

Grado Amaierako Lana/Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Zilio primarioaren formakuntza akatsak Townes-Brocks sindromean / Defectos en la formación del cilio primario en el síndrome de Townes-Brocks

Egilea/Autora: Estibaliz Gabicagogeascoa Corta

Zuzendaria/Directora: Rosa Barrio

Arkaitz Carracedo

ÍNDICE

Introducción	3
Hipótesis general	4
Objetivos	4
- Estudio de la localización subcelular de la proteína SALL1 en células humanas	4
- Análisis de la formación y función del cilio primario	4
Materiales y Métodos	5
- Cultivos celulares	5
- Plásmidos utilizados en la transformación celular.....	5
- Inmunofluorescencia	5
- <i>Pulldown</i> de biotina.....	6
- GFP <i>pulldown</i>	6
- Western blot.....	7
- Análisis estadístico	7
Resultados	8
- SALL1 WT se localiza en el cilio de fibroblastos humanos	8
- Expresión de la proteína SALL1 truncada en fibroblastos humanos.....	8
- Alteraciones ciliares en los fibroblastos de TBS	9
- CP110, una proteína represora de la ciliogénesis, está reducida en TBS durante el proceso de reabsorción del cilio.....	10
- CP110 interactúa en mayor grado con el complejo formado por SALL1 WT y SALL1 truncada	12
Discusión	13
Conclusión	14
Bibliografía	14

INTRODUCCIÓN

La familia SALL (Spalt-like) de factores de transcripción del tipo dedo de zinc, está conservada desde *Caenorhabditis elegans* hasta humanos y participa en varios procesos biológicos como son la organogénesis y en el mantenimiento de la pluripotencia en células madre [1]. Existen cuatro factores homólogos de SALL en humanos (SALL1-4) caracterizados por contener de 4 ó 5 dedos de zinc, el primero del tipo C2HC (monómero) y los demás pertenecientes al grupo C2H2 (dímeros), y una región rica en glutamina. Dicha región participa en la interacción entre proteínas SALL y en interacciones con otras proteínas [2].

SALL1 es un factor represor de la transcripción que se localiza en la heterocromatina pericentromérica [3]. SALL1 puede ejercer su función como represor mediante dos mecanismos. Por un lado, 12 aminoácidos localizados en el extremo N-terminal interactúan con el complejo remodelador del nucleosoma y el complejo histona deacetilasa (NuRD); por otro lado, una región de 2-3 dominios de dedos de zinc que localiza en heterocromatina [4,5].

El síndrome de Townes-Brocks (TBS) es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *SALL1* que producen una proteína truncada [6]. Todas las mutaciones descritas hasta el momento son mutaciones sin sentido que dan lugar a proteínas truncadas y la mayoría se localizan entre la zona rica en glutamina y el primer dímero de dedos de zinc [7]. Se ha comprobado que ratones *knockout* mutantes para *SALL1* no reproducen los síntomas de TBS en heterocigosis. Sin embargo, cuando producen una proteína truncada en heterocigosis recapitulan las anomalías típicas de la enfermedad [8]. Por tanto, parece que la enfermedad no se desarrolla por haploinsuficiencia, sino por la presencia de la proteína truncada que actúa como dominante negativo o como ganancia de función.

Aunque los síntomas pueden variar, la enfermedad se caracteriza por la triada de polidactilia preaxial, orejas displásicas y ano imperforado [9]. Sorprendentemente, muchos de los síntomas presentes en pacientes de TBS coinciden con aquellos que definen las ciliopatías en las que la formación y/o función del cilio primario se ven alteradas [10].

El cilio es un orgánulo compuesto por microtúbulos que surgen de la extensión del centrosoma cuando éste se localiza en la membrana plasmática [11]. Existen dos tipos de cilio, el cilio mótil y el cilio estático o primario. De ahora en adelante, me referiré al cilio primario como cilio. Prácticamente todas las células de los mamíferos son capaces de formar un cilio en fase G₀/G₁ y su reabsorción sucede cuando la célula entra en el ciclo celular. La entrada en fase G₀ se puede inducir privando a las células de los nutrientes necesarios reduciendo concentración de suero en el medio de cultivo. El cilio es crucial en la detección de señales durante el desarrollo y en la homeostasis tisular. Una de las proteínas que participa en la represión de la formación del cilio es la Proteína Centriolar 110 (CP110) [12,13].

HIPÓTESIS GENERAL

La concordancia de síntomas entre TBS y las ciliopatías, junto con experimentos preliminares en el laboratorio que demostraron la localización ciliar de la proteína SALL1 en células de ratón, nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis: la presencia de la proteína truncada de SALL1 podría causar defectos en la formación y/o función del cilio, siendo estos factores contribuyentes en el desarrollo de TBS.

OBJETIVOS

Con la intención de demostrar la contribución de la proteína truncada de SALL1 en el desarrollo de TBS y los defectos producidos por dicha proteína en la formación y/o función del cilio, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio de la localización subcelular de la proteína SALL1 en células humanas

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, comparamos la localización subcelular de la proteína SALL1 en fibroblastos dérmicos derivados de un individuo control y un paciente de TBS. Se observaron los posibles cambios que la presencia de la proteína SALL1 truncada pudiera producir en la localización de la proteína SALL1 silvestre (WT).

2. Análisis de la formación y función del cilio primario

Para analizar si el cilio está afectado en los pacientes de TBS se comparó la longitud del cilio de fibroblastos entre los individuos control y paciente de TBS. También se

comparó el proceso de reabsorción del cilio en ambos casos mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se espera que la reabsorción del cilio vaya acompañada por cambios en los niveles de CP110. Para analizar esto, se cuantificaron los niveles de CP110 mediante Western blot. Por último, se analizó la interacción directa de CP110 con SALL1 WT, SALL1 mutante o con el complejo que ambas forman.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Los fibroblastos dérmicos humanos derivados de un individuo control y de un paciente de TBS y la línea celular HEK-293 FT se cultivaron en medio completo [*Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco) complementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, Gibco) y con 1% de penicilina y estreptomicina (pen/strep, Gibco)] a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. Para la inducción de la formación del cilio las células se cultivaron con medio bajo en suero (DMEM suplementado con 0,1% de FBS y 1% de pen/strep) durante 48 horas. La reabsorción del cilio se indujo mediante la adición de medio completo durante 1 ó 7 horas a células que ya habían estado previamente tratadas con medio bajo en suero durante 48 horas.

Plásmidos utilizados en la transformación celular

CAG-YFP, expresión del marcador YFP como control; *CAG-SALL1-YFP*, expresión del gen *SALL1* fusionado con el marcador YFP; *CAG-SALL1-2xHA*, expresión del gen *SALL1* fusionado a dos copias del marcador hemaglutinina (HA); *CAG-SALL1^{C826T}-YFP*, expresión de la forma truncada de *SALL1* fusionada a YFP. A ésta última forma se la denominará *SALL1* truncada en el texto.

Inmunofluorescencia

Los fibroblastos de control y paciente de TBS se sembraron sobre cubreobjetos de 11 mm en placas de 24 pocillos. A continuación, se fijaron las células con 4% paraformaldehído y 0,1% Triton X-100 en PBS (tampón fosfato salino) durante 20 minutos. Las muestras se bloquearon durante 1 hora con tampón de bloqueo que contiene 2% de FBS (Gibco) y 1% de albúmina de suero bovino en PBS. Se utilizaron los anticuerpos anti- α -tubulina acetilada (1:160, Sigma T6793) para visualizar el axonema ciliar, anti-ARL13B (1:100, Proteintech) para marcar el cilio y anti-

pericentrina (1:160, Sigma PRB-432) para marcar el cuerpo basal. Otros anticuerpos usados: anti-SALL1 (1:100, R&D) y anti-CP110 (1:100, Proteintech). Los núcleos se marcaron con DAPI. Se usaron los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón marcados con Alexa 488 o Alexa 568 (1:200). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio de fluorescencia (Axioimager D1) y en el microscopio Confocal (Leica SP2). Finalmente, se procedió a la cuantificación y medición de los cilios mediante los programas ImageJ y Adobe Photoshop.

Pulldown de biotina

Las células HEK-293 FT se transfectaron con Myc-BirA*-SALL1 WT o con MYC-BirA*-SALL1C826T, una forma truncada de SALL1, en placas de 10 cm mediante el método de fosfato de calcio. Las proteínas que se localizaban en la proximidad de SALL1 fueron biotiniladas por la enzima BirA*. BirA* es una enzima procedente de *Escherichia coli* mutada para que, en lugar de biotinar sustratos específicos, biotinile todas aquellas proteínas que se encuentran en un radio determinado. Las proteínas biotiniladas se purificaron mediante un *pulldown* de NeutrAvidina. Para ello, 24 horas después de la transfección, se añadió biotina 50 μ M al medio de cultivo. 48 horas después de la transfección, las células se lisaron con tampón de lisis [8 M urea, 1% SDS, 50 mM N-etilmaleimida en PBS e inhibidores de proteasas (Roche)]. Se recogieron 40 μ l del lisado como *input* y el resto se incubó durante toda la noche con 40 μ l de NeutrAvidina-agarosa (Thermo Scientific) previamente lavada. Los lavados de la resina se hicieron con tampones de lavado (WB) preparados en PBS: WB1 (8 M urea, 0,25% SDS); WB2 (6 M Guanidinio-HCl); WB3 (6,4 M urea, 1 M NaCl, 0,2% SDS); WB4 (4 M urea, 1 M NaCl, 10% isopropanol, 10% etanol y 0,2% SDS); WB5 (8 M urea, 1% SDS); y WB6 (2% SDS). Para eluir las proteínas biotiniladas, las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C en el tampón de elución (tampón Laemmli 4x, 100 mM DTT).

GFP pulldown

Las células HEK-293FT sembradas en placas de 10 cm se transfectaron con los plásmidos mencionados anteriormente mediante el método de fosfato cálcico. 48 horas tras la transfección, se lisaron las células en 1 ml de tampón de lisis [25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 5% glicerol, inhibidores de proteasas (Roche)]. El lisado se mantuvo en hielo durante 30 minutos y

posteriormente se centrifugó a 25,000 g durante 20 minutos a 4°C. Se recogieron 40 µl del sobrenadante como *input* de la muestra y el resto del sobrenadante se incubó toda la noche en el agitador orbital con 30 µl de resina de GFP *Pulldown* (ChromoTek). Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 2,000 g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Tras 5 lavados, las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C en el tampón de elución.

Western blot

Los fibroblastos humanos de paciente y control sembrados en placas de 6 pocillos se lisaron en tampón RIPA (Cell Signalling, 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 1% ácido desoxicólico y 1 mM EGTA suplementado con inhibidores de proteinasas). Después de 30 minutos en hielo, se centrifugó el lisado a 25,000 g durante 20 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. A continuación, se cargaron los geles de acrilamida al 7,5% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF durante 12 horas a 4°C. La membrana se bloqueó con 5% leche en PBS y 0,1% Tween-20 (PBT-M) durante 1 hora. Para la detección se utilizaron varios anticuerpos primarios: anti-CP110 (1:1000, Proteintech), anti-actina (1:1000, Sigma), anti-SALL1 [1:100, R&D o Rauchman (Michael Rauchman, St Louis University Hospital, San Luis, Missouri, United States)], anti GFP (1:1000, Roche) y anti-GAPDH (1:1000; Proteintech). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con HRP (Jackson Immunoresearch). Para la detección de la señal se utilizó Clarity ECL (BioRad) y el procesador Curix-60 film (Agfa). La cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el programa ImageJ y se normalizó respecto a la expresión de actina.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa Graphpad 6.0. Los datos analizaron con el test de normalidad Shapiro-Wilk y con el test de varianza de Levene ($p > 0,05$). A continuación, los datos se analizaron con el test T-student aplicando o no la corrección de Welch para dos muestras independientes o ANOVA para más de dos muestras por la vía paramétrica o la prueba U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis por la vía no paramétrica. Se consideraron significativos los valores p inferiores a 0,05.

RESULTADOS

SALL1 WT se localiza en el cilio de fibroblastos humanos

Se analizó la localización de la proteína SALL1 WT en fibroblastos humanos. Debido a que no se dispone de un anticuerpo específico para la detección de la proteína mutante endógena mediante inmunofluorescencia, se analizó la localización de SALL1 WT. En el caso del individuo control, SALL1 WT se localiza casi exclusivamente en el núcleo (Fig. 1A,B). Sin embargo, en el paciente de TBS SALL1 se localiza difusamente por toda la célula sin observarse un límite claro entre núcleo y citoplasma (Fig. 1C,D). Tanto en fibroblastos control como de paciente de TBS se observa por primera vez la localización ciliar de SALL1 humano (Fig. 1E-J). Para analizar diferencias de expresión entre ambas células, se cuantificó la señal fluorescente de SALL1 WT ciliar. Así, se concluyó que SALL1 WT está significativamente más presente en el cilio primario de fibroblastos control que en el de fibroblastos de TBS (Fig. 1K).

Expresión de la proteína SALL1 truncada en fibroblastos humanos

También se analizó la expresión de la proteína tanto mutante como WT en fibroblastos humanos mediante un anticuerpo específico para Western blot. Como era de esperar, en los fibroblastos control solamente se detectó la proteína SALL1 WT (Fig. 2). En cambio, en el caso de los fibroblastos de paciente de TBS, se detectó la presencia de SALL1 truncada y una baja expresión de SALL1 WT. Por lo tanto, se demuestra la expresión y la estabilidad de la proteína mutante en los pacientes de TBS.

Alteraciones ciliares en los fibroblastos de TBS

Se estudió la longitud de los cilios en células que habían estado durante 48 horas con medio bajo en suero tras añadirles o no medio para inducir la formación y posterior reabsorción del cilio. Tanto en medio bajo en suero como tras la adición de medio completo durante 1 y 7 horas, los cilios de los fibroblastos del paciente de TBS (Fig. 3D-F) son significativamente más largos que los control (Fig. 3A-C). Además, se observa una dinámica de reabsorción distinta entre células paciente y control: mientras que las células control aumentan significativamente la longitud de sus cilios 1 hora tras la adición de medio completo y la reabsorción es completa después de 7 horas (Fig. 3B,C), las células de TBS no terminan su reabsorción hasta las 7 horas posteriores a la inducción con medio completo (Fig. 3D,F).

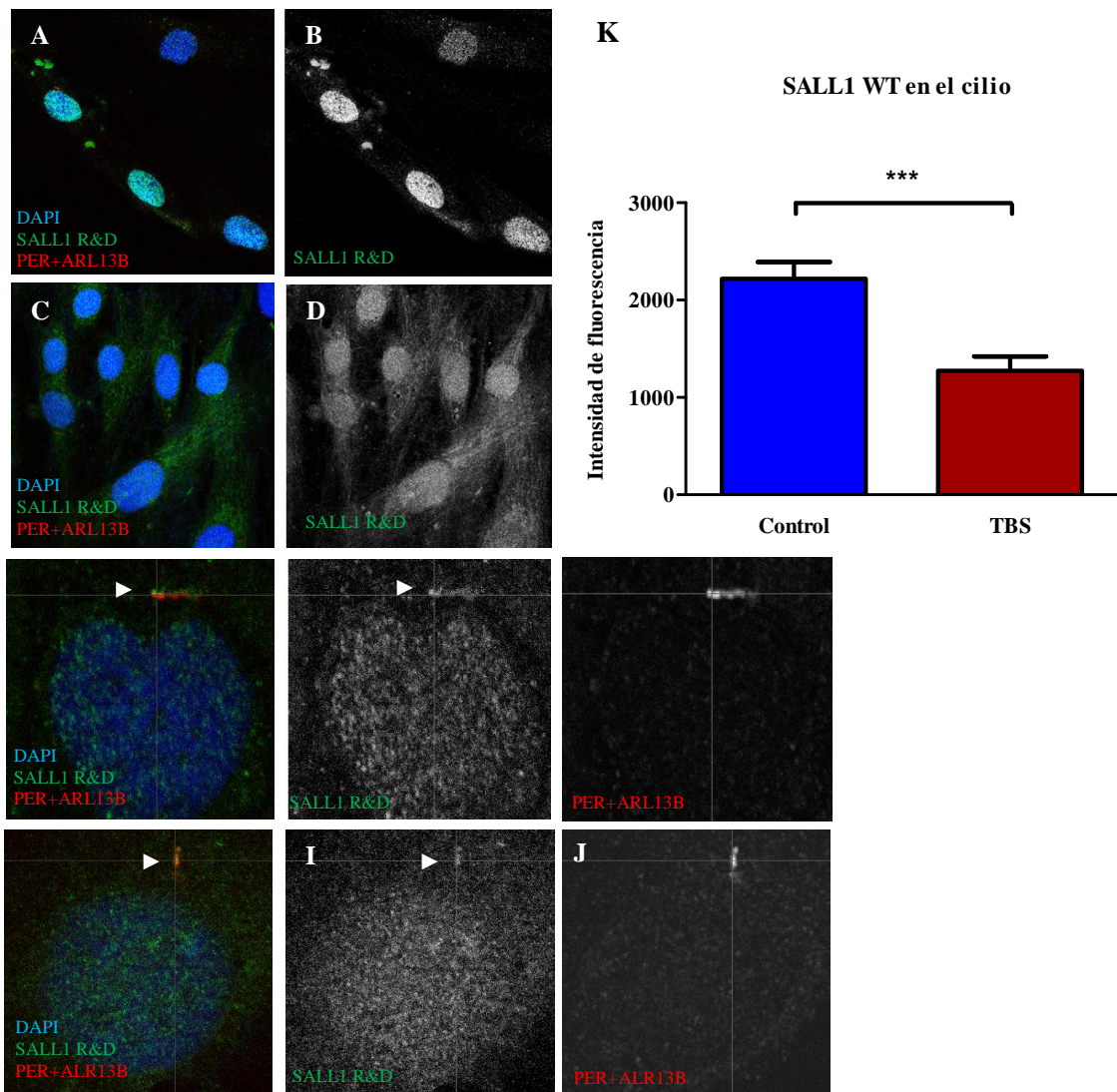


Figura 1. Localización de SALL1 WT en fibroblastos humanos. (A) y (B) Localización nuclear de SALL1 WT en fibroblastos de individuo control. (C) y (D) Localización citoplásmica y nuclear de SALL1 WT en fibroblastos de paciente de TBS. Secciones de microscopio confocal en las que se observa la localización ciliar de SALL1 WT (▶) en fibroblastos de individuo control (E-G) y de paciente de TBS (H-J). (K) Cuantificación de la señal SALL1 WT ciliar en micrografías de fluorescencia tomadas en fibroblastos humanos. SALL1 WT tiene una localización ciliar significativamente mayor en células del individuo control. Núcleo marcado con DAPI (azul), cuerpo basal con pericentrina (rojo), cilio primario con ALR13B (rojo) y SALL1 WT (R&D, verde). (***) $p < 0,0001$ (Test de Mann Whitney) ($n > 111$).

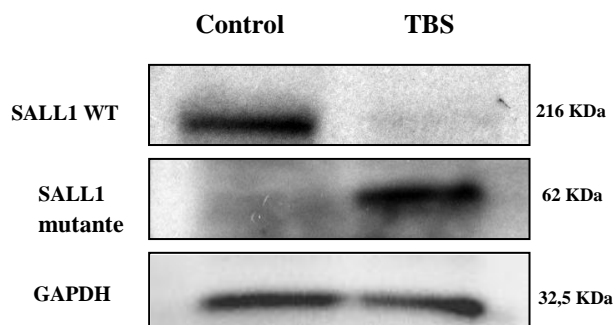


Figura 2. Detección de las proteínas SALL1 WT y truncada en fibroblastos humanos. En el individuo control solamente se expresa la proteína SALL1 WT (216 KDa). En el paciente de TBS, en cambio, se detecta la expresión de SALL1 truncada (62 KDa) y unos niveles mucho menores de la proteína WT. Anticuerpo anti- SALL1 (Rauchman) y GAPDH-HRP (Proteintech).

Consecuentemente, la longitud del cilio en el caso de los pacientes de TBS es significativamente más larga durante el proceso de reabsorción, ya que a las 7 horas de añadir medio completo a las células del paciente de TBS, éstas siguen manteniendo el cilio (Fig. 3G).

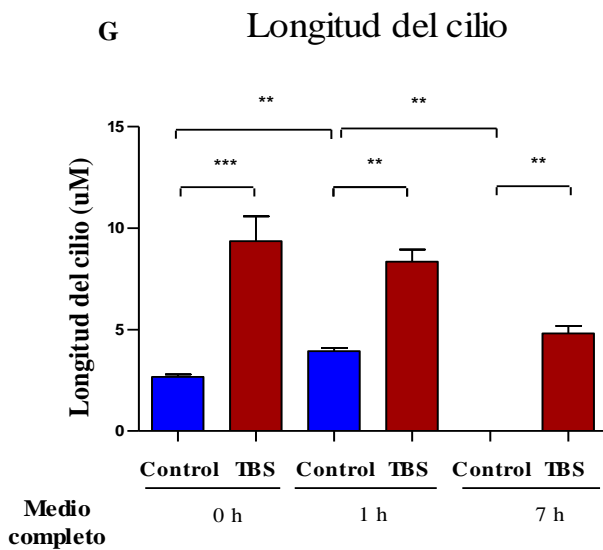
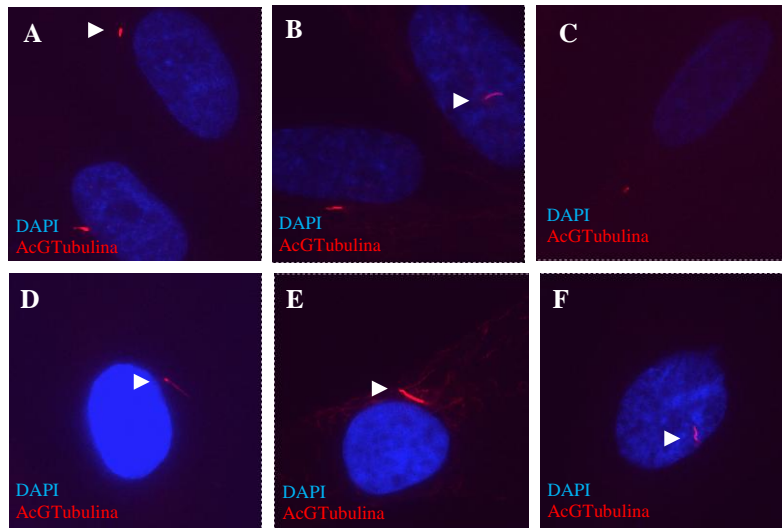


Figura 3. Longitud del cilio durante el proceso de reabsorción. (A-F) Micrografías de inmunofluorescencia que representan el proceso de reabsorción del cilio (▶) en individuos control (A-C) o paciente de TBS (D-F) en medio bajo en suero (A, D), a 1h (B,E) o a 7 h (C,F) tras la adición de medio completo. Núcleo marcado con DAPI (azul) y cilio marcado con gamma tubulina (rojo). (G) Representación gráfica de la longitud del cilio durante el proceso de reabsorción en fibroblastos de individuo control (azul) y paciente de TBS (rojo). (***) $p < 0,0001$; (**) $p < 0,001$ (Test de Mann Whitney) ($n > 5$).

CP110, una proteína represora de la ciliogénesis, está reducida en TBS durante el proceso de reabsorción del cilio

En vista de los resultados en los que se detectó la formación y reabsorción aberrantes del cilio en los fibroblastos de TBS, se analizó la dinámica de expresión de una proteína crucial para el proceso de ciliogénesis, CP110. Es importante resaltar que

en un análisis de espectrometría de masas realizado previamente en el laboratorio, CP110 se encontró asociada en mayor grado con SALL1 truncada que con SALL1 WT. Esto llevó a identificar a CP110 como candidata para contribuir en el desarrollo de TBS.

En primer lugar, se llevó a cabo la validación del análisis de espectrometría de masas de la candidata CP110 mediante las técnicas de *pull-down* de biotina y Western blot. Para ello, las células se transfectaron con un plásmido que contiene SALL1 truncada o WT fusionadas a BirA*. Tras capturar las proteínas biotiniladas, se identificó a CP110 en la proximidad tanto de SALL1 WT como de SALL1 truncada, pero apreciablemente más asociada a ésta última (Fig 4A). Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de CP110 durante la reabsorción por Western blot (Fig. 4B). Dado que CP110 es una proteína que cuando está presente inhibe la ciliogénesis, se observó un esperado aumento de la misma conforme el cilio se iba reabsorbiendo en células de control (Fig. 4B,C). Sin embargo, en células de paciente de TBS, los niveles de CP110 no son apreciables hasta que se induce la reabsorción del cilio durante 7 horas (Fig. 4B,C). La cuantificación de CP110 y normalización respecto a la actina muestra diferencias en los niveles de CP110 entre los individuos control y paciente consistentes con los resultados de longitud del cilio. (Fig. 4C).

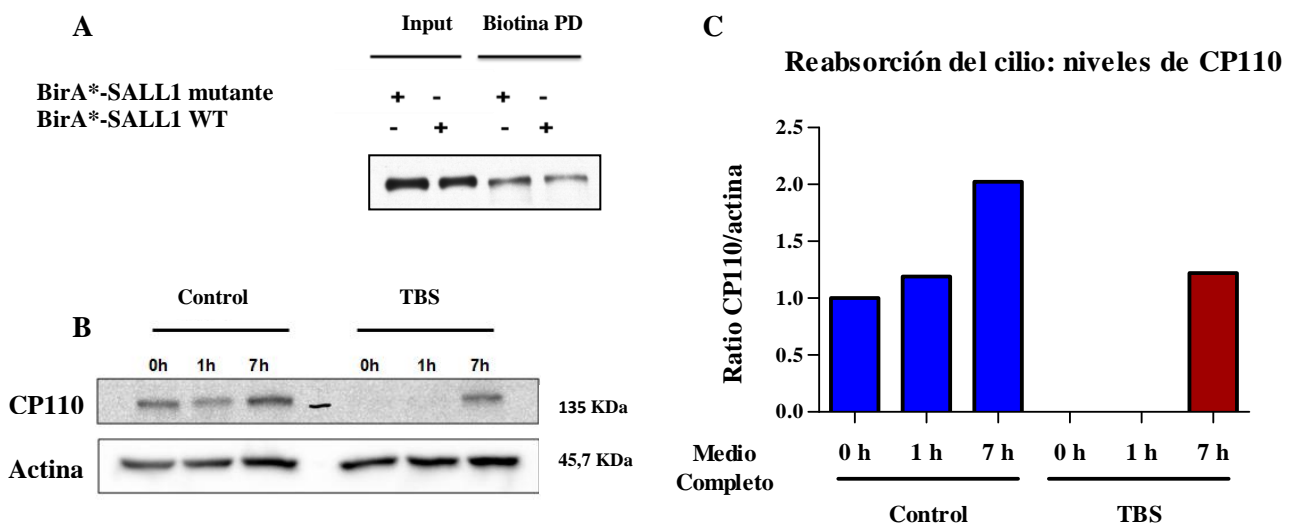


Figura 4. Niveles de CP110 e interacción con SALL1 durante la reabsorción del cilio. (A) Validación del análisis de espectrometría de masas para CP110 como candidato para interaccionar con SALL1 truncada y WT mediante Western blot. (B) Detección de CP110 endógena mediante Western blot. CP110 aumenta de manera progresiva en células control y la recuperación de los niveles de CP110 es más tardía en fibroblastos de paciente de TBS. Se usó actina como control de carga. (C) Cuantificación de los niveles de CP110 en individuo control (azul) y paciente de TBS (rojo) durante la reabsorción del cilio. La señal de CP110 fue normalizada primero frente a la actina y después frente a la condición 0 h del individuo control.

CP110 interacciona en mayor grado con el complejo formado por SALL1 WT y SALL1 truncada

Mediante la fusión con BirA*, hemos demostrado que CP110 se localiza en las proximidades de SALL1 WT y truncada. Para analizar si la interacción es directa o no, utilizamos *GFP pulldown* a partir de células HEK-293 FT transfectadas con los plásmidos mencionados en materiales y métodos.

Con la técnica de *GFP pulldown* se capturan las proteínas fusionadas a YFP y, a su vez, todas las que interactúan con ellas, detectándolas con sus correspondientes anticuerpos mediante Western blot. En primer lugar, observamos que SALL1 WT y SALL1 truncada forman un complejo ya que cuando se captura SALL1 truncada se detecta también SALL1 WT (Fig. 5, panel SALL1 WT, línea 7). Por otra parte, se observa que CP110 interacciona más fuertemente con SALL1 truncada que con SALL1 WT (panel CP110, línea 5 vs 6) y con mayor intensidad con el complejo formado entre SALL1 WT y truncada que con cada una de ellas individualmente (Fig. 5, panel CP110, línea 7 vs 5 y 6). Estos resultados demuestran una interacción aberrante de CP110 con el complejo SALL1 WT y truncada. La presencia de este nuevo complejo podría ser responsable de secuestrar a CP110 de su lugar de acción, el centrosoma, provocando allí un cambio en los niveles de CP110 y alterando la dinámica de la formación y reabsorción del cilio.

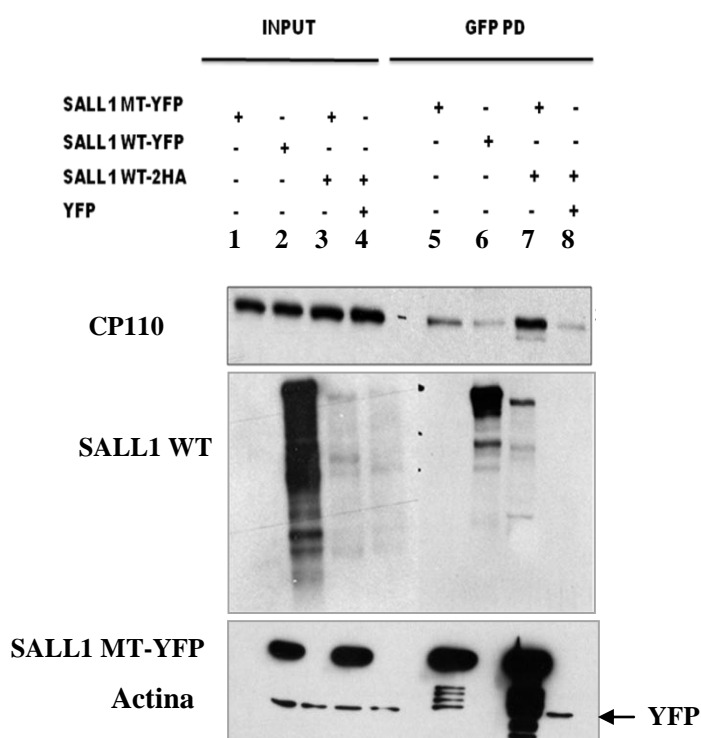


Figura 5. Interacción de CP110 con el complejo aberrante entre SALL1 WT y truncada. Mediante la captura de SALL1 *C826T*-YFP (SALL1 MT-YFP, se detecta SALL1 WT en el *pulldown* (GFP PD), demostrándose su interacción. La proteína CP110 se detecta con el anticuerpo anti-CP110 y SALL WT con el anticuerpo anti SALL1 (R&D). CP110 interacciona en mayor medida con el complejo formado por SALL1 WT y SALL1 truncada que con ellas individualmente. Se usó actina como control de carga y YFP como control de la transfección y *pulldown*.

DISCUSIÓN

TBS está causado por mutaciones en el gen *SALL1* que codifica para un factor de transcripción que se localiza en dominios de heterocromatina [3]. Experimentos previos en el laboratorio demostraron que la proteína SALL1 truncada sobre-expresada se localiza difusamente entre núcleo y citoplasma en líneas celulares de humano. El análisis de la localización de la proteína truncada endógena no ha sido posible dado que no existe un anticuerpo específico para su detección. Sin embargo, en este trabajo se ha detectado un cambio de localización de la proteína SALL1 WT, observándose en el núcleo y citoplasma de células que expresan la proteína truncada. Por otro lado, se ha confirmado la formación de un complejo SALL1 WT/truncada mediante la técnica *GFP pulldown*. Todos estos resultados apuntan a que la localización aberrante de SALL1 WT en células de paciente de TBS podría deberse a su reclutamiento en el citoplasma por parte de SALL1 truncada.

Sorprendentemente, parte de los síntomas que padecen los pacientes de TBS se corresponden con los característicos de las ciliopatías, resaltando la importancia del hallazgo de la presencia de SALL1 WT en el cilio [10]. Además, en este trabajo se ha observado la reducción de los niveles de SALL1 WT en el cilio de células de TBS. Este resultado es compatible con un escenario en el que la proteína truncada altere la localización de SALL1 WT, afectando la función que esta pueda tener en el cilio y contribuyendo al desarrollo de TBS. También se ha analizado la longitud del cilio en control y paciente. Las células de paciente presentan cilios más largos tanto en condiciones de formación como reabsorción del cilio.

Dichos cambios en la ciliogénesis podrían estar causados por la interacción de la proteína SALL1 truncada (o el complejo que forma con SALL1 WT) con un regulador de la ciliogénesis. Experimentos de espectrometría de masas previamente realizados en el laboratorio, y su validación mediante Western blot en este trabajo, identificaron a CP110 como candidato para mediar la función de SALL1 en TBS. CP110 es una proteína crucial para bloquear la ciliogénesis [12,13]. En el proceso de reabsorción del cilio se observó una ausencia casi total de CP110 en lisados de células de TBS hasta las 7 horas tras la inducción de la reabsorción. Esta es una dinámica de reabsorción mucho más tardía a la de las células control en las que se observa la presencia de CP110 desde

el principio y su expresión va aumentando conforme los cilios se dismantelan. Dado que CP110 bloquea la ciliogénesis, la ausencia o reducción de CP110 en el cilio de células de TBS es compatible con la presencia de cilios más largos y abundantes.

Por último, hemos comprobado que CP110 interacciona tanto con SALL1 WT como con SALL1 truncada mediante GFP *pulldown*. Sin embargo, interacciona en mayor grado con el complejo formado por SALL1 WT y truncada. Este aumento en la interacción podría ser causado por una nueva conformación tridimensional adoptada por el complejo formado por la proteína nativa y truncada, generando así un nuevo dominio de unión para CP110. Por tanto, el reclutamiento de CP110 por parte del complejo SALL1 WT/truncada en el citoplasma disminuiría los niveles de CP110 en el cuerpo basal del cilio. Esta hipótesis es compatible con resultados previos en el laboratorio en los que se detectó una disminución sustancial de CP110 en el cuerpo basal de cilios de células de TBS por inmunofluorescencia. Como consecuencia, la ciliogénesis no estaría completamente bloqueada y los cilios serían más largos y numerosos.

CONCLUSIÓN

Mutaciones en el gen *SALL1* generan proteínas truncadas que forman un complejo citoplásmico con la proteína SALL1 WT. Hemos demostrado en este trabajo que dicho complejo interacciona muy fuertemente con CP110, una proteína represora de la ciliogénesis. La disminución de CP110 y su secuestro del cuerpo basal de los cilios por parte del complejo SALL1 WT/truncada, conllevaría un incremento de su longitud y de la frecuencia de ciliación en el caso del paciente. Una menor presencia de CP110 en el cilio implicaría que la reabsorción del cilio se daría de una forma más tardía en pacientes de TBS. En conclusión, el cambio de localización de SALL1 WT y las interacciones aberrantes del nuevo complejo SALL1 WT/truncada con otras proteínas como CP110, podrían ser factores contribuyentes al desarrollo de TBS.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Barrio R, Shea MJ, Carulli J, Lipkow K, Gaul U, Frommer G, Schuh R, Jäckle H, Kafatos FC (1996) The spalt-related gene of *Drosophila melanogaster* is a member of an ancient gene family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene spalt. *Dev Genes Evol* 206: 315-325.

[2] Kohlhasse J, Schuh R, Dowe G, Kühnlein RP, Jäckle H, Schroeder B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Köhler A, Müller U, Raab-Vetter M, Burkhardt E, Engel W, Stick R (1996) Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the *Drosophila* gene spalt. *Genomics* 38: 291–298.

- [3] Netzer C1, Rieger L, Brero A, Zhang CD, Hinzke M, Kohlhase J, Bohlander SK (2001) SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/ PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum Mol Genet* 10: 3017–3024.
- [4] Lauberth SM, Rauchman M (2006) A Conserved 12-Amino Acid Motif in Sall1 Recruits the Nucleosome Remodeling and Deacetylase Corepressor Complex. *J Biol Chem* 281: 23922-31.
- [5] Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W (1998) Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes–Brocks syndrome. *Nat. Genet* 18: 81–3.
- [6] Kiefer SM, Ohlemiller KK, Yang J, McDill BW, Kohlhase J, Rauchman M (2003) Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes–Brocks syndrome birth defects. *Hum Mol Genet* 12: 2221-2227.
- [7] Townes PL, Brocks ER (1972) Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot and ear anomalies. *J Pediatr* 8: 321-326.
- [8] Kohlhase J, Taschner PE, Burfeind P, Pasche B, Newman B, Blanck C, Breuning MH, ten Kate LP, Maaswinkel-Mooy P, Mitulla B, Seidel J, Kirkpatrick SJ, Pauli RM, Wargowski DS, Devriendt K, Proesmans W, Gabrielli O, Coppa GV, Wesby-van Swaay E, Trembath RC, Schinzel AA, Reardon W, Seemanova E, Engel W (1999) Molecular Analysis of SALL1 Mutations in Townes-Brocks Syndrome. *Am J Hum Genet* 64: 435-445.
- [9] Powell CM, Michaelis RC (1999) Townes-Brocks syndrome. *J Med Genet* 36: 89-93.
- [10] Hildebra F, Benzing T, Katsanis N (2011) Ciliopathies. *N Engl J Med* 364: 1533-543.
- [11] Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M (2015) Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia* 4: 12.
- [12] Tsang WY, Dynlacht BD (2013) CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *Cilia* 2: 9.
- [13] Yadav SP, Sharma NK, Liu C, Dong L, Li T, Swaroop A (2016) Centrosomal protein CP110 controls maturation of the mother centriole during cilia biogenesis. *Development* 143: 1491-1501.