35. RT - PCRs de luciferasa y  $\beta$  - galactosidasa para las muestras anteriormente mencionadas, en las que los vectores reporter han sido cotransfectados junto con pCMV $\beta$ . La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio. 48 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras, y se realizó una RT-PCR de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección. Se muestran las fotos de los productos de amplificación tras electroforesis en gel de agarosa, en las muestras obtenidas de la línea celular HEK293 (panel superior). La cuantificación del mRNA de luciferasa corregida por  $\beta$ -galactosidasa se muestra en las gráficas inferiores.

## Resultados

5.2.1.3. La proteína codificada por el gen *pelota* no se ve afectada aparentemente por los vectores reporter del sistema NoGo Decay.

El siguiente paso fue ver si la transfección de estos vectores tenía algún efecto en la expresión de la proteína *pelota*. Como podemos ver en los siguientes resultados (figura 36), la cotransfección de los vectores reporter no afecta a la expresión de la proteína *pelota*.

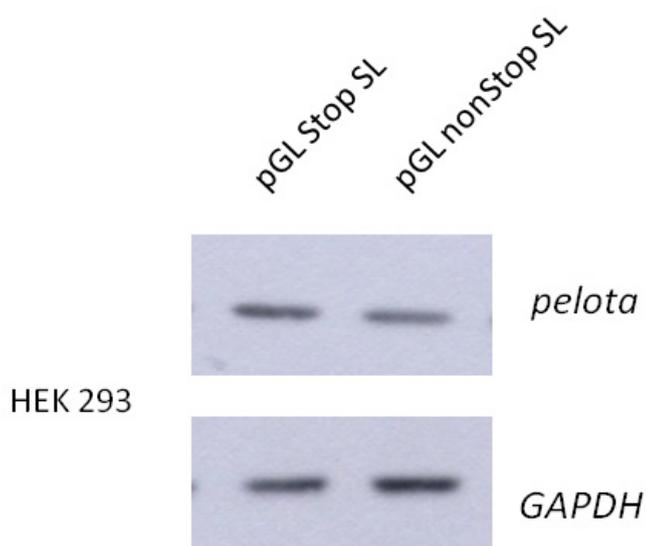
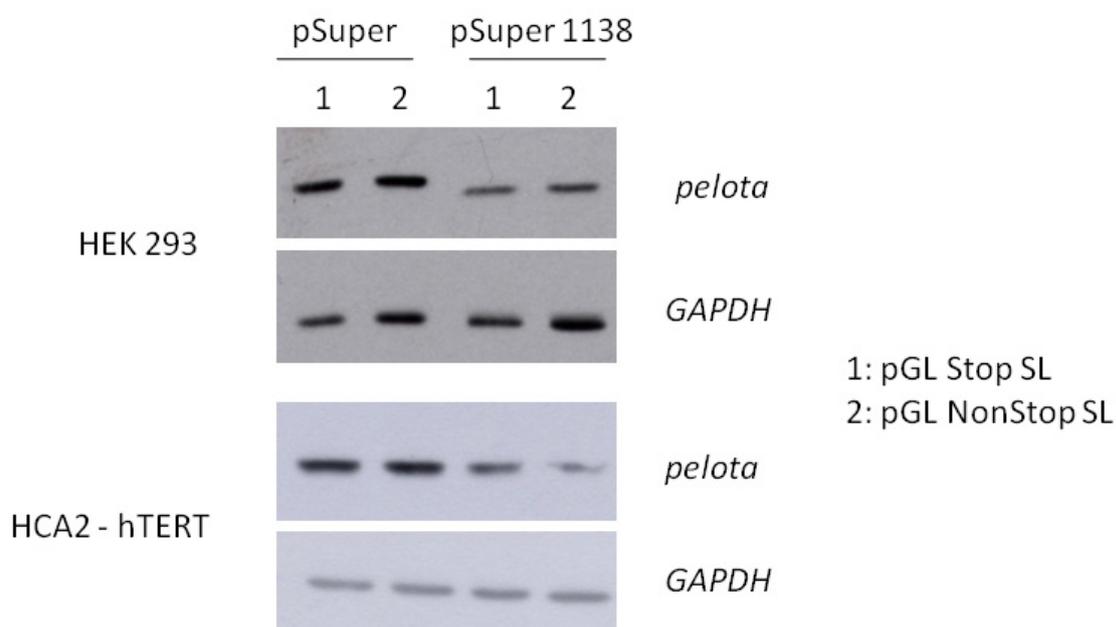


Figura 36. Western Blot de extractos proteicos recogidos con EBC 48 horas después de la transfección, de las líneas celulares indicadas. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio. Las muestras proteicas fueron recogidas 48 horas después de la introducción de los vectores y preparadas para Western Blot con anticuerpo anti-*pelota* (panel superior) y GAPDH como control de carga (panel inferior).

5.2.2. La inhibición de la proteína codificada por el gen *pelota* no produce ningún tipo de variación en los vectores reporter del NoGo Decay en las líneas celulares estudiadas.

Posteriormente realizamos una cotransfección de los vectores (control y reporter) junto con el vector que codifica para el shRNA que inhibe *pelota*. Aunque los niveles de *pelota* se mantengan estables cuando transfectamos los reporter del NoGo, si nuestra proteína *pelota* estuviese implicada de algún modo en este mecanismo, bien en la liberación del ribosoma o bien en la degradación del mRNA defectuoso, su inhibición podría alterar la tasa de mRNAs susceptibles de ser degradados mediante este mecanismo. Como podemos ver en la figura 37, el shRNA (pSuper 1138) ha funcionado inhibiendo la expresión de la proteína *pelota*.



**Figura 37. Inhibición de *pelota* mediante shRNA.** La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, mientras que la línea celular HCA2-hTERT fue electroporada usando el Nucleofector Kit V (Amaya). Las células empleadas fueron transfectadas con el vector vacío (pSuper) o bien con el vector que expresa el shRNA contra *pelota* (pSuper 1138). Las muestras proteicas fueron recogidas 48 horas después de la introducción de los vectores y preparadas para Western Blot contra *pelota* (paneles 1 y 3) y GAPDH como control de carga (paneles 2 y 4).

## Resultados

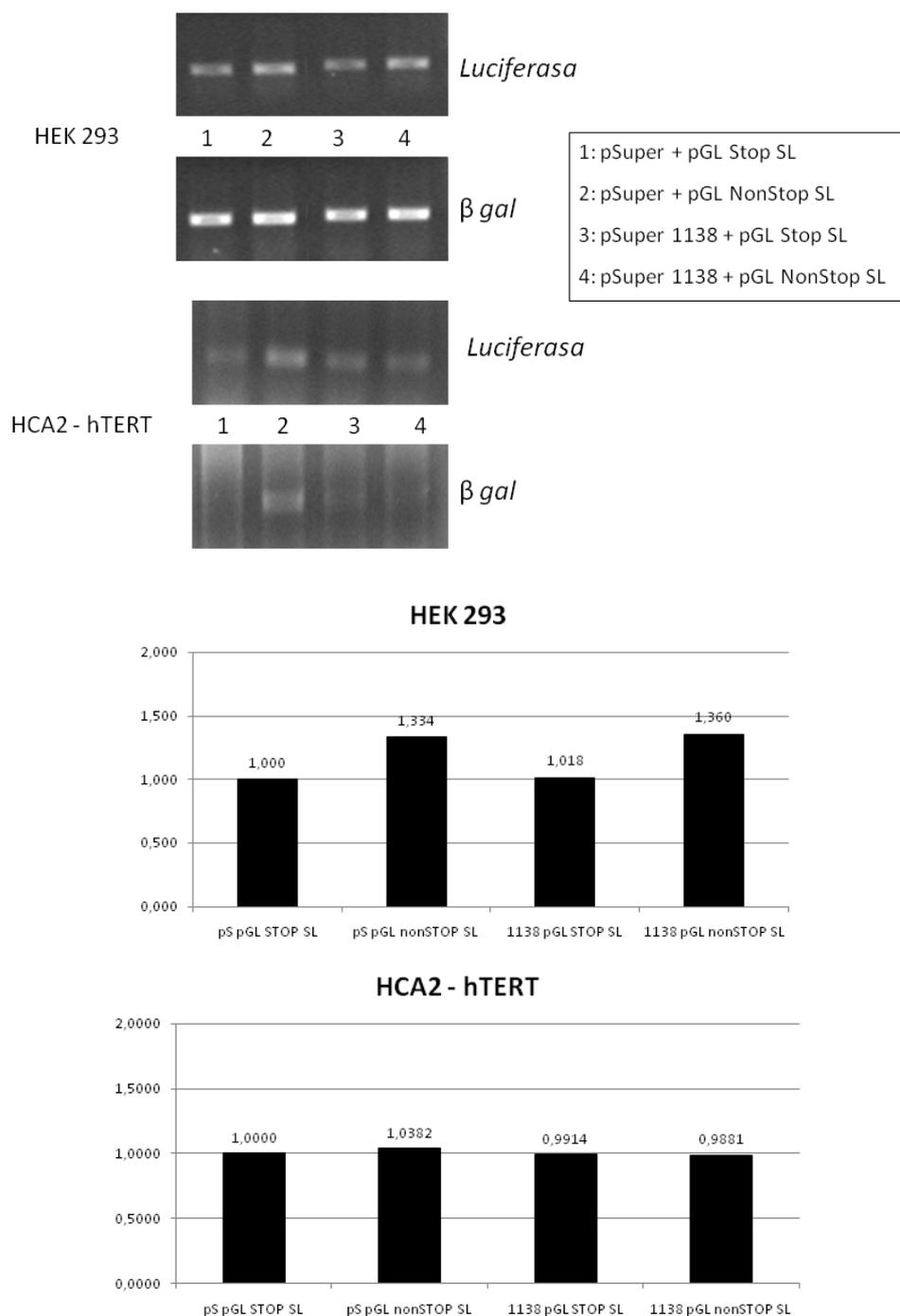
En este mismo experimento recogimos extractos para cuantificar la expresión de luciferasa y  $\beta$  galactosidasa. A nivel de expresión de luciferasa de los vectores reporter, podemos ver en la tabla 3 cómo sigue existiendo una disminución apreciable entre los niveles de expresión del vector control y los niveles del vector reporter en el caso de la línea celular HEK 293, resultados que se mantienen en la línea celular HCA2-hTERT, demostrando así también el funcionamiento de los vectores reporter también en estas células. Sin embargo, la inhibición de *pelota* no hace variar estos resultados, tanto en una línea celular como en otra, siendo similar a la disminución producida sin inhibir la proteína.

Luc2 / $\beta$ gal HEK 293	pGL Stop SL	pGL NonStop SL
pSuper	1,0 $\pm$ 0,12	0,0014 $\pm$ 0,0009
pSuper 1138	1,0 $\pm$ 0,12	0,0019 $\pm$ 0,0017

Luc2 / $\beta$ gal HCA2 - hTERT	pGL Stop SL	pGL NonStop SL
pSuper	1,0 $\pm$ 0,054	0,0007 $\pm$ 0,0004
pSuper 1138	1,0 $\pm$ 0,034	0,016 $\pm$ 0,022

Tabla 3. Niveles de expresión de luciferasa corregidos por  $\beta$  – galactosidasa en las líneas celulares estudiadas y en las distintas cotransfecciones de los vectores control (pGL Stop SL) y reporter (pGL NonStop SL) junto con el vector vacío (pSuper) o bien el que expresa el shRNA (pSuper 1138). Los datos se muestran como expresión relativa de los vectores reporter con respecto al control. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, mientras que la línea celular HCA2-hTERT fue electroporada usando el Nucleofector Kit V (Amaxa), con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recogidas 48 horas después de la transfección.

Cuando medimos los niveles de mRNA de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa en las mismas muestras, observamos que la inhibición de *pelota* no produce una ninguna diferencia significativa en sus niveles. El mRNA sigue sin ser degradado en este caso (figura 38).

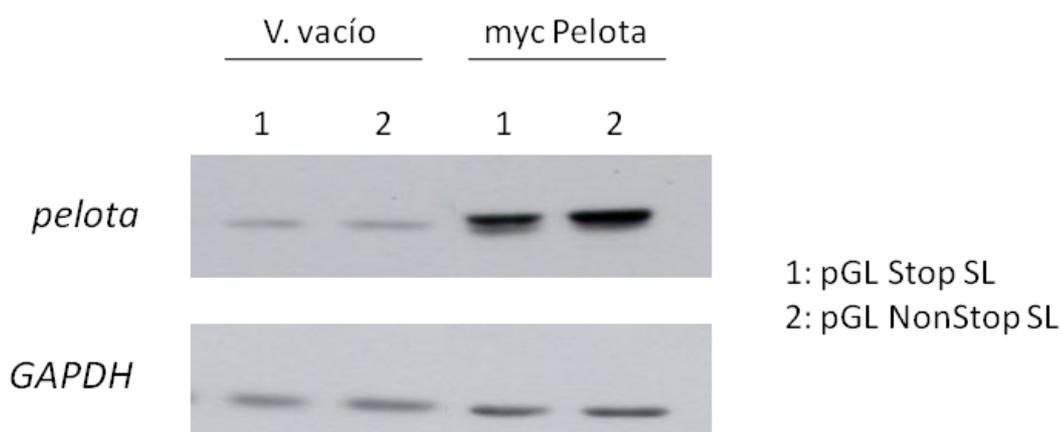


**Figura 38.** RT – PCR de luciferasa y  $\beta$  – galactosidasa y sus correspondientes densitometrías para las muestras arriba indicadas. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, mientras que la línea celular HCA2-hTERT fue electroporada usando el Nucleofector Kit V (Amaxa). 48 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras y se realizó una RT-PCR de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección. En los paneles superiores se muestran las fotos de los productos de amplificación tras electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación del mRNA de luciferasa corregida por  $\beta$ -galactosidasa se muestra en las gráficas inferiores.

## Resultados

### 5.2.3. La sobreexpresión del gen *pelota* no induce el mecanismo de NoGo Decay.

Por último quisimos descartar que esta ausencia del mecanismo de NoGo Decay en nuestras células no fuese debido a unos niveles bajos de *pelota*, para lo cual sobreexpresamos nuestra proteína *pelota*. Realizamos una cotransfección de los vectores reporter junto con un plásmido que expresa la proteína de fusión myc – *pelota* (pcDNA 3.1/Zeo (+) myc *pelota*) y su correspondiente vector vacío como control (pcDNA 3.1/Zeo (+)). En la figura 39 podemos ver la comprobación de la sobreexpresión de la proteína mediante Western Blot.



**Figura 39. Sobreexpresión de *pelota*.** La línea celular HEK293 fue cotransfectada con los vectores reporter NoGo así como con el vector vacío (pcDNA 3.1 (+) Zeo) o bien con el vector que codificaba para la proteína *pelota* fusionada con un tag de myc (pcDNA 3.1 (+) Zeo myc *pelota*). 48 horas después de la transfección se recogieron extractos proteicos que se prepararon para Western Blot con anti-*pelota* (panel superior) y anti-GAPDH como control de carga (panel inferior).

Cuando medimos la expresión de luciferasa corregida por  $\beta$ -galactosidasa en células control y transfectadas con *pelota*, encontramos que la sobreexpresión de *pelota* no producía ningún efecto evidente en la expresión de los reporters NoGo, ya que, como se puede ver en la tabla 4, los niveles de expresión de luciferasa son similares a los de las muestras control.

Luc / $\beta$ gal HEK 293	pGL Stop SL	pGL NonStop SL
pcDNA 3.1 (+) Zeo	1,0 $\pm$ 0,12	0,0041 $\pm$ 0,0040
pcDNA 3.1 (+) Zeo myc <i>pelota</i>	1,0 $\pm$ 0,056	0,0011 $\pm$ 0,00009

Tabla 4. Niveles de expresión de luciferasa corregidos por  $\beta$  - gal en las líneas celulares estudiadas y en las distintas cotransfecciones de los vectores control (pGL Stop SL) y reporter (pGL NonStop SL) del sistema NoGo, junto con el vector control (pcDNA 3.1 / Zeo (+)) y el que sobreexpresa *pelota* (pcDNA 3.1 / Zeo (+) myc *pelota*). Los datos se muestran como expresión relativa de los vectores reporter con respecto al control. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recogidas 48 horas después de la transfección.

A continuación quisimos saber si la sobreexpresión de *pelota* tenía algún efecto sobre los niveles de los mRNAs producidos por los vectores reporter NoGo. Para ello, extrajimos RNA de las células transfectadas y realizamos RT-PCR de luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección. Como podemos ver en la figura 40, la sobreexpresión de *pelota* no restaura la actividad de degradación de los mRNAs defectuosos producidos por los vectores reporter, ya que los niveles de expresión de los mRNAs producidos por los vectores reporter son similares a los del control.

Resultados

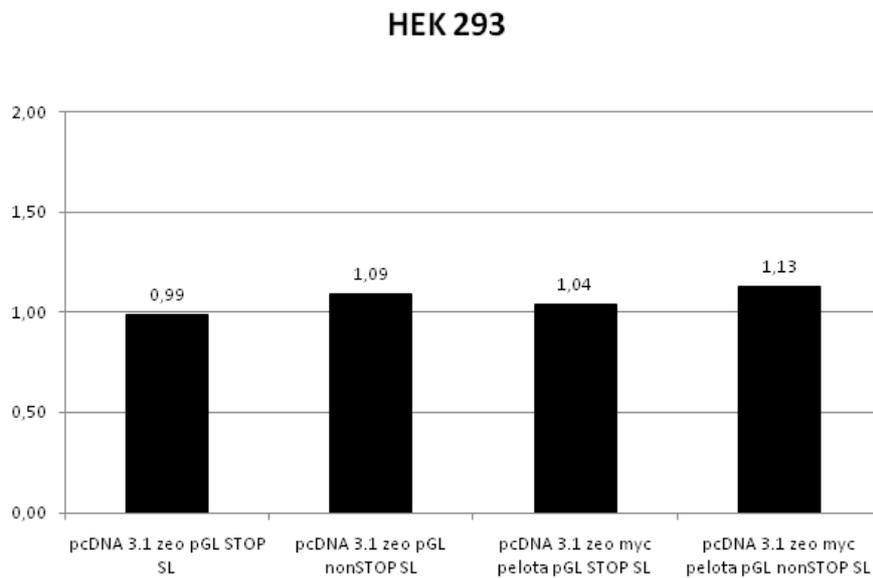
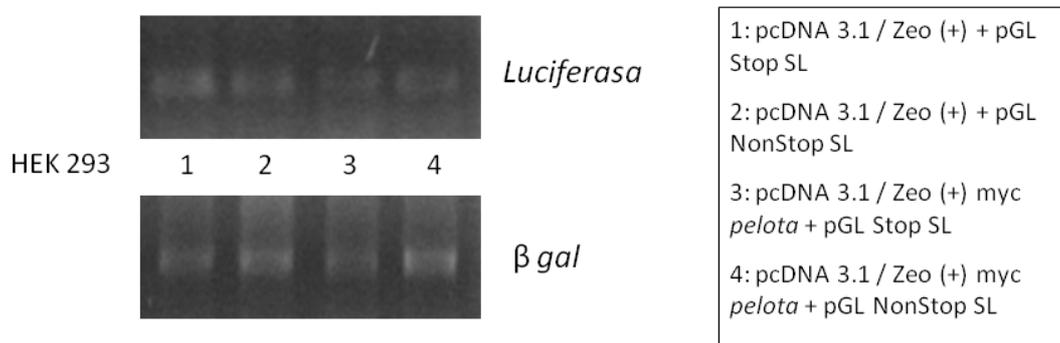


Figura 40. RT – PCR de luciferasa y  $\beta$  galactosidasa y densitometrías de los resultados correspondientes. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio. 48 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras y se realizó una RT-PCR de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa como control de carga. En los paneles superiores se muestran los resultados de la amplificación tras su electroforesis en un gel de agarosa. En la gráfica inferior se muestra la cuantificación del mRNA de luciferasa corregido por  $\beta$ -galactosidasa.

### 5.3. NonStop mRNA Decay.

Al mismo tiempo que empleamos los vectores reporter del mecanismo de NoGo Decay, realizamos los mismo experimentos con otros vectores susceptibles de ser degradados mediante NonStop Decay. En células de mamífero se ha visto que si bien los mRNAs defectuosos carentes de un codón stop en pauta disminuyen su expresión, no son degradados, lo cual sugiere que este mecanismo está ausente en este tipo de organismos. El uso de estos reporter nos permite tener un control del funcionamiento del mecanismo.

#### 5.3.1. No existen evidencias del mecanismo de NonStop Decay en la línea celular humana HEK 293.

Para realizar estos experimentos transfectamos la línea celular HEK 293 mediante el protocolo de fosfato de calcio con los vectores control y reporter del sistema NonStop (pGL Stop y pGL NonStop) junto con el vector pCMV $\beta$ . 48 horas post – transfección recogimos extractos y cuantificamos la expresión de luciferasa por parte de estos vectores, haciendo una corrección de los valores obtenidos con la expresión de  $\beta$  galactosidasa. También recogimos RNA para realizar una RT – PCR para ver los niveles de mRNA de luciferasa y de  $\beta$  galactosidasa. Por último, también recogimos extractos proteicos para estudiar los niveles de expresión de la proteína *pelota*.

En los resultados obtenidos vemos una disminución de la expresión de luciferasa (corregida con  $\beta$  galactosidasa), mientras que a nivel de mRNA no existen diferencias apreciables entre el vector control (pGL Stop) y el vector reporter (pGL NonStop), es decir, que éste no está siendo degradado. Además, la expresión de la proteína *pelota* no varía entre vector control y vector reporter.

5.3.1.1. Los vectores reporter NonStop Decay muestran una disminución importante de la expresión de la proteína luciferasa.

Al igual que en el caso de los reporter NoGo, también quisimos comprobar el funcionamiento del vector reporter del NonStop en la línea celular HEK 293. Como se puede ver en la tabla 5, la expresión proteica dirigida por el vector reporter del NonStop disminuye considerablemente respecto a su control, indicándonos que la expresión de la proteína se ve afectada por la ausencia del codón stop en el vector.

Luc2 / $\beta$ gal HEK 293	pGL Stop	pGL nonStop
pSuper	1,0 $\pm$ 0,073	0,003 $\pm$ 0,003

*Tabla 5. Niveles de expresión de luciferasa corregidos por  $\beta$  – gal en las línea celular HEK 293 transfectada con los vectores control (pGL Stop) y reporter (pGL NonStop) del sistema Non Stop Decay. Los datos se muestran como expresión relativa de los vectores reporter con respecto al control. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recogidas 48 horas después de la transfección.*

5.3.1.2. Los vectores reporter NonStop Decay no muestran disminución a nivel de mRNA.

Tras la cuantificación de los niveles de expresión proteica de luciferasa, analizamos sus niveles de expresión a nivel de mRNA. Las densitometrías correspondientes (figura 41) nos muestran que los niveles de mRNA de luciferasa no varían en cotransfección con los vectores reporter del sistema NonStop, indicándonos que en este caso estos mRNAs defectuosos tampoco están siendo degradados.

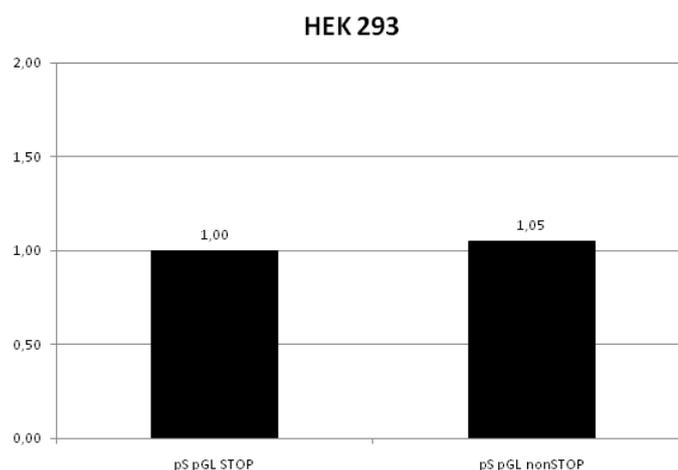
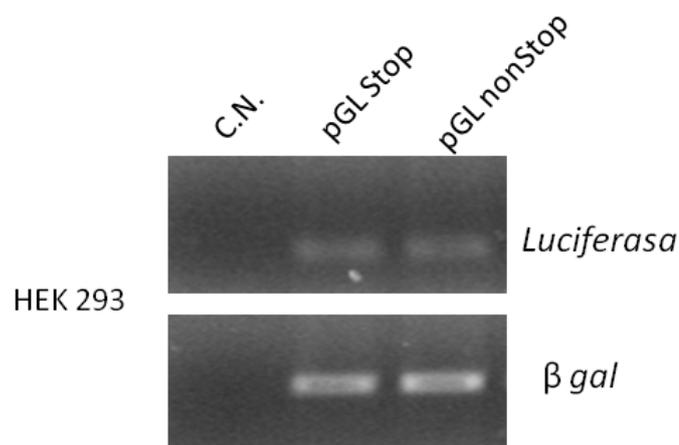
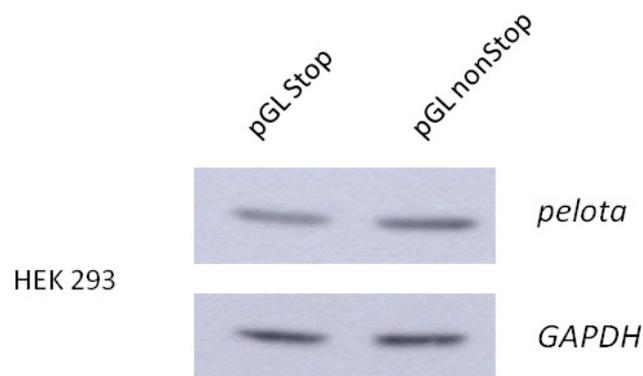


Figura 41. RT - PCRs de luciferasa y  $\beta$  - galactosidasa junto con la densitometría de los resultados correspondientes para las muestras anteriormente mencionadas, en las que los vectores reporter han sido cotransfectados junto con pCMV $\beta$ . La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, mientras que la línea celular HCA2-hTERT fue electroporada usando el Nucleofector Kit V (Amaxa). 48 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras y se realizó una RT-PCR de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa como control de la transfección. En los paneles superiores se muestran los productos de la amplificación tras electroforesis en gel de agarosa. El panel inferior muestra la cuantificación de la expresión de luciferasa corregida por  $\beta$ -galactosidasa.

## Resultados

5.3.1.3. La proteína codificada por el gen *pelota* no se ve afectada aparentemente por los vectores reporter NonStop Decay.

También comprobamos si la transfección de estos vectores tenía alguna influencia en la expresión de la proteína *pelota*. Como se puede ver en la figura 42 la cotransfección de los vectores reporter no afecta a la expresión de la proteína *pelota*.

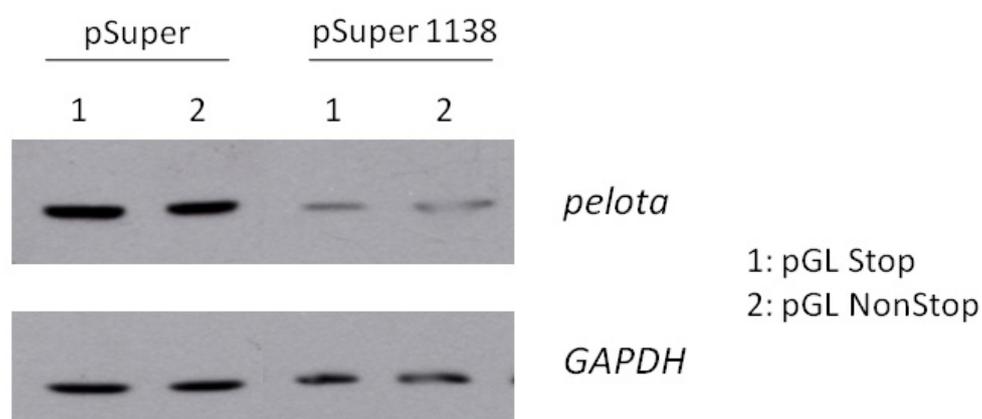


*Figura 42. Western Blot de extractos proteicos obtenidos de la línea celular HEK 293 transfectada. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores indicados en cada caso. Las muestras proteicas fueron recogidas 48 horas después de la introducción de los vectores y preparadas para Western Blot usando anticuerpos anti-*pelota* (panel superior) y anti GAPDH como control de carga (panel inferior).*

5.3.2. La inhibición de la proteína codificada por el gen *pelota* no produce ningún tipo de variación en los vectores reporter NonStop Decay en las líneas celulares estudiadas.

Posteriormente realizamos una cotransfección de los vectores (control y reporter) junto con el vector que codifica para el shRNA que inhibe *pelota*. La disminución de una proteína implicada en el NonStop Decay provocaría la alteración del mecanismo, y consecuentemente de la luciferasa expresada en este caso por el vector reporter, diferencias visibles a nivel de mRNA.

Como podemos ver en la figura 43, el shRNA (shRNA 1138) ha funcionado inhibiendo la expresión de la proteína.



**Figura 43.** Inhibición de *pelota* mediante shRNA en la línea celular HEK 293. Western Blot realizado contra las proteínas indicadas en extractos recogidos con EBC 72 horas después de la transfección. Las células empleadas fueron transfectadas con el vector vacío (pSuper) o bien con el vector que expresa el shRNA contra *pelota* (pSuper 1138).

Sin embargo, según los datos obtenidos, recogidos en la tabla 6, La inhibición de *pelota* no afecta a la disminución de la expresión de los vectores reporter, que sigue siendo la misma tanto en el caso de transfecciones con el vector vacío como con el shRNA. Asimismo analizamos los niveles de mRNA para estudiar la existencia de posibles variaciones. En la figura 44 vemos como, tampoco en este caso, hay diferencias entre el vector reporter y el control.

Resultados

posibles variaciones. En la figura 44 vemos como, tampoco en este caso, hay diferencias entre el vector reporter y el control.

Luc / $\beta$ gal HEK 293	pGL Stop	pGL NonStop
pSuper	1,0 $\pm$ 0,36	0,002 $\pm$ 0,002
pSuper 1138	1,0 $\pm$ 0,16	0,002 $\pm$ 0,002

Tabla 6. Niveles de expresión de luciferasa corregidos por  $\beta$  - gal en las línea celular HEK 293 trasnfectada con los vectores control (pGL Stop) y reporter (pGL NonStop) del sistema NonStop Decay. Los datos se muestran como expresión relativa de los vectores reporter con respecto al control. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recogidas 72 horas después de la transfección.

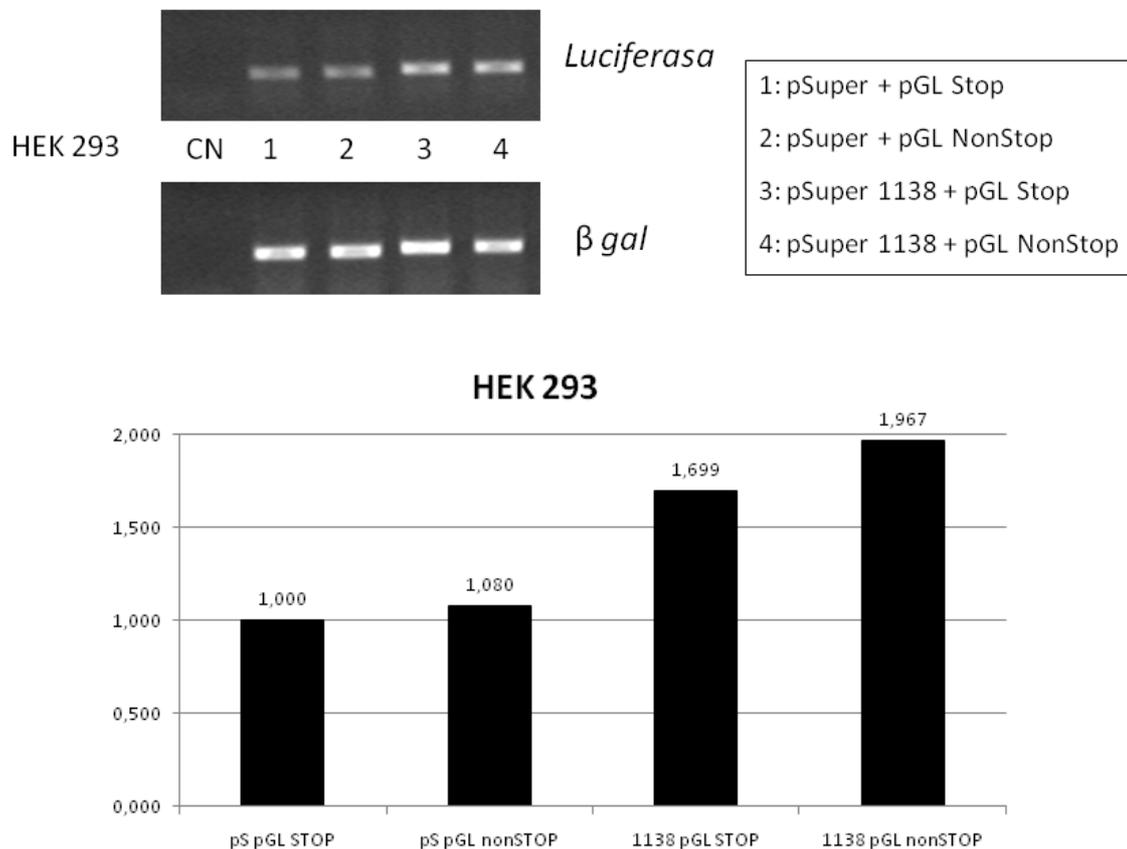


Figura 44. RT - PCR de luciferasa y  $\beta$  - galactosidasa y sus correspondientes densitometrías para las muestras arriba indicadas. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio. 72 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras y se realizó una RT-PCR de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa como control de la transfección. En los paneles superiores se muestran los productos de la amplificación tras electroforesis en gel de agarosa. El panel inferior muestra la cuantificación de la expresión de luciferasa corregida por  $\beta$ -galactosidasa.

### 5.3.3. La sobreexpresión del gen *pelota* no induce el mecanismo de NonStop Decay.

Por último, sobreexpresamos *pelota* empleando un vector que codifica para la proteína de fusión myc – *pelota* (pcDNA 3.1 / Zeo (+) myc *pelota*) y su correspondiente plásmido vacío como control (pcDNA 3.1 / Zeo (+) myc *pelota*), en cotransfección con los vectores reporter del sistema NonStop. En la figura 45 vemos mediante Western Blot la sobreexpresión de la proteína *pelota*.



**Figura 45. Sobreexpresión de *pelota*.** Western Blot de muestras proteicas obtenidas de la línea celular HEK 293 transfectada mediante fosfato de calcio con el vector vacío (pcDNA 3.1 (+) Zeo) o bien con el vector que codificaba para la proteína *pelota* fusionada con un tag de myc (pcDNA 3.1 (+) Zeo myc *pelota*) así como con los vectores NonStop, 48 horas después de la transfección.

En la tabla 7 podemos ver que los resultados obtenidos con estos vectores reporter son similares a los previamente mostrados con los vectores para el sistema NoGo, es decir, los niveles de expresión son similares en control y reporter, indicando que la sobreexpresión de la proteína tampoco produce ningún efecto evidente en la expresión de los vectores NonStop.

En este caso los niveles de expresión de los mRNAs producidos por los vectores reporter son similares a los del control (figura 46), con lo cual la sobreexpresión de *pelota* tampoco restaura la actividad de degradación de los mRNAs defectuosos producidos por los vectores reporter.

Luc / $\beta$ gal	pGL Stop	pGL NonStop
pcDNA 3.1 (+) Zeo	1,0 $\pm$ 0,06	0,0004 $\pm$ 0'000095
pcDNA 3.1 (+) Zeo myc <i>pelota</i>	1,0 $\pm$ 0,086	0,0008 $\pm$ 0,0003

Tabla 7. Niveles de expresión de luciferasa corregidos por  $\beta$  - gal en las línea celular HEK 293 trasfectada con los vectores control (pGL Stop) y reporter (pGL NonStop) del sistema NonStop Decay. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio con los vectores indicados en cada caso, y las muestras fueron recogidas 48 horas después de la transfección.

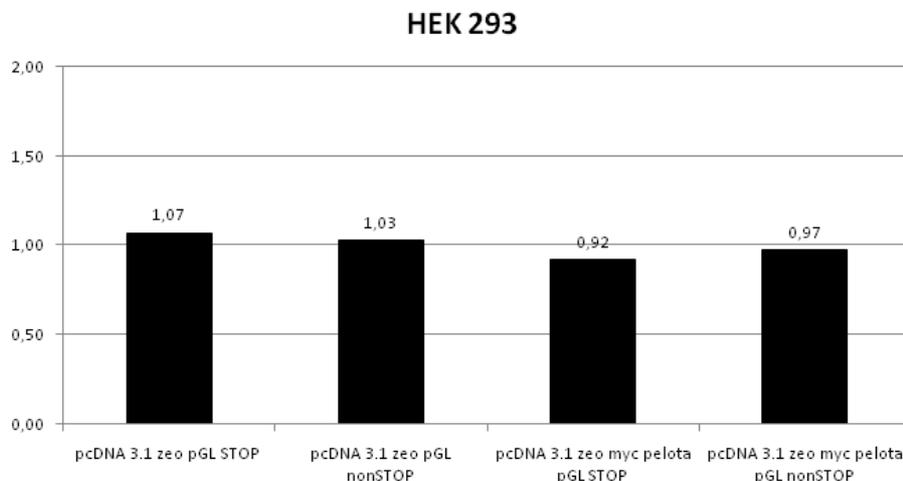
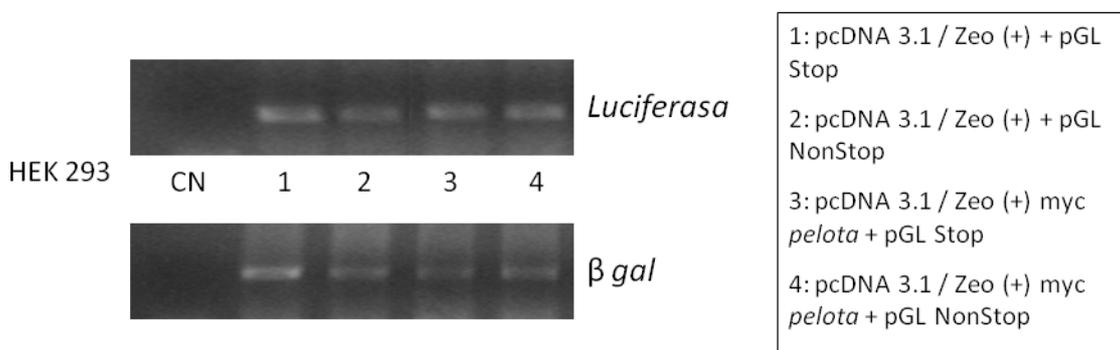


Figura 46. RT - PCR de luciferasa y  $\beta$  galactosidasa y densitometrías de las muestras correspondientes. La sobreexpresión de *pelota* no produce ningún efecto evidente en la expresión de los reporters NonStop a nivel de mRNA. La línea celular HEK293 fue transfectada mediante fosfato de calcio, mientras que la línea celular HCA2-hTERT fue electroporada usando el Nucleofector Kit V (Amaxa). 48 horas después de la introducción de los vectores se extrajo RNA de cada una de las muestras y se realizó una RT-PCR.

## 6. Proteómica.

Para estudiar la existencia de determinadas proteínas que interaccionen con *pelota*, lo cual nos podría acercar más al conocimiento de su función celular, realizamos en primer lugar una inmunoprecipitación contra nuestra proteína, usando un anticuerpo específico. Para ello usamos 5 mg totales de extracto proteico en cada caso, con 1  $\mu$ g de cada anticuerpo; inespecífico (anti rabbit IgG, Sigma) y específico (anti PELO); siguiendo el protocolo indicado. Las muestras inmunoprecipitadas fueron separadas mediante electroforesis en un gel acrilamida – bisacrilamida, que fue teñido con plata. Las bandas en donde existían diferencias apreciables entre el control y la muestra fueron recortadas (figura 47) y enviadas para su análisis posterior mediante MALDI – TOF en el CIC de Salamanca.

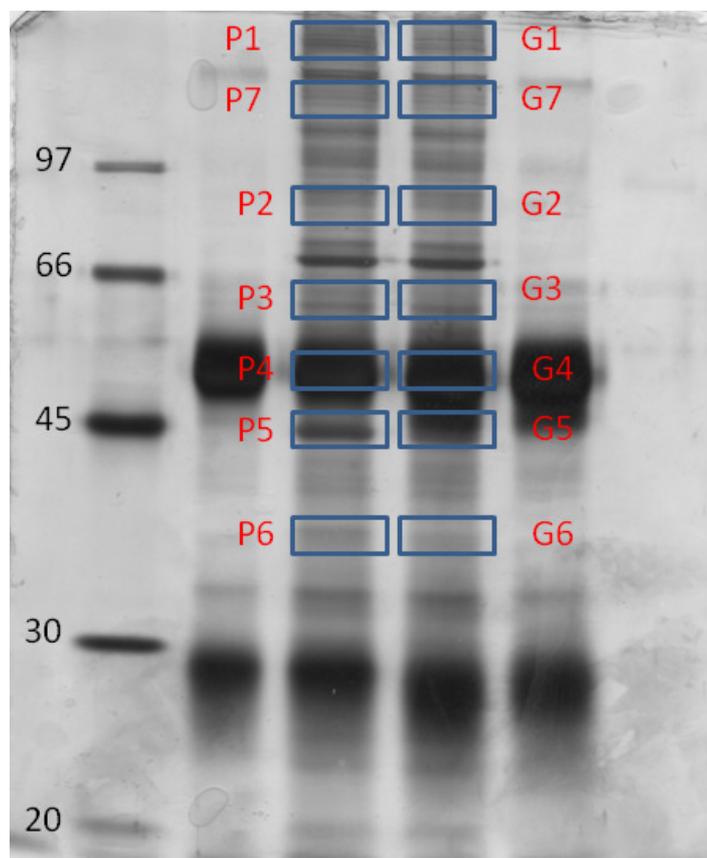


Figura 47. Gel de acrilamida – bisacrilamida teñido con plata. Se realizó una inmunoprecipitación de extractos proteicos de la línea celular HEK 293 con un anticuerpo específico para *pelota* y otro inespecífico de control. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida-bisacrilamida que posteriormente fue teñido con plata. Las bandas marcadas han sido recortadas del gel y analizadas. A la izquierda, marcador de peso molecular con los pesos indicados.

## Resultados

El análisis de los datos obtenidos mediante MALDI – TOF, se llevó a cabo empleando bases de datos (MASCOT y SwissProt). Comparamos los picos peptídicos y las proteínas a las que correspondían de aquellos que mostraron unos valores significativos, entre el control inmunoprecipitado con el anticuerpo inespecífico y la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo específico anti – *pelota*.

Las bandas P4 y G4 se correspondían con la cadena pesada del anticuerpo utilizado, y fueron empleadas como control a la hora de realizar el análisis. La banda P5 presenta diversos péptidos correspondientes al homólogo humano de la proteína *pelota*, como cabría esperar, lo que nos demuestra que nuestro anticuerpo inmunoprecipita correctamente la proteína *pelota*. La identificación proteica llevada a cabo, nos da como resultados más relevantes la detección de HSP90 (Heat Shock Protein 90) en la banda P2, y de un homólogo humano de la proteína SEC16 de levaduras, KIAA0310p, que aparece en la banda P1.

Los fragmentos peptídicos identificados con valor significativo (superior a 65) fueron los siguientes:

En la banda P1:

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">BAA20769</a>	256699	74	AB002308 NID: - Homo sapiens

En la banda P2:

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">AAH09206</a>	75088	90	BC009206 NID: - Homo sapiens
2. <a href="#">AAF82792</a>	73170	88	AF275719 NID: - Homo sapiens
3. <a href="#">HS90B_HUMAN</a>	83423	78	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (HSP 90). - Homo sapiens (Human).
4. <a href="#">CAI20095</a>	83554	76	AL139392 NID: - Homo sapiens
5. <a href="#">HHHU84</a>	83584	75	heat shock protein 90-beta [validated] - human

6. [E980235](#) 83529 75 H.SAPIENS HSP90 SEQUENCE.- Homo sapiens (Human) .
7. [T46243](#) 85189 74 hypothetical protein DKFZp761K0511.1 - human

En la banda P5:

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="#">AAM89414</a>	43806	217	AY117399 NID: - Homo sapiens
2.	<a href="#">AAD27726</a>	43700	204	AF132951 NID: - Homo sapiens
3.	<a href="#">AAG22574</a>	43926	200	AF139828 NID: - Homo sapiens



# V. DISCUSIÓN

*“La reflexión calmada y tranquila desenreda  
todos los nudos”*

*Harold MacMillan*



El gen *pelota* fue descubierto en un screening basado en el elemento P en busca de mutantes machos estériles en *Drosophila melanogaster*. Mediante el aislamiento y análisis del cDNA de *pelota*, se hallaron múltiples homólogos en distintos organismos, entre ellos destaca *Dom34*, el homólogo de *pelota* en *Saccharomyces cerevisiae*, el más estudiado hasta el momento. Nosotros estábamos interesados en su homólogo en mamíferos, para lo cual nos propusimos estudiar la función de *pelota* en células humanas.

El estudio de la función de la proteína *pelota* humana fue llevado a cabo en distintas líneas celulares. En primer lugar empleamos HEK293, células embrionarias humanas de riñón transformadas con DNA del adenovirus tipo 5 y SaOS2, línea celular derivada de osteosarcoma humano, ambas caracterizadas por su facilidad para ser transfectadas con diversas técnicas y usadas de rutina en ensayos celulares. Teniendo estas células distinto origen nos permite ver el comportamiento de nuestra proteína en distintas líneas. Sin embargo, no dejan de ser líneas celulares humanas inmortalizadas, que presentan diversas alteraciones a nivel celular que desconocemos si podrían llegar a afectar a nuestro estudio. Para ello empleamos paralelamente otra línea celular, HCA2-hTERT, fibroblastos embrionarios humanos inmortalizados mediante la expresión ectópica del gen de la telomerasa, lo cual permite la restauración de la actividad de esta transcriptasa reversa, que no tiene un origen tumoral, y de la cual se ha comprobado mantiene sus características celulares normales.

Una de las herramientas usadas en este estudio ha sido la inhibición de RNA, que ha demostrado ser muy útil en otros muchos estudios relacionados con la función de los genes. La gran mayoría de los métodos empleados para realizar inhibición de RNA se basan en la introducción de pequeños RNAs bicatenarios, que evitan el mecanismo de respuesta del interferón, característico de células de mamífero, el cual tiene como consecuencia una inhibición general de la síntesis proteica. Los siRNAs pueden ser introducidos en células de mamífero usando una amplia variedad de métodos. En el caso de los sintetizados química o enzimáticamente *in vitro* pueden ser introducidos mediante métodos de transfección física (introducción exógena). De un modo alternativo, los siRNAs pueden ser expresados endógenamente mediante

## Discusión

casetes de expresión adecuados. Estas estrategias requieren de vectores basados en DNA o RNA y dependen de métodos de transferencia génica que incluyen métodos físicos o infección viral. La fuerza y la duración del silenciamiento vienen determinadas por varios factores como son la eficiencia de transfección, la cantidad de siRNA introducido y el potencial de cada siRNA a la hora de suprimir el gen objetivo, es decir, su potencia. Para llevar a cabo este estudio empleamos un vector de expresión en mamíferos que presenta en su estructura el promotor de la polimerasa III – H1 – RNA. Mediante este vector dirigimos la expresión de shRNAs, pequeños RNAs que se caracterizan por presentar una estructura en horquilla, que son procesados intracelularmente para dar lugar a siRNAs (pequeños RNAs de interferencia), y que van dirigidos a inhibir la proteína de interés mediante el mecanismo de interferencia de RNA. Para ello, diseñamos varios shRNAs para inhibir la proteína *pelota* dirigidos contra distintas regiones de la secuencia codificante de la misma. Mediante transfección transitoria y análisis de los niveles de expresión de la proteína mediante Western Blot, comprobamos el funcionamiento correcto de los RNAs inhibiendo la proteína. En estos ensayos pudimos comprobar cómo uno de los shRNAs diseñados inhibía efectivamente la expresión de la proteína *pelota*, y cómo la acción de los shRNAs manifestaba su máxima actividad a tiempos relativamente cortos, 48 horas después de realizar la transfección. Esta brevedad en el tiempo de acción puede estar relacionada con la vida media de la proteína. Previamente al uso de estos vectores, empleamos otro modo de introducción de los siRNAs dentro de las células. Para ello utilizamos siRNAs sintéticos (SMARTpool, Dharmacon), consistentes en un *pool* de cuatro siRNAs sintéticos distintos dirigidos contra un mismo gen en una combinación que simula la ruta natural de silenciamiento, lo cual presenta múltiples ventajas. Estos siRNAs fueron seleccionados usando un algoritmo que identifica los siRNAs con una mayor probabilidad de dirigir un silenciamiento génico potente y específico. Esta combinación de siRNAs seleccionados en un único *pool*, en teoría aumenta la probabilidad de la reducción de los niveles del mRNA objetivo. Sin embargo, en nuestro caso, estos siRNAs sintéticos no parecieron funcionar muy bien, ya que no se observaban diferencias en la expresión proteica de *pelota* entre el siRNA y el control después de la introducción del mismo.

Estudios previos de los homólogos de *pelota* en distintos organismos revelaron la influencia del gen en el crecimiento celular. En el caso de *D. melanogaster*, organismo en el que fue descrito *pelota* por primera vez, su papel está relacionado con la meiosis, ya que su ausencia provoca un fallo en la división meiótica normal, en concreto en lo que se denomina, por analogía con la mitosis, la transición G2/M meiótica. El fenotipo producido por la ausencia de la misma es similar a los fenotipos producidos por la ausencia de otros genes como *twine*, *string* o *roughex*. *Twine* y *string* son homólogos en *D. melanogaster* de *cdc25* de *S. pombe*, una fosfatasa conocida reguladora del ciclo celular, cuyas similitudes en fenotipo se dan en relación a los principales eventos que suceden en la meiosis, como son la condensación de cromosomas, que se produce de forma parcial; la rotura de la envoltura nuclear, la cual permanece intacta en estos mutantes; y la formación del huso, que nunca se llega a observar, ya que aunque los centrosomas se separan no se completa su migración, y los microtúbulos permanecen en el citoplasma. El fenotipo que aparece en cuanto al desarrollo del ojo en *D. melanogaster* ante la falta de *pelota* se asemeja al producido por la ausencia del gen *roughex*, regulador de la meiosis II. En el caso de *Dom34*, el homólogo en levaduras, la ausencia de este gen produce defectos tanto en el crecimiento como en la proliferación celular, tanto a nivel de mitosis como de la división meiótica. En mamíferos, en donde fue imposible obtener suficiente información de un *knockout* de ratón para este gen debido a la letalidad embrionaria de los mismos, provocada por un defecto de proliferación, se vio que *pelota* es necesario para que tenga lugar una división mitótica normal y para el desarrollo embrionario temprano en el ratón. El análisis en detalle de los embriones homocigotos reveló que presentaban cantidades anormales de DNA, aneuploidías y poliploidías (sobre todo tetraploidías). Estas cantidades anormales de DNA pueden ser debidas a una detención del ciclo celular en la transición G2/M, tras la cual se iniciaría un nuevo ciclo celular que produciría la multiplicación de las cantidades de DNA.

Por ello comenzamos nuestro estudio analizando la posible función de *pelota* en la regulación del ciclo celular. En primer lugar analizamos la expresión a lo largo del ciclo, para ver si su expresión variaba en alguna etapa determinada en la cual pudiera cumplir su posible función. Sin embargo, los niveles de expresión de nuestra proteína

## Discusión

se mantenían en rangos similares en las distintas fases del ciclo celular. Usando los shRNAs mencionados anteriormente nos propusimos inhibir la expresión de *pelota* para ver si la ausencia de la proteína manifestaba sus efectos a nivel de la regulación del ciclo celular. Esperábamos encontrar en tal caso una detención del ciclo celular en alguna fase determinada del ciclo, en concreto en la transición G2/M, teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en otros organismos. Sin embargo, el ciclo celular no se veía alterado con la inhibición de *pelota*, lo cual nos lleva a deducir que *pelota* no tiene una implicación directa en la regulación del ciclo celular, si bien hay que tener en cuenta que la inhibición de *pelota* lograda con el shRNA en estos experimentos no era total, sino que se situaba en torno a una reducción del 60% de la expresión de la proteína.

Otro de los aspectos estudiados fue la localización intracelular de la proteína, ya que ésta podría darnos indicios acerca de su función celular. Por una parte, hay que tener en cuenta que *pelota* presenta una posible señal de localización nuclear (PRKRK), presente en los distintos homólogos, y que en el caso de *D. melanogaster* ha demostrado no ser necesaria para que *pelota* pueda llevar a cabo su función. Por otra parte, Sallam ha descrito en su tesis una localización citoplasmática de la proteína, que en caso de células ES aparece localizada en el centrosoma. Esta última localización también sería compatible con un posible papel de *pelota* en la regulación de la traducción, dada su homología con eRF1, o bien en mecanismos de control de calidad del mRNA como es el caso de su homólogo en levaduras, *Dom34*. Para llevar a cabo este estudio realizamos una serie de inmunofluorescencias en las distintas líneas celulares previamente mencionadas. Para ello empleamos un anticuerpo antiPELO, que reconoce específicamente la proteína y que había demostrado ser eficaz en Western Blot, así como unas proteínas de fusión que expresan GFP-*pelota* y CFP-*pelota*. En ambos casos hemos visto como la localización intracelular de *pelota* es claramente citoplasmática, excuyendo núcleo de un modo permanente, y aunque en el caso de las proteínas de fusión aparecen ciertos acúmulos en el citoplasma, éstos no colocalizan en un punto concreto como pudiera ser el centrosoma u otra estructura celular. Esto nos sugiere que posiblemente los datos obtenidos por Sallam, de localización centrosomal se refieren de un modo particular a las células ES. En todo

caso, la presencia de la proteína en el citoplasma sigue siendo compatible con una posible función en la regulación de los mRNAs, y puede ser que bajo determinadas condiciones o programas celulares la proteína llegue a localizar en un orgánulo concreto, aunque no aparezca de modo constitutivo en las líneas celulares estudiadas.

En la estructura de *pelota* se diferencian dos regiones que presentan similitud con una serie de motivos conservados. En primer lugar, existe una región que presenta una alta similitud con la subunidad I del factor de liberación eucariótico (eRF1). Esta familia de proteínas está implicada en mecanismos de terminación de la traducción en la síntesis de proteínas. Por otra parte, existe un motivo putativo de zipper de leucina en el extremo C-terminal de la proteína. Los zippers de leucina se supone que son mediadores de las interacciones proteína-proteína en distintos grupos de proteínas que no están relacionadas funcionalmente. Durante el proceso de traducción de proteínas en eucariotas, eRF1 reconoce los tres codones de terminación, y actúa conjuntamente con eRF3, que carece de actividad de reconocimiento de codones, pero que interactúa con eRF1 estimulando su actividad en un proceso mediado por GTP. El homólogo más estudiado de *pelota*, *Dom34* de *S. cerevisiae*, mantiene algunas características de similitud con eRF1 y se ha visto que está implicada en el NoGo Decay, un sistema de control de calidad del mRNA descrito recientemente que se encarga del reconocimiento y degradación de los mRNAs defectuosos que presentan alguna alteración en su estructura capaz de producir la detención del ribosoma encargado de la traducción, lo cual es considerado el desencadenante de este mecanismo. Durante el funcionamiento de este mecanismo, *Dom34* interacciona con una proteína denominada Hbs1, que a su vez presenta una región con similitud a una proteína G, y otra con similitud con eRF3. Este complejo parece ser el responsable del inicio de la degradación del mRNA defectuoso mediado por este sistema, que se inicia por la rotura endonucleolítica del mRNA. Estudios referentes a la estructura cristalina de *Dom34* han demostrado su actividad endonucleolítica *in vitro*, lo cual sugiere que *Dom34* es la endonucleasa responsable de la primera rotura del mRNA. Si bien este mecanismo ha sido demostrado en levaduras, se desconoce si existe en otro tipo de organismos, ya que podría tratarse de un mecanismo característico de organismos inferiores, como es el caso del NonStop Decay. La proteína *pelota* humana mantiene la

## Discusión

región de homología con eRF1 al igual que sus homólogos en otros organismos, sin embargo, si estudiamos su secuencia en detalle, vemos que carece del motivo GGQ presente en eRF1, responsable de la actividad de liberación de la misma durante el proceso de traducción de los mRNAs. Por ello, teniendo en cuenta la función recientemente descrita de *Dom34* en *S. cerevisiae*, y el alto grado de homología con la proteína humana nos interesaba comprobar si en células humanas *pelota* llevaba a cabo la misma función que su homólogo en levaduras, bien sea en el mecanismo de NoGo Decay o bien en cualquiera de los otros mecanismos de control de calidad del mRNA ya descritos.

En primer lugar empleamos unos vectores reporter que expresaban GFP y que habían sido diseñados para identificar el NonSense Mediated mRNA Decay (NMD) en células de mamífero. El vector mencionado consiste en un constructo realizado a partir del minigen del receptor  $\beta$  de las células T, en el cual el ORF de GFP está insertado de forma en que el codón stop del GFP es reconocido como un codón prematuro de terminación de la transcripción (PTC). El mRNA resultante de este constructo, será por lo tanto susceptible al mecanismo de NMD, lo que debería dar lugar a su degradación y por tanto a unos niveles bajos de mRNA, unos niveles bajos de proteína y un nivel bajo de fluorescencia verde en células normales, competentes para NMD, que expresen este gen reporter. Como control positivo que comparar con *pelota* usamos el gen *Upf1*, descrito como componente principal del complejo requerido en los distintos organismos estudiados en los que se ha visto este mecanismo. Si bien en un primer momento, ante la inhibición del gen *pelota* parecía que veíamos una disminución de la fluorescencia en comparación con el control, lo que indicaría la implicación de *pelota* en este mecanismo, estos resultados no fueron reproducibles, obteniendo distintos resultados en experimentos sucesivos. Esto se puede achacar al funcionamiento del reporter, que puede no fuera correcto, teniendo en cuenta que realizamos estos experimentos mediante transfección transitoria, mientras que cuando fue descrito el reporter lograban clones estables que expresaban estos vectores en la línea celular HeLa.

Otro de los mecanismos estudiados fue el NonStop mRNA Decay. Este mecanismo fue descrito inicialmente en levaduras, pero se ha demostrado su

existencia tanto en bacterias como en eucariotas. Sin embargo, en células de mamífero no funciona del mismo modo, ya que si bien se observa una disminución de los niveles de expresión de la proteína codificada por los mRNAs NonStop, estos mRNAs no son degradados y se almacenan en la fracción polisomal. Para estudiar estos dos últimos mecanismos (NonStop; NoGo) empleamos unos vectores reporter que expresan una luciferasa con la expresión mejorada por la optimización de codones. En el caso del vector reporter para el sistema NoGo, éste presenta en su estructura una horquilla muy estable, capaz de detener al ribosoma encargado de la traducción, lo cual desencadena el mecanismo que tiene como consecuencia la degradación del mRNA defectuoso. El vector reporter para el NonStop carece de codón stop en pauta, lo que es el desencadenante demostrado de este sistema. En el caso del sistema NonStop pudimos comprobar cómo se reproducían los resultados obtenidos previamente en células de mamífero, ya que en los experimentos realizados en nuestras líneas celulares se observaba la disminución de la expresión de la proteína codificada por el vector reporter respecto a su control, es decir que estos mRNAs defectuosos son detectados como tales. Sin embargo, a la hora de analizar los niveles de mRNA de la proteína en cuestión, vimos como se mantenían estables, es decir, que no estaban siendo degradados por este mecanismo pese a ser reconocidos como defectuosos. Dado que nuestro sistema corroboraba lo anteriormente descrito en cuanto al mecanismo de NonStop mRNA Decay para células de mamífero, estos resultados nos servirían para comparar con los resultados obtenidos estudiando el último de los sistemas de control de calidad del mRNA, el denominado NoGo Decay. La aproximación para el estudio del NoGo Decay en nuestras células fue realizada de forma similar. En principio parecía más factible que *pelota* pudiese estar implicada en este sistema, teniendo en cuenta el papel fundamental desempeñado por *Dom34* en este sistema en *S. cerevisiae*, ya que ha sido demostrada tanto su implicación en el mecanismo mediante la interacción con Hbs1 como su actividad endonucleolítica *in vitro*. En primer lugar comprobamos el funcionamiento de este sistema de reporters en nuestras líneas celulares, en donde vimos que la expresión de luciferasa codificada por el vector reporter disminuía respecto a su control y la expresión de *pelota* no se veía afectada por los mismos. A continuación realizamos cotransfecciones de estos vectores reporter junto con el vector que expresa el shRNA contra *pelota* para ver si la

inhibición de la proteína, es decir, su ausencia, manifiesta algún tipo de influencia en la expresión de los vectores reporter, lo que implicaría a *pelota* en el sistema. Si *pelota* estuviese implicada en el sistema esperaríamos ver un aumento de la expresión de luciferasa en las células en donde hayamos realizado la inhibición respecto a su control. Resultado de estos experimentos pudimos comprobar cómo la inhibición de *pelota* no producía variaciones en la expresión del vector reporter, y que tanto en unos como en otros, no se producen variaciones en la tasa de degradación de los mRNAs defectuosos. En última instancia nos preguntamos si esta ausencia de respuesta podría deberse a unos niveles de expresión bajos de *pelota*, que quizá aumente su expresión ante determinadas circunstancias del metabolismo celular, en las cuales, por ejemplo, fuese más probable la producción de mRNAs defectuosos. Para comprobar que esto no fuera así llevamos a cabo la sobreexpresión de *pelota* en estas mismas líneas celulares, usando para ello un vector de expresión en eucariotas que producía la proteína *pelota* unida a una cola de myc (*myc pelota*). En este caso los resultados obtenidos fueron los mismos, y la expresión de luciferasa no sufría variación alguna en las muestras en las que había *pelota* sobreexpresada.

Por lo tanto en nuestras células humanas parece no estar presente el mecanismo de control de calidad del mRNA denominado NoGo Decay. Puede ser que este mecanismo esté presente tan sólo en organismos inferiores, como es el caso de levaduras en donde ha sido descrito o al igual que sucede con el sistema NonStop, y que en organismos superiores existan otro tipo de sistemas que controlen la calidad del mRNA, en los cuales pudiera estar implicado *pelota*. Sin embargo, los resultados obtenidos en relación a los sistemas de control de calidad del mRNA pueden deberse a los niveles de inhibición de la proteína *pelota*. Si bien los shRNAs empleados han demostrado funcionar inhibiendo la expresión de la proteína, no hemos conseguido una inhibición total de la misma, situándose en torno a un 60%. Los niveles residuales de *pelota*, que continúa expresándose aunque de forma reducida podrían ser suficientes para que *pelota* estuviese realizando su función normalmente, y tal vez los efectos esperados sólo sean observados con una inhibición total de la expresión proteica de *pelota*. Otra posibilidad que no podemos descartar es que el mecanismo

NoGo sea específico de determinados tipos celulares, si bien en las distintas líneas celulares en las que se ha realizado el estudio obtuvimos idénticos resultados.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la estructura de nuestros vectores reporter también podría haber afectado negativamente a nuestros resultados. En primer lugar, puede que los mRNAs producidos por nuestros vectores reporter no funcionen como mRNA NoGo en las líneas celulares estudiadas, ya que la horquilla puede no funcionar como tal en células de mamífero pese a sí hacerlo en levaduras, en donde se ha comprobado que produce la detención del ribosoma durante el proceso de elongación de la traducción. En la estructura de nuestros vectores reporter cabe destacar que la horquilla se halla situada downstream del codón stop, y éste ha sido mutado para permitir que continúe la lectura a través del mismo, mientras que en el estudio de Doma y Parker, en el que fue descrito el mecanismo de NoGo Decay en levaduras, la horquilla estaba situada antes del codón stop, que funcionaba normalmente. Esto nos plantea varios problemas, ya que en primer lugar el mRNA producido por nuestros vectores reporter podría ser susceptible de ser degradado por el mecanismo de NonStop Decay en vez del NoGo Decay, y ya ha sido descrita la ausencia de este mecanismo en células de mamífero. Además, la proteína luciferasa que cuantificamos podría estar siendo producida de forma aberrante, fusionada a secuencias adicionales de aminoácidos codificados por la horquilla, dando lugar a una proteína inestable o simplemente no activa enzimáticamente, lo cual podría ser el causante de la inhibición de la expresión del vector reporter con respecto a su control.

Por todo esto sería interesante realizar estos experimentos empleando unos vectores reporter que presentaran una organización similar a los utilizados por Doma y Parker en su estudio, es decir, que presentasen un codón stop funcional detrás de la horquilla. Ello nos permitiría contar con unos mRNAs que se comportasen como NoGo para analizar su comportamiento en nuestras células de mamífero. Además, sería interesante comprobar que un vector con una estructura de este tipo en horquilla funciona en células de mamífero del mismo modo que en levaduras, inhibiendo la elongación de la traducción mediante la detención del ribosoma.

## Discusión

Mediante el uso de técnicas de proteómica pretendíamos identificar las proteínas o péptidos que estuviesen interaccionando con *pelota* en nuestras células, lo cual nos permitiría relacionarla con su función. Para ello inmunoprecipitamos con un anticuerpo específico contra *pelota* (antiPELO) y recortamos las bandas que presentaban diferencias respecto al control en el gel de poliacrilamida usado para separar las muestras, posteriormente teñido con plata. Estas bandas fueron analizadas mediante MALDI-TOF. Este análisis nos permite identificar los péptidos presentes en la muestra y las proteínas a las que pertenecen, que son las que se encontrarían en la muestra resultante de la inmunoprecipitación debido a su interacción con *pelota*. Sin embargo, los resultados obtenidos no arrojan mucha luz al respecto, ya que los elementos proteicos identificados no parecen ser específicos de la función de *pelota*. Por una parte se identificaron diversos péptidos componentes de Hsp90 (Heat Shock Protein 90), una proteína que pertenece a un grupo de proteínas implicadas en dirigir el plegamiento de las proteínas y el control de su calidad dentro de la célula. Hsp90 está implicada en numerosas funciones dentro de la célula, entre las que se encuentran la respuesta a estrés y los mecanismos de control homeostático normal de la célula, interaccionando para ello con numerosas proteínas, como proteínas kinasas, factores de transcripción y otras, facilitando su estabilización o activación, o bien dirigiéndolas a la degradación mediante proteosoma. Con estos medios, Hsp90 muestra una habilidad para regular la transducción de señal, la regulación transcripcional, la remodelación de la cromatina y la regulación epigenética, el desarrollo y la evolución morfológica. La otra proteína identificada ha sido un homólogo humano de la proteína SEC16 de levaduras, KIAA0310p. En mamíferos se ha visto que esta proteína está implicada en el tráfico de membrana desde el retículo endoplasmático, mediante la formación de lugares de salida en el RE.

Sería interesante de cara al futuro encontrar alguna proteína que interaccionase con *pelota*, dado que ya se ha visto en múltiples ocasiones la utilidad de la identificación de interacciones proteicas a la hora de acercarse a la identificación de la función proteica, por ejemplo mediante el ensayo de doble híbrido, al permitir una aproximación útil a la red proteica celular en la que puede estar implicada una

proteína, y por lo tanto a la función que puede estar representando dentro de la célula.



## VI. CONCLUSIONES

*“Lo poco aprendido carece de valor, comparado con lo que ignoro y no desespero aprender”*

René Descartes



1. La proteína *pelota* humana no parece tener relación con la regulación del ciclo celular en las líneas celulares estudiadas.
2. La proteína *pelota* humana localiza intracelularmente de forma constitutiva en el citoplasma de las líneas celulares estudiadas.
3. La señal de localización nuclear presente en *pelota* humana no es necesaria para su función en las líneas celulares humanas estudiadas.
4. El mecanismo NonStop mRNA Decay no está presente en nuestras líneas celulares humanas.
5. La proteína *pelota* humana no está implicada en el mecanismo de NoGo mRNA Decay.
6. El mecanismo NoGo mRNA Decay parece no existir en células de mamífero, en concreto en las líneas celulares humanas estudiadas, y la manipulación de los niveles de *pelota* no altera el manejo de los mRNAs con grandes bloqueos en su traducción.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

*"No existen más que dos reglas para escribir: tener algo que decir  
y decirlo"*

*Oscar Wilde*



- **Abo, T. et al.** (2000). SsrA – mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of lac operon. *EMBO J.* Vol. 19: 3762 – 3769.
- **Adham, I.M. et al.** (2003). Disruption of the *Pelota* gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 23 (4): 1470 – 1476.
- **Agami, R.** (2002). RNA and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 829 – 834.
- **Akimitsu, N.; Tanaka, J. and Pelletier, J.** (2007). Translation of nonstop mRNA is repressed post – initiation in mammalian cells. *EMBO J.* Vol. 26: 2327 – 2338.
- **Akimitsu, N.** (2008). Messenger RNA surveillance systems monitoring proper translation termination. *J. Biochem.* Vol. 143: 1 – 8.
- **Amrani, N.; Sachs, M. S. and Jacobson, A.** (2006). Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* Vol. 7: 415 – 425.
- **Anders, K. R.; Grimson, A. and Anderson, P.** (2003). SMG – 5, required for *C. elegans* nonsense – mediated mRNA decay, associates with SMG – 2 and protein phosphatase 2A. *EMBO J.* Vol. 22: 641 – 650.
- **Araki, Y. et al.** (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3' to 5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* Vol. 20 (17): 4684 – 4693.
- **Arellano, M. and Moreno, S.** (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Vol. 29: 559 – 573.
- **Badis, G. et al.** (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation – independent decapping. *Mol. Cell.* Vol. 15: 5 – 15.
- **Bartel, B. and Bartel, D. P.** (2003). MicroRNAs: at the root of plant development?. *Plant. Physiol.* Vol. 132: 709 – 717.
- **Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* Vol. 116: 281 – 297.
- **Behm – Ansmant, I. et al.** (2007). mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett.* Vol. 581: 2845 – 2853.

- **Bennett, C.F. et al.** (1998). Structural requirements for cationic lipid mediated phosphorothioate oligonucleotides delivery to cells in culture. *J. Drug Target.* 5(3):149-62.
- **Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M. and Hannon, G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* Vol. 409: 363 – 366.
- **Bernstein, E.; Denli, A.M. and Hannon, G.J.** (2001). The rest is silence. *RNA.* 7: 1509 – 1521.
- **Bloch - Qazi, M. C. et al.** (2003). The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology.* Vol. 256: 195 – 211.
- **Bodnar, A. G. et al.** (1998). Extension of life – span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* Vol. 279: 349 – 352.
- **Bosher, J.M. and Labouesse, M.** (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* Vol.2: E31 – E36.
- **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Vol. 72: 248-54.
- **Brantl, S.** (2002). Antisense – RNA regulation and RNA interference. *Biochim. Biophys. Acta.* 1575: 15 – 25.
- **Brenner, S. et al.** (1967). UGA: a third nonsense triplet in the genetic code. *Nature.* Vol. 213: 449 – 450.
- **Brown, C. E. et al.** (1996). PAN3 encodes a subunit of the Pab 1p – dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 16: 5744 – 5753.
- **Brummelkamp, T.R.; Bernards, R. and Agami, R.** (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus – mediated RNA interference. *Cancer cell.* Vol. 2: 243 – 247.
- **Brummelkamp, T.R.; Bernards, R. and Agami, R.** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* Vol. 296: 550 – 553.

- **Cali, B. M. et al.** (1999). Smg – 7 is required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. Vol. 151: 605 – 616.
- **Carr – Schmid, A. et al.** (2002). Novel G – protein whose requirement is linked to the translational status of the cell. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 22 (8): 2564 – 2574.
- **Carthew, R.W.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol. 13(2): 244-8.
- **Castrillon, D.H. et al.** (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male – sterile mutants generated by single *P* element mutagenesis. *Genetics*. Vol. 135: 489 – 505.
- **Cerutti, H.** (2003). RNA interference: travelling in the cell and gaining functions?. *TRENDS in genetics*. Vol. 19 (1): 39 – 46.
- **Chen, C. and Okayama, H.** (1987). High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7, 8: 2745 – 2752.
- **Chiu, S. Y. et al.** (2003). Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA*. Vol. 9: 77 – 87.
- **Chomzynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-158.
- **Clement, S. L. And Lykke – Andersen; J.** (2006). No mercy for messages that mess with the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol. 13 (4): 299 – 301.
- **Conti, E. and Izaurralde, E.** (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol. 17 (3): 316 – 325.
- **Craigen, W.J. et al.** (1985). Bacterial peptide chain release factors: conserved primary structure and possible frame shift regulation of release factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82: 3616 – 3620.
- **Crick, F. H. C. et al.** (1961). The general nature of the genetic code for proteins. *Nature*. Vol. 192: 1227 – 1232.

- **Cui, Y. and Denis, C. L.** (2003). *In vivo* evidence that defects in the transcriptional elongation factors RPB2, TFIIS and SPT5 enhance upstream poly(A) site utilization. *Mol. Cell Biol.* Vol. 23: 7887 – 7901.
- **Cullen, B.R.** (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus. Res.* Vol. 102: 3 – 9.
- **Czaplinski, K. et al.** (1998). The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* Vol. 12: 1665 – 1677.
- **Czaplinski, K. et al.** (1999). Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover. *BioEssays.* Vol. 21: 685 – 696.
- **Davis, L. and Engebretch, J.A.** (1998). Yeast dom34 mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics.* Vol. 149: 45 – 56.
- **Dehlin, E. et al.** (2000). Cap – dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* Vol. 19: 1079 – 1086.
- **Denning, G. et al.** (2001). Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase – related kinase, characterization of the human SMG – 1 RNA surveillance protein. *J. Biol. Chem.* Vol. 276: 22709 – 22714.
- **Dickson, M. A. et al.** (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16<sup>INK4a</sup> – enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 20 (4): 1436 – 1447.
- **Doench, J.G.; Petersen, C.P. and Sharp, P.A.** (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development.* Vol. 17: 438 – 442.
- **Doma, M. K. and Parker, R.** (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature.* Vol. 440: 561 – 564.
- **Donzé, O. and Picard, D.** (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* Vol.30, no.10.
- **Dowdy, S. F. et al.** (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell.* Vol. 73: 499 – 511.

- **Downward, J.** (2004). RNA interference. *BMJ*. Vol. 328: 1245 – 1248.
- **Duxbury, M.S. and Wang, E.E.** (2004). RNA interference: a practical approach. *J. Surg. Res.* 117, 339 – 344.
- **Eberhart, C.G. and Wasserman, S.A.** (1995). The *pelota* locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in *Drosophila* spermatogenesis. *Development*. Vol. 121: 3477 – 3486.
- **Elbashir, S.M. et al.** (2001). Duplexes of 21 – nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. Vol. 411: 494 – 498.
- **Elbashir, S.M.; Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21 – and 22 – nucleotide RNAs. *Genes & Development*. Vol. 15: 188 – 200.
- **Evans, T. et al.** (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. Vol. 33: 389 – 396.
- **Ewen, M. E. et al.** (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D – type cyclins. *Cell*. Vol. 73: 487 – 497.
- **Fenger – Gron, M. et al.** (2005). Multiple processing body factors and the ARE – binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell*. Vol. 20: 905 – 915.
- **Ferrari, M.E. et al.** (1998). Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Hum. Gene Ther.* Vol. 9(3):341-51.
- **Fire, A. et al.** (1998). Potent and specific genetic interference by double – stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. Vol. 391: 806 – 811.
- **Fire, A.** (1999). RNA – triggered gene silencing. *TIG*. Vol.15, no.9: 358 – 363.
- **Frischmeyer, P. A. et al.** (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*. Vol. 295: 2258 – 2261.
- **Frolova, L. Y. et al.** (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature*. Vol. 372: 701 – 703.
- **Frolova, L. Y. et al.** (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factor abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl – tRNA hydrolysis. *RNA*. Vol. 5: 1014 – 1020.

- **Frolova, L. Y. et al.** (2000). Translation termination in eukaryotes: polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *RNA*. Vol. 6: 381 – 390.
- **Fukuhara, N. et al.** (2005). SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense – mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell*. Vol. 18: 537 – 547.
- **Gao, M. et al.** (2000). Interaction between a poly(A) – specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates *in vitro*. *Mol. Cell*. Vol. 5: 479 – 488.
- **Garneau, N. L.; Wilusz, J. and Wilusz, C. J.** (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* Vol. 8: 113 – 126.
- **Gatfield, D. et al.** (2003). Nonsense – mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J.* Vol. 22: 3960 – 3970.
- **Gatfield, D. and Izaurralde, E.** (2004). Nonsense – mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature*. Vol. 429: 575 – 578.
- **Geng, Y. et al.** (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*. Vol. 12: 1173 – 1180.
- **Gil, J. and Esteban, M.** (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA – dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action. *Apoptosis*. Vol. 5: 107 – 114.
- **Girard, F.; Strausfeld, U.; Fernández, A. And Lamb, N. J. C.** (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*. Vol. 67: 1169 – 1179.
- **Gossen, M. and Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline – responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89: 5547 – 5551.
- **Graham, F. L. and van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. Vol. 52(2):456-67.
- **Graham, F. L. et al.** (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. gen. Virol.* Vol. 36 (1), 59-72.

- **Graille, M. et al.** (2008). Structure of Yeast Dom34: a protein related to translational termination factor Erf1 and involved in No – Go Decay. *J. Biol. Chem.* Vol. 283(11): 7145-7154.
- **Grimson, A. et al.** (2004). Smg – 1 is a phosphatidylinositol kinase – related protein kinase required for nonsense – mediated mRNA decay in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 17: 7483 – 7490.
- **Grishok, A. et al.** (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* Vol.106: 23 – 34.
- **Grosshans, H. and Slack, F.J.** (2002). Micro – RNAs: small is plentiful. *J. Cell. Biol.* Vol. 156 (1): 17 – 21.
- **Goldstein, J.L. and Caskey, C.T.** (1970). Peptide chain termination: effect of protein S on ribosomal binding of release factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 67: 537 – 543.
- **Guo, S. and Kemphues, K.J.** (1995). *Par – 1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* Vol. 81: 611 – 620.
- **Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286(5441):950-2.
- **Hammond, S.M. et al.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404(6775):293-6.
- **Hammond, S.M. et al.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 293(5532):1146-50.
- **Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature.* Vol. 418: 244 – 251.
- **Hannon, G. J. and Rossi, J. J.** (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature.* Vol. 431: 371 – 378.
- **Hartwell, L. H. et al.** (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* Vol. 183: 46 - 51.
- **Hartwell, L. H.** (1978). Cell division from a genetic perspective. *J. Cell Biol.* Vol. 77: 627 – 637.

- **Hinds, P. W. et al.** (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*. Vol. 70: 993 – 1006.
- **Holen, T. et al.** (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30(8):1757-66.
- **Hosoda, N. et al.** (2003). Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem.* Vol. 278 (40): 38287 – 38291.
- **Houseley, J.; LaCava, J. and Tollervey, D.** (2006). RNA – quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* Vol. 7: 529 – 539.
- **Hunter, T.; Hunt, T. and Jackson, R.J.** (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double – stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* Vol.250, no.2: 409 – 417.
- **Hutvagner, G. et al.** (2001). A cellular function for the RNA – interference enzyme Dicer in the maturation of the *let – 7* small temporal RNA. *Science*. Vol. 293: 834 – 838.
- **Iinuma, T. et al.** (2007). Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* Vol. 282, no. 24: 17632 – 17639.
- **Inada, T. and Aiba, H.** (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'- UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* Vol. 24: 1584 – 1595.
- **Inge – Vechtomov, S. et al.** (2003). Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol. Cell.* Vol. 95: 195 – 209.
- **Isken, O. and Maquat, L. A.** (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* Vol. 21: 1833 – 1856.
- **Ito, K. et al.** (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA – protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 93: 5443 – 5448.

- **Ito – Harashima, S. et al.** (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* Vol. 21: 519 – 524.
- **Ji, J. et al.** (2003). Enhanced silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Letters.* 552: 247 – 252.
- **Jiang, X. – R. et al.** (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induces changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genetics.* Vol. 21: 111 – 114.
- **Johnson, D. G. and Schneider – Broussard, R.** (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front. Biosci.* Vol. 3:447 – 458.
- **Johnson, D. G. and Walker, C. L.** (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* Vol. 39: 295 – 312.
- **Jorgensen, R.** (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8:340 – 344.
- **Karzai, A. W.; Roche, E.D. and Sauer. R.T.** (2000). The SsrA – SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* Vol. 7: 449 – 455.
- **Kashima, I. et al.** (2006). Binding of a novel SMG1 – Upf1 – eRF1 – eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense mediated mRNA decay. *Genes Dev.* Vol. 20: 355 – 367.
- **Kato, J. et al.** (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D – dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* Vol. 7: 331 – 342.
- **Kaufmann, W. K. and Paules, R. S.** (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* Vol. 10: 238 – 247.
- **Ketting, R.F. et al.** (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development.* 15: 2654 – 2659.
- **Khorana, H.G.** (1968). Synthesis in the study of nucleic acids. *Biochem. J.* Vol. 109: 709 – 725.

- **King, R. W.; Jackson, P. K. and Kirschner, M. W.** (1994). Mitosis in transition. *Cell*. Vol. 79: 563 – 571.
- **Knight, S.W. and Bass, B.L.** (2001). A role for the RNase III enzyme DCR – 1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. Vol. 293: 2269 – 2271.
- **Kooter, J.M.; Matzke, M.A. and Meyer, P.** (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plants Sci.* vol.4, no.9: 340 – 347.
- **Le Hir, H. et al.** (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20 – 24 nucleotides upstream of mRNA exon – exon junctions. *EMBO J.* Vol. 19: 6860 – 6869.
- **Le Hir, H. et al.** (2001). The exon – exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense – mediated mRNA decay. *EMBO J.* Vol. 20: 4987 – 4997.
- **Lee, H. H. et al.** (2007). Structural and functional insights into Dom34, a key component of No – Go mRNA decay. *Mol. Cell.* 27, 938 – 950.
- **Lee, R.C. et al.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin – 4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin – 4*. *Cell*. Vol. 75: 843 – 854.
- **Lehner, C. F. and O’Farrell, P. H.** (1989). Expression and function of drosophila cyclin A during embryogenic cell cycle progression. *Cell*. Vol. 56: 957 – 968.
- **Leirdal, M. and Sioud, M.** (2002). Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295: 744 – 748.
- **Lejeune, F. and Maquat, L. E.** (2005). Mechanistic links between nonsense – mediated mRNA decay and pre – mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol. 17: 309 – 315.
- **Li, Y. et al.** (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* Vol. 54: 6078 – 6082.
- **Liu et al.** (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. Vol.305: 1437 - 1441.

- **Lukas, J. et al.** (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene – deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol. Cell Biol.* Vol. 15: 2600 – 2611.
- **Lykke – Andersen, J.; Shu, M.-D. and Steitz, J. A.** (2000). Human Upf proteins target an mRNA for Nonsense-Mediated Decay when bound downstream of a termination codon. *Cell.* Vol. 103: 1121–1131.
- **Maquat, L. E.** (2002). Skiing toward nonstop mRNA decay. *Science.* Vol. 295: 2221 – 2222.
- **Maquat, L. E.** (2005). Nonsense – mediated mRNA decay in mammals. *J. Cell Sci.* Vol. 118: 1773 – 1776.
- **Masclaux, F. et al.** (2004). Gene silencing using a heat – inducible RNAi system in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 321: 364 – 369.
- **Matzke, M. et al.** (2004). Genetic analysis of RNA – mediated transcriptional gene silencing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1677: 129 – 141.
- **McSharry, B. P. et al.** (2001). Human telomerase reverse transcriptase-immortalized MRC-5 and HCA2 human fibroblasts are fully permissive for human cytomegalovirus. *Journal of General Virology.* Vol. 82: 855 – 863.
- **Meaux, S. And van Hoof, A.** (2006). Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *RNA.* Vol. 12: 1323 – 1337.
- **Mehta, P.; Richards, J. and Karzai, W.** (2006). tmRNA determinants required for facilitating nonstop mRNA decay. *RNA.* Vol. 12: 2187 – 2198.
- **Meister, G. and Tuschl, T.** (2004). Mechanisms of gene silencing by double – stranded RNA. *Nature.* Vol. 431: 343 – 349.
- **Mello, C. C. and Conte, D. Jr.** (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature.* Vol. 431: 338 – 342.
- **Milhavet, O. et al.** (2003) RNA interference in biology and medicine. *Pharmacological reviews.* Vol.55, no.4 629 – 648.
- **Milman, G. et al.** (1969). Peptide chain termination. 3. Stimulation of in vitro termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 63: 183 – 190.

- **Milyavsky, M. et al.** (2003). Prolonged culture of telomerase – immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer. Res.* 63: 7147 – 7157.
- **Morales, C. P. et al.** (1999). Absence of cáncer – associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genetics.* Vol. 21: 115 – 118.
- **Muto, A.; Ushida, C. and Himeno, H.** (1998). A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA. *Trends. Biochem.* Vol. 23: 25 – 29.
- **Nakamura, Y. and Ito, K.** (1998). How protein reads the stop codon and terminates translation. *Genes to Cells.* Vol. 3: 265 – 278.
- **Napoli, C. et al.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co – suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* Vol.2: 279 – 289.
- **Nurse, P.** (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature.* Vol.256: 547 – 551.
- **Nurse, P. and Bisett, Y.** (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature.* Vol. 292: 558 – 560.
- **Nykanen, A.; Haley, B. and Zamore, P.D.** (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* 107(3): 309-21.
- **Ohnishi, T. et al.** (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG – 5 and hSMG – 7. *Mol. Cell.* Vol. 12: 1187 – 1200.
- **Ohtani, K.; DeGregori, J. and Nevins, J.R.** (1995). Regulation of the cyclin E by transcription factor E2F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 92: 12146 – 12150.
- **Ohtsubo, M. et al.** (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 – to – S phase transition. *Mol. Cell Biol.* Vol. 15: 2612 – 2624.
- **Paddison, P.J.; Caudy, A.A. and Hannon, G.J.** (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol.99, no.3: 1443 – 1448.

- **Paddison, P.J. et al.** (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence – specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development*. 16: 948 – 958.
- **Pardee. A.** (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 71: 1286 – 1290.
- **Pasquinelli, A.E.** (2002). MicroRNAs: deviants no longer. *TRENDS in genetics*. Vol.18, no.4: 171 – 173.
- **Paul, C.P. et al.** (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20(5):505-8.
- **Pearl, L. H. et al.** (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem. J.* 410: 439 – 453.
- **Plasterk, R.H.A. and Ketting, R.F.** (2000). The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 10: 562 – 567.
- **Ragan, M. A. et al.** (1996). An archaebacterial homolog of *pelota*, a meiotic cell division protein in eukaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 144 (2-3): 151-155.
- **Rehwinkel, J.; Raes, J. and Izaurralde, E.** (2006). Nonsense – mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors. *Trends. Biochem. Sci.* Vol. 31: 639 – 646.
- **Reichenbach, P. et al.** (2003). A human homolog of yeast est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr. Biol.* Vol. 13: 568 – 574.
- **Rocheleau, C.E. et al.** (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 90(4):707-16.
- **Rosenthal, E. T.; Hunt, T. and Ruderman, J. V.** (1980). Selective translation of mRNA controls: the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *spisula solidissima*. *Cell.* Vol. 20: 487 – 494.
- **Sætrom, P. and Snøve Jr., O.** (2004). A comparison of siRNA efficacy predictors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 321: 247 – 253.
- **Salas – Marco, J. and Bedwell, D. M.** (2004). GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 24 (17): 7769 – 7778.
- **Sallam, M.A.** (2001). Expression and function of mouse *pelota* gene.

- **Scherr, M.; Morgan, M.A. and Eder, M.** (2003). Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr. Med. Chem.*, 10: 245 – 256.
- **Schütze, N.** (2003). siRNA technology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 213: 115 – 119.
- **Schwarze, S.R. and Dowdy, S.F.** (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 21(2):45-8.
- **Scolnick, E. et al.** (1968). Release factor differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. USA*. Vol. 61: 768 – 774.
- **Shamsadin, R. et al.** (2000). Molecular cloning, expression and chromosome location of the human *pelota* gene PELO. *Cytogenet. Cell. Genet.* 90(1-2):75-78.
- **Shamsadin, R. et al.** (2002). Mouse *pelota* gene (Pelo): cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization. *Cytogenet. Genome. Res.* 97(1-2): 95-99.
- **Sharp, P.A.** (1999). RNAi and double – strand RNA. *Genes & Development*. 13: 139 – 141.
- **Sharp, P.A. and Zamore, P.D.** (2000). RNA interference. *Science*. Vol.287, issue 5462: 2431 – 2433.
- **Sharp, P.A.** (2001). RNA interference – 2001. *Genes & Development*. 15: 485 – 490.
- **Sherr, C. J.** (1996). Cancer cell cycles. *Science*. Vol. 274: 1672 – 1677.
- **Sherr, C. J.** (1994). G1 phase progression cycling on cue. *Cell*. Vol. 79: 551 – 555.
- **Shrivastava, N. and Srivastava, A.** (2008). RNA interference: An emerging generation of biological. *Biotechnol. J.* Vol. 3: 339 – 353.
- **Sijen, T. and Kooter, J.M.** (2000). Post – transcriptional gene – silencing: RNAs on the attack or on the defense?. *BioEssays*. 22: 520 – 531.
- **Sijen, T. et al.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*. 107(4):465-76.
- **Snow, B. E. et al.** (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr. Biol.* Vol. 13: 698 – 704.

- **Song, H. et al.** (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 – Mechanism of stop codon recognition and peptidyl – tRNA hydrolysis. *Cell*. Vol. 100: 311 – 321.
- **Song, J. – J. et al.** (2004). Crystal structure of *Argonaute* and its implications for RISC slicer activity. *Science*. Vol. 305: 1434 – 1437.
- **Stadler, B. M. and Ruohola – Baker, H.** (2008). Small RNAs: keeping stem cells in line. *Cell*. Vol. 132: 563 – 566.
- **Stansfield, I. et al.** (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO*. Vol. 14: 4365 – 4373.
- **Steiger, M. et al.** (2003). Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA*. Vol. 9: 231 – 238.
- **Takanami, M. and Yan, Y.** (1965). The release of polypeptide chains from ribosomes in cell – free amino acid – incorporating systems by specific combinations of bases in synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 54: 1450 – 1458.
- **Tarn, N. et al.** (2003). Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription. *BCM Biotechnology*. 3:21 – 29.
- **Tharun, S. et al.** (2000). Yeast Sm – like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature*. Vol. 404: 515 – 518.
- **Tharun, S. and Parker, R.** (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p – 7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell*. Vol. 8: 1075 – 1083.
- **Tijsterman, M. and Plasterk, R.H.A.** (2004). Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell*, vol.117: 1 – 4.
- **Tollervey, D.** (2006). RNA lost in translation. *Nature*. Vol. 440: 425 – 426.
- **Tomar, R.S.; Matta, H. and Chaudhary, P.M.** (2003). Use of adeno – associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene*. 22: 5712 – 5715.
- **Tucker, M. et al.** (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. Vol. 104: 377 – 386.

- **Tuschl, T.** (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem.* 2: 239 – 245.
- **Ullu, E. et al.** (2002). RNA interference: advances and questions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357: 65 – 70.
- **Unterholzner, L. and Izaurralde, E.** (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell.* Vol. 16: 1095 – 1109.
- **Urakov, V. N. et al.** (2006). N – terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* eRF3 is essential for the functioning of the eRF1 / eRF3 complex beyond translation termination. *BMC Mol. Biol.* Vol. 7 (34):
- **van Blokland, R. et al.** (1994). Transgene – mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* Vol.6: 861 – 877.
- **van Hoof, A. et al.** (2002). Exosome – mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science.* Vol. 295: 2262 – 2264.
- **Vestergaard, B. et al.** (2001). Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell.* Vol. 8: 1375 – 1382.
- **Walker, D. H. and Mahler, J. L.** (1991). Role of cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature.* Vol. 354: 314 – 317.
- **Wagner, E. and Lykke – Andersen, J.** (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell. Sci.* Vol. 115: 3033 – 3038.
- **Wall, N.R. and Shi, Y.** (2003). Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy?. *The Lancet.* Vol.362: 1401 – 1403.
- **Weigert, M.G. and Garen, A.** (1965). Base composition of nonsense codons in *E. coli*. Evidence from amino – acids substitutions at a tryptophan site in alkaline phosphatase. *Nature.* Vol. 206: 992 – 994.
- **Weinberg, R.A. and Penman, S.** (1968). Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* 38(3):289-304.
- **Williams, B.R.** (1997). Role of the double – stranded RNA – activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* Vol.25: 509 – 513.
- **Williams, B.R.G.** (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 18: 6112 – 6120.

- **Wilson, M. A.; Meaux, S. And van Hoof, A.** (2007). A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics*. Vol. 177: 773 – 784.
- **Xi, R. et al.** (2005). *Pelota* controls self – renewal of germline stem cells by repressing a Bam – independent differentiation pathway. *Development*. Vol. 132: 5365 – 5374.
- **Yamamoto, Y. et al.** (2003). SsrA – mediated trans – translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *RNA*. Vol. 9: 408 – 418.
- **Yamashita, A. et al.** (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.* Vol. 12: 1054 – 1063.
- **Yamashita, A. et al.** (2001). Human SMG – 1, a novel phosphatidylinositol 3 – kinase – related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense – mediated mRNA decay. *Genes Dev.* Vol. 15: 2215 – 2228.
- **Yang, D.; Lu, H. and Erickson, J.W.** (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 10(19):1191-200.
- **Yang, D. et al.** (2002). Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.99, no.15: 9942 – 9947.
- **Yin, D. and Ji, Y.** (2002). Genomic analysis using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 330 – 333.
- **Yu, J. – Y.; DeRuiter, S.L. and Turner, D.L.** (2002). RNA interference by expression of short – interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.99, no.9: 6047 – 6052.
- **Yu, J. H. et al.** (2005). Ge – 1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA*. Vol. 11: 1795 – 1802.
- **Zamore, P.D.** (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*. Vol.296: 1265 – 1269.

## *Bibliografia*

- **Zamore, P.D. et al.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101(1):25-33.
- **Zeng, Y. et al.** (1993). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *PNAS*. Vol. 100, no.17: 9779 – 9784.
- **Zhouravleva, G. et al.** (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO*. Vol. 14 (16): 4065 – 4072.