



Universitat de Lleida

Estudi de les funcions biològiques de les nucleases apoptòtiques EndoG, ExoG i TatD

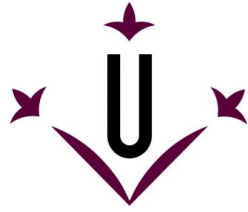
Gisel Barés Junqué

<http://hdl.handle.net/10803/671893>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida



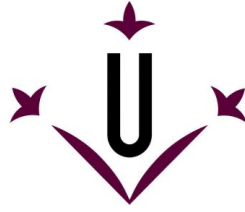
Estudi de les funcions biològiques de les nucleases apoptòtiques EndoG, ExoG i TatD

Universitat de Lleida - Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Gisel Barés Junqué

Directors: Daniel Sanchis Morales
Marta Llovera Tomàs

2020



Universitat de Lleida

Daniel Sanchis Morales i **Marta Llovera Tomàs**, Doctors en Ciències Biològiques, investigadors i professors agregats del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida, com a directors de la present tesi,

Fem constar que,

La graduada en Biotecnologia per la Universitat de Lleida **Gisel Barés Junqué**, ha realitzat sota la nostra direcció i supervisió dins del grup de Senyalització Cel·lular i Apoptosi del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, el treball experimental titulat **“Estudi de les funcions biològiques de les nucleases apoptòtiques EndoG, ExoG i TatD”**.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s'escau, obtenir el grau de **Doctor** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a Lleida, 7 d'Octubre de 2020

Dr. Daniel Sanchis Morales

Dra. Marta Llovera Tomàs

RESUMS

RESUM

Les nucleases formen una família de gens conservats evolutivament, que s'han involucrat en la mort cel·lular programada i en la proliferació cel·lular en eucariotes. Una de les nucleases mitocondrials més estudiades és EndoG, la qual va ser identificada pel nostre grup com a nucleasa implicada en degradació de l'ADN al miocardi durant la isquèmia. Tot i així, també presenta una funció rellevant en la fisiologia del cor, ja que la pèrdua de funció d'*Endog* en cardiomiòcits causa un augment de la massa ventricular esquerra. Recentment, el nostre laboratori ha descobert una funció d'EndoG relacionada amb la proliferació cel·lular. En els darrers anys s'ha suggerit que la nucleasa mitocondrial ExoG, paràleg d'EndoG en eucariotes superiors, podria dur a terme funcions similars a EndoG. Tot i així, encara no s'ha investigat la possible interdependència entre ExoG i EndoG tant a nivell d'expressió com en la seva funció sobre la proliferació. D'altra banda, TatD va ser descoberta com a nucleasa relacionada amb l'execució de la mort cel·lular programada en *C. elegans*. La disminució de TatD en el nematode produeix un fenotip semblant a l'observat amb el silenciament d'*Endog*. No obstant això, la seva funció en mamífers és desconeguda. En aquest treball es demostra que EndoG, ExoG i TatD tenen una expressió tissular diferencial entre elles. De les tres nucleases, només ExoG es troba més expressada en teixits neonatals respecte als adults (a excepció del cervell) suggerint un paper en el desenvolupament. Dels teixits analitzats, EndoG abunda principalment en el cor, ExoG en cervell i TatD té una distribució homogènia entre els diferents teixits. En quant a la localització subcel·lular, EndoG i ExoG són mitocondrials mentre que TatD, sorprenentment, és citosòlica. Tant la reducció d'*Endog* com *Exog* limita la proliferació cel·lular en línies no tumorals i en cultius primaris tridimensionals de glàndules d'un model de càncer d'endometri. En canvi, la disminució de l'expressió de *Tatd* no té cap efecte en la proliferació. A diferència d'EndoG, ExoG i TatD no canvien de compartiment cel·lular ni participen en la degradació de l'ADN nuclear sota isquèmia experimental en cardiomiòcits ni tampoc en models cel·lulars depenents de caspases. També hem demostrat que ExoG i EndoG regulen la mida dels cardiomiòcits probablement per mecanismes comuns, mentre que TatD no hi és implicada. La generació i estudi del nou model murí *Tatd*^{-/-} demostra que aquest gen no és essencial per la viabilitat i fertilitat del ratolí. Els ratolins *Tatd*^{-/-} presenten canvis en l'expressió de diversos transcrits a cor i a cervell que suggereixen un rol en processos que impliquen transport de proteïnes i senyalització cel·lular en aquests teixits. L'anàlisi conductual d'aquest model de ratolí revela dèficits locomotors compatibles amb la fatiga, sense símptomes de depressió i ansietat. En conjunt, les nostres dades mostren que ExoG i EndoG tenen funcions comunes en la regulació del creixement dels cardiomiòcits i en la proliferació cel·lular i que TatD podria estar implicada en la regulació de processos de transport de proteïnes al cor i al cervell, essent important per una correcta funció motora.

RESUMEN

Las nucleasas forman una familia de genes conservados evolutivamente, que se han involucrado en la muerte celular programada y en la proliferación celular en eucariotas. Una de las nucleasas mitocondriales más estudiadas es EndoG, la cual fue identificada por nuestro grupo como nucleasa implicada en degradación del ADN en el miocardio durante la isquemia. Sin embargo, también presenta una función relevante en la fisiología del corazón, ya que la pérdida de función de *Endog* en cardiomiocitos causa un aumento de la masa ventricular izquierda. Recientemente, nuestro laboratorio ha descubierto una función de EndoG relacionada con la proliferación celular. En los últimos años se ha sugerido que la nucleasa mitocondrial ExoG, paróloga de EndoG en eucariotas superiores, podría llevar a cabo funciones similares a EndoG. Sin embargo, aún no se ha investigado la posible interdependencia entre ExoG y EndoG tanto a nivel de expresión como en su función sobre la proliferación. Por otra parte, TatD fue descubierta como una nucleasa relacionada con la ejecución de la muerte celular programada en *C. elegans*. La disminución de TatD en el nematodo produce un fenotipo similar al observado con el silenciamiento de *Endog*. Sin embargo, su función en mamíferos es desconocida. En este trabajo se demuestra que EndoG, ExoG y TatD tienen una expresión tisular diferente entre ellas. De las tres nucleasas, sólo ExoG se encuentra más expresada en tejidos neonatales respecto a los adultos (a excepción del cerebro) sugiriendo un papel en el desarrollo. De los tejidos analizados, EndoG abunda principalmente en el corazón, ExoG en cerebro y TatD tiene una distribución homogénea entre los diferentes tejidos. En cuanto a la localización subcelular, EndoG y ExoG son mitocondriales mientras que TatD, sorprendentemente, es citosólica. Tanto la reducción de *Endog* como *Exog* limita la proliferación celular en líneas no tumorales y en cultivos primarios tridimensionales de glándulas de un modelo de cáncer de endometrio. En cambio, la disminución de la expresión de *Tatd* no tiene ningún efecto en la proliferación. A diferencia de EndoG, ExoG y TatD no cambian de compartimento celular ni participan en la degradación del ADN nuclear bajo isquemia experimental en cardiomiocitos ni tampoco en modelos celulares dependientes de caspasas. También hemos demostrado que ExoG y EndoG regulan el tamaño de los cardiomiocitos probablemente por mecanismos comunes, mientras que TatD no está implicada. La generación y estudio del nuevo modelo murino *Tatd*^{-/-} demuestra que este gen no es esencial para la viabilidad y fertilidad del ratón. Los ratones *Tatd*^{-/-} presentan cambios en la expresión de varios transcritos en corazón y cerebro que sugieren un rol en procesos que implican transporte de proteínas y señalización celular en estos tejidos. El análisis conductual de este modelo de ratón revela déficits locomotores compatibles con la fatiga, sin síntomas de depresión y ansiedad. En conjunto, nuestros datos muestran que ExoG y EndoG tienen funciones comunes en la regulación del crecimiento de los cardiomiocitos y en la proliferación celular y que TatD podría estar implicada en la regulación de procesos de transporte de proteínas en el corazón y el cerebro, siendo importante para una correcta función motora.

ABSTRACT

Nucleases are a family of evolutionarily conserved genes, which have been implicated in programmed cell death and cell proliferation in eukaryotes. One of the most studied mitochondrial nuclease is EndoG, which was identified by our group as a nuclease involved in DNA degradation in the myocardium during ischemia. However, it also plays an important role in the physiology of the heart, as the loss of Endog function in cardiomyocytes causes an increase in left ventricular mass. Recently, our laboratory has discovered a novel EndoG function related to cell proliferation. It has been suggested in recent years that ExoG mitochondrial nuclease, a paralog of EndoG in higher eukaryotes, may perform similar functions to EndoG. However, the interdependence between ExoG and EndoG both in terms of expression and its function on proliferation has not yet been investigated. On the other hand, TatD was discovered as a nuclease related to the execution of programmed cell death in *C. elegans*. TatD silencing in the nematode produces a phenotype similar to that observed with Endog silencing. However, its function in mammals is unknown. EndoG, ExoG and TatD have different tissue expression between them. Interestingly, ExoG is found to be more expressed in neonatal tissues than in adults (except the brain) suggesting a role in development. EndoG is mainly expressed in heart, whereas ExoG is highly expressed in brain, and TatD has a homogeneous distribution among the analyzed tissues. In terms of subcellular localization, EndoG and ExoG are found in mitochondria, but TatD is a cytosolic protein. Both Endog and Exog reduction limit cell proliferation in non-tumor lines and in three-dimensional primary cultures of an endometrial cancer model. In contrast, decreased Tatd expression has no effect on proliferation. Unlike EndoG, ExoG and TatD do not change cell compartment or participate in the degradation of nuclear DNA under experimental ischemia in cardiomyocytes or in caspase-dependent cell models. We have also shown that ExoG and EndoG, but not TatD, regulate the size of cardiomyocytes probably through common mechanisms. The generation and study of the new mouse model *Tatd*^{-/-} shows that this gene is not essential for the viability and fertility of the mouse. *Tatd*^{-/-} mice exhibit changes in the expression of various heart and brain transcripts that suggest a role in several processes involved in protein transport and cell signaling in these tissues. Behavioral analysis of this mouse model revealed locomotor deficits compatible with fatigue, without symptoms of depression and anxiety. Taken together, our data show that ExoG and EndoG have common functions in cardiomyocyte growth and cell proliferation, and TatD could be involved in the regulation of protein transport in heart and brain, being important for a normal motor function.

ÍNDEX

RESUMS	3
ÍNDEX.....	7
INTRODUCCIÓ.....	13
1. El cor: composició, desenvolupament i resposta a estrès.....	14
1.1 Arquitectura i funció del cor	14
1.2 Estructura del cardiomiòcit i múscul cardíac	15
1.3 Proliferació i diferenciació dels cardiomiòcits	16
1.4 Hipertròfia cardíaca	18
1.4.1 Vies d'inducció de la hipertròfia cardíaca	20
1.4.1.1 Mecanismes d'inducció de la hipertròfia fisiològica	20
1.4.1.2 Mecanismes d'inducció de la hipertròfia patològica.....	21
1.5 Paper de la senyalització per apoptosi en el cor	23
2. Nucleases apoptòtiques	26
2.1 Funcions apoptòtiques de les nucleases.....	26
2.1.1 Endonucleasa G.....	27
2.1.2 Endonuclease G-like 1 (ExoG)	28
2.1.3 TatD.....	29
2.2 Funcions no apoptòtiques d'EndoG, ExoG i TatD.....	30
2.2.1 Endonucleasa G.....	30
2.2.2 Endonuclease G-like 1 (ExoG)	31
2.2.3 TatD.....	32
3. Proliferació cel·lular: control del cicle i càncer	34
3.1 Regulació per les quinases dependents de ciclines.....	34
3.2 Punts de control durant el cicle	35
3.3 Desregulació del cicle cel·lular i càncer.....	36
3.3.1 Gen supressor tumoral PTEN	36
3.3.1.1 Activitat de PTEN en la via PI3K/Akt/mTOR	37
3.3.1.2 PTEN i carcinoma d'endometri.....	38
3.3.1.3 Estudi de PTEN en models animals.....	40
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	42

MATERIALS I MÈTODES	44
1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	45
1.1 Consideracions prèvies	45
1.2 Animals.....	45
1.2.1 Rates <i>Sprague-Dawley</i>	45
1.2.2 Ratolins <i>Endog^{-/-}</i>	45
1.2.3 Ratolins <i>Pten^{-/-}</i> i <i>Endog^{-/-}</i>	46
1.2.4 Ratolins <i>Tatd^{-/-}</i>	47
1.3 Genotipatge de ratolins	50
1.4 Tests de comportament de ratolins <i>Tatd^{-/-}</i>	52
1.4.1 CAMP OBERT/ NORT	53
1.4.2 PLUS MAZE	53
1.4.3 T-SAT	53
1.4.4 ROTAROD ACCELERATIU	54
1.4.5 FORÇA D'ADHERÈNCIA	54
1.4.6 TEST DE NATACIÓ FORÇADA	54
1.4.7 EVITACIÓ PASSIVA.....	54
2. BIOLOGIA CEL·LULAR	55
2.1 Cultius cel·lulars	55
2.1.1 Línies cel·lulars tumorals humanes.	56
2.1.2 Línia cel·lular HEK293T	57
2.1.3 Línia cel·lular Rat-2.....	57
2.1.4 Cultiu de cardiomiòcits primaris de rata i ratolí.....	58
2.1.5 Cultiu de fibroblasts primaris de ratolí.....	59
2.1.6 Cultiu de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí	60
2.2 Obtenció de partícules lentivirals en la línia cel·lular HEK293T	61
2.3 Transducció cel·lular	62
2.4 Sobreexpressió de TatD-FLAG	62
2.5 Anàlisi de la proliferació cel·lular	62
2.6 Anàlisi de la proliferació mitjançant assaig d'incorporació de la BrdU	62
2.7 Recompte de cardiomiòcits procedents de teixit cardíac.....	63
2.8 Subfraccionament cel·lular	63

2.9	Immunofluorescència (IF)	65
2.10	Citometria de flux.	66
3.	BIOLOGIA MOLECULAR.....	67
3.1	Estratègia general d'inserció d'un insert en un plasmidi	67
3.2	Test per la identificació de colònies positives per l'insert	67
3.3	Purificació del vector amb l'insert	68
3.4	Silenciament de l'expressió gènica per interferència d'ARN	68
3.5	Disseny d'oligonucleòtids.....	69
3.6	Subclonatge del shRNA en el vector pSUPER.....	71
3.7	Subclonatge del shRNA en el vector pLVTHM.....	71
3.8	Subclonatge de TatD-FLAG.....	72
3.9	Transcripció Reversa i Reacció en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	72
3.9.1	Extracció d'ARN.....	72
3.9.2	Transcripció reversa (RT).....	72
3.9.3	PCR en temps real	72
3.10	Micro-array d'expressió gènica	73
4.	BIOQUÍMICA	74
4.1	Western Blot (WB)	74
4.2	Anàlisi de la degradació de l'ADN per electroforesi –CHEF i LADDER.....	78
4.3	Activitat nucleasa in vitro.....	80
5.	ANÀLISI ESTADÍSTIC	80
	RESULTATS.....	81
	Bloc Endog	82
1.	Caracterització de l'expressió d' <i>Endog</i> en línies tumorals d'endometri, tiroïdes, colon i leucèmia	83
2.	Efecte d' <i>Endog</i> sobre la proliferació en línies tumorals d'endometri, tiroïdes i colon	84
3.	Caracterització dels nivells de fosforilació d'Akt en línies cel·lulars de glioblastoma	86
4.	Efecte d' <i>Endog</i> sobre la proliferació en les línies tumorals de glioblastoma	86
5.	Estudi de l'efecte de la reducció d' <i>Endog</i> en cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri	87
6.	Generació del model animal $Cre-ER^{T +/ -} Pten^{fl/fl} Endog^{-/-}$	89
7.	Estudi de l'efecte en proliferació en el model $Cre-ER^{T +/ -} Pten^{fl/fl} Endog^{-/-}$	90

Bloc Exog	94
1. Caracterització de l'expressió d'ExoG.....	95
1.1 ExoG en diferents teixits de rates neonatals i adultes.....	95
1.2 ExoG en diferents àrees de cervell de rates adultes.....	96
1.3 ExoG en cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs.....	98
2. Anàlisi de la translocació d'ExoG durant la isquèmia experimental.....	99
3. Estudi de l'efecte de la disminució d'Exog.....	100
3.1 ExoG i la integritat de l'ADN nuclear durant la mort cel·lular.....	100
3.2 ExoG i la hipertròfia dels cardiomiòcits.....	102
3.3 ExoG i la proliferació cel·lular.....	103
3.3.1 ExoG i proliferació de fibroblasts de rata Rat-2.....	103
3.3.2 ExoG i la proliferació de cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri	106
Bloc Tatd	109
1. Estudi de la seqüència, expressió i distribució subcel·lular de Tatd.....	110
1.1 Comparació de la seqüència d'aminoàcids de <i>Tatd</i> en diferents espècies.....	110
1.2 Anàlisi de l'expressió de <i>Tatd</i> en teixits de ratolins neonatals i adults.....	111
1.3 Estudi de la localització cel·lular de <i>Tatd</i>	112
1.4 Estudi de l'efecte de la disminució de <i>Tatd</i> en la integritat de l'ADN nuclear durant la mort cel·lular.....	115
2. Caracterització d'un nou model murí <i>Tatd</i> ^{-/-}	116
2.1 Procediment utilitzat per l'obtenció del ratolí <i>Tatd</i> ^{-/-}	116
2.2 Caracterització del fenotip dels animals <i>Tatd</i> ^{-/-}	120
2.3 Estudi del nombre i de la mida dels cardiomiòcits <i>Tatd</i> ^{-/-}	121
2.4 Estudi dels nivells de proliferació en fibroblasts de pell <i>Tatd</i> ^{-/-}	122
2.5 Estudi de la integritat de l'ADN nuclear en el ratolí <i>Tatd</i> ^{-/-}	122
2.6 Anàlisi semi-quantitatiu de l'activitat nucleasa de <i>Tatd</i>	123
2.7 Comparació transcriptòmica de ratolins <i>Tatd</i> ^{+/+} i <i>Tatd</i> ^{-/-} en teixit cardíac i neuronal...	125
2.8 Caracterització neurocomportamental del ratolí <i>Tatd</i> ^{-/-}	130
DISCUSSIÓ.....	135
1. L'expressió i la funció en proliferació d'ENDOg és heterogènia entre línies tumorals.....	136
2. EndoG participa en la proliferació de les glàndules de càncer d'endometri en el model de ratolí <i>Pten</i> ^{-/-}	138

3. ExoG és important en teixits en desenvolupament.....	140
4. L'expressió d'ExoG i EndoG divergeix en la distribució tissular.....	141
5. Les nucleases ExoG i EndoG responen diferent sota estímuls d'estrès.....	142
6. ExoG i EndoG participen en la divisió cel·lular en diferents models <i>in vitro</i>	143
7. TatD no participa en la degradació de l'ADN en cèl·lules de mamífer	144
8. TatD és prescindible per l'embriogènesi i proliferació cel·lular en el ratolí	146
9. Caracterització dels canvis transcriptòmics deguts a l'eliminació del gen <i>Tatd</i> al ratolí	147
10. Els ratolins <i>Tatd</i> ^{-/-} presenten dèficits locomotors	148
CONCLUSIONS	149
BIBLIOGRAFIA	151

INTRODUCCIÓ

1. El cor: composició, desenvolupament i resposta a estrès

1.1 Arquitectura i funció del cor

El cor és l'òrgan que proporciona la sang i l'oxigen a totes les parts del cos. Es troba dividit per un septe que separa les quatre cambres presents al cor (aurícula dreta, aurícula esquerra, ventricle dret i ventricle esquerre). El cor està situat dins de la cavitat toràcica i envoltat per un sac ple de fluid anomenat pericardi. El pericardi és un tipus de membrana serosa que produeix el fluid necessari per tal de lubricar el cor i així evitar la fricció entre el cor i els altres òrgans. La paret del cor està formada per tres capes, les quals són l'epicardi (capa exterior i forma part del pericardi), el miocardi (forma el teixit cardíac muscular, responsable de bombejar la sang i és el que dóna la massa i gruixària al cor) i l'endocardi (capa endotelial que protegeix les cambres cardíques).

A nivell cel·lular, el cor està format per diferents tipus cel·lulars que contribueixen a les propietats estructurals, bioquímiques, mecàniques i elèctriques del mateix. D'entre ells destaquen els cardiomiòcits, que ocupen la major part del volum tissular, però només contribueixen al 30% del nombre total de cèl·lules. Els cardiomiòcits auriculars i ventriculars formen les parets musculars del cor (és a dir, el miocardi). Més del 50% de les cèl·lules del cor són fibroblasts cardíacs. Les cèl·lules endotelials formen l'endocardi, el revestiment interior dels vasos sanguinis i les vàlvules cardíques. Les cèl·lules del múscul llis contribueixen al sistema vascular d'entrada i sortida de les artèries coronàries. L'epicardi dóna lloc als precursors de la vasculatura coronària i dels fibroblasts cardíacs. Finalment, les cèl·lules *pacemaker* i les fibres de Purkinje són cardiomiòcits especialitzats que generen i condueixen impulsos elèctrics. El node sinoatrial (SAN), que està compost per un grup de cèl·lules pacemaker, resideix a l'aurícula dreta generant impulsos per iniciar la contracció cardíaca. El node atrioventricular (AVN) està situat entre les aurícules i els ventricles, i condueix l'impuls elèctric des de les aurícules fins als ventricles¹.

El cor actua com una doble bomba. L'aurícula dreta rep sang desoxigenada de les venes sistèmiques (vena cava superior i inferior) i circula a través de la vàlvula tricúspide cap al ventricle dret, on es bombeja via la vàlvula pulmonar semilunar i mitjançant l'artèria pulmonar cap als pulmons, on s'alliberarà el diòxid de carboni i es captarà l'oxigen (intercanvi de gasos). La sang torna a través de la vena pulmonar cap a l'aurícula

esquerra, circula a través de la vàlvula bicúspide o mitral cap al ventricle esquerre, on es bombejarà a través de la vàlvula aòrtica semilunar cap a l'aorta i finalment cap a la resta del cos (Figura 1).

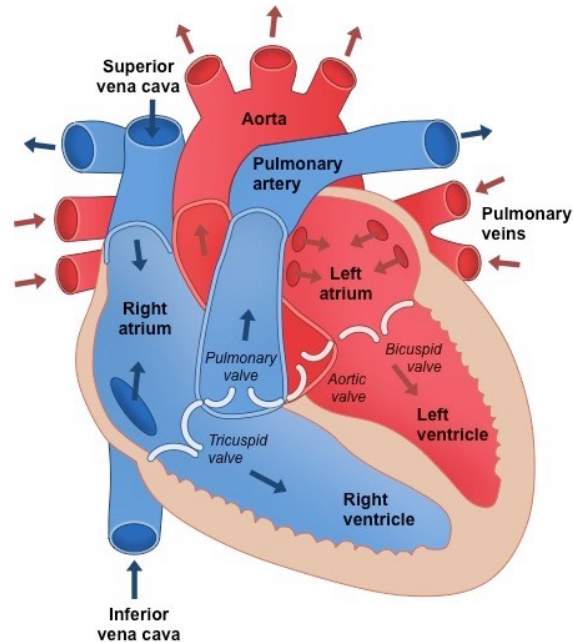


Figura 1. Anatomia del cor. Tall transversal d'un cor. Mostra la part interna del cor formada de les quatre cambres, vàlvules i vasos associats¹.

1.2 Estructura del cardiomiòcit i múscul cardíac

Els cardiomiòcits són cèl·lules d'uns 25 μm de diàmetre i 100 μm de longitud, formats per miofibril·les, que són llargues cadenes de proteïnes contràctils compostes per filaments de miosina (bandes A) i filaments d'actina (bandes I) que se superposen. A aquestes cadenes s'associen un conjunt de proteïnes, com la troponina i la tropomiosina entre altres, que participen en el procés de contracció muscular i són essencials per regular la unió i alineació dels miofilaments constituint així els sarcòmers. El sarcòmer és la unitat funcional contràctil de la cèl·lula².

Els cardiomiòcits es troben separats entre si per una estructura d'unió anomenada disc intercal·lar. Aquest disc és el que permet que les corrents que es generin en una cèl·lula es propaguin a la següent. El sarcolemma és la membrana del cardiomiòcit, la qual presenta invaginacions cap a l'interior de la cèl·lula formant els túbuls T. La funció d'aquests és ampliar la superfície de contacte de l'exterior amb l'interior cel·lular, amb la finalitat de

facilitar que els intercanvis iònics a través de la membrana es produeixin de manera ràpida i sincrònica. Per aquest motiu, es troben en contacte amb el reticle sarcoplàsmic a través d'unes estructures anomenades cisternes terminals. Aquestes, emmagatzemen el Ca^{2+} i l'alliberen durant la contracció muscular. El procés de contracció es desencadena al produir-se canvis de potencial d'acció en la membrana del cardiomiòcit, que provoquen l'obertura de canals de calci sensibles a voltatge. L'entrada de Ca^{2+} en la cèl·lula causa l'activació dels receptors de rianodina (RyR2) que es troben en la membrana del reticle sarcoplàsmic. L'activació d'aquests receptors permet una sortida de Ca^{2+} massiva des del reticle sarcoplàsmic al citoplasma provocant canvis conformacionals en la troponina, fet que permet que la miosina llisqui sobre l'actina escurçant la fibra muscular. Passat l'impuls nerviós, el Ca^{2+} és captat al reticle sarcoplàsmic una altra vegada per completar la relaxació³.

El múscul cardíac és un múscul estriat. Les fibres del múscul cardíac presenten una estriació transversal en el seu citoplasma i es bifurquen formant una red tridimensional complexa. Existeixen dos tipus de fibres cardíques: les conductores i les contràctils. Les fibres conductores es troben localitzades en els nòduls sinoauriculars i auriculoventriculars i són les encarregades de la conducció dels impulsos nerviosos. No tenen túbuls T ni discs intercalars, presenten un baix nombre de miofilaments i una gran quantitat de grànuls de glucogen. Les fibres contràctils tenen una estriació transversal amb un o dos nuclis ovalats amb un o dos nuclèols. En les cares laterals presenten unions de tipus Gap, que permeten la transmissió de la ona de despolarització. D'aquesta manera es produeix la contracció al mateix temps en totes les fibres cardíques^{4,5}.

El múscul cardíac és aeròbic, amb un elevat nombre de mitocondries i gairebé sense reserves energètiques en forma de lípids o glucogen. Per aquesta raó, l'aportació d'oxigen i nutrients a través de la sang ha de ser contínua per tal de satisfer la demanda energètica il·limitada del cor³.

1.3 Proliferació i diferenciació dels cardiomiòcits

La major part del cor està format per cèl·lules musculars contràctils, les quals són els cardiomiòcits. Els cardiomiòcits constitueixen aproximadament el 75% del volum total del miocardi però són minoritaris pel que fa en nombre de cèl·lules (només el 30%)⁶.

La proliferació i la diferenciació són dos aspectes diferents del creixement cel·lular. Després del naixement, els miòcits cardíacs perden la capacitat de proliferar i l'augment en la massa cardíaca és deguda a l'increment en mida dels miòcits cardíacs preexistents.

El canvi del creixement hiperplàsic a hipertròfic passa durant el període postnatal primerenc. Gairebé tots els miòcits són mononucleats i el volum cel·lular es manté constant durant els 3 primers dies d'edat. L'augment en volum dels miòcits té lloc del dia 3 al dia 12. El percentatge de miòcits binucleats comença a augmentar al quart dia, aconseguint un 90% de binucleació al dia 12. El nombre de miòcits augmenta el 68% durant els tres primers dies d'edat i després aquest nombre es manté constant⁷. En la Figura 2 es troba representada la morfologia dels cardiomiòcits a diferents edats.

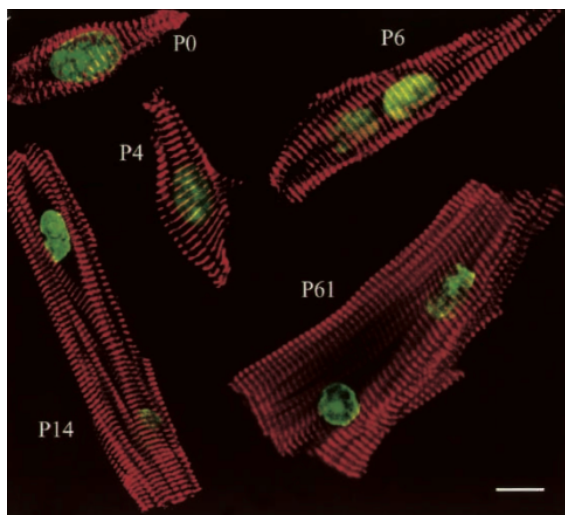


Figura 2. Cardiomiòcits de ratolí en cultiu *in vitro* fixats a diferents edats (P0, P4, P6, P14, P60). Els cardiomiòcits estan marcats en vermell i els nuclis en verd. A P0 i P4 són arrodonits, petits i mononucleats. A partir de P6 comencen a tenir dos nuclis i creixen en mida fins arribar a P61, on la cèl·lula ja és adulta⁷.

Quan el percentatge de miòcits binucleats comença a incrementar, es prepara la síntesi de l'ADN per la divisió nuclear, però no es produeix la citocinesi. Els miòcits ventriculars perden l'habilitat de realitzar la citocinesi abans de la sortida del cicle cel·lular, resultant en la formació dels miòcits binucleats. Durant els 3 primers dies d'edat, l'increment en la massa del cor és deguda només a la proliferació dels miòcits, amb un volum cel·lular constant. Després del dia 4, el creixement continuat del cor s'aconsegueix per la hipertròfia del miòcit⁸ (Figura 3).

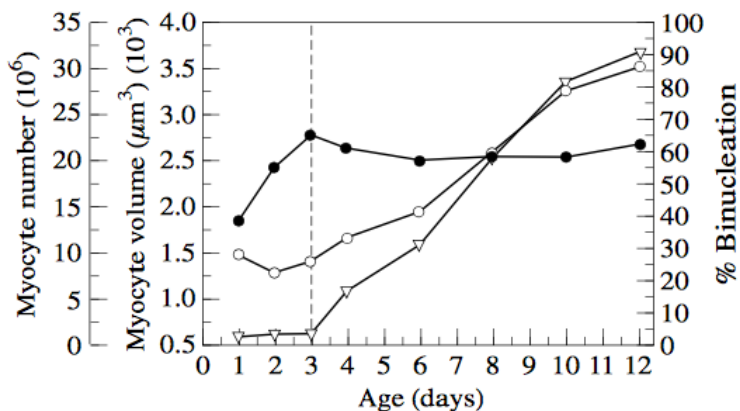


Figura 3. Canvis en el nombre de miòcits per cor (●), el volum de miòcits (○) i el percentatge de nucleació (△) en cèl·lules contràctils aïllades de cors de rates neonatals a 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 i 12 dies d'edat⁸. Als 3 dies d'edat s'aconsegueix el pic màxim en el nombre de miòcits. En aquest moment (3-4 dies d'edat), el volum de miòcits augmenta progressivament. També augmenta el percentatge de miòcits binucleats indicant la cessació de la hiperplàsia cel·lular del miòcit.

1.4 Hipertròfia cardíaca

La hipertròfia és definida com un engrandiment d'un òrgan degut a l'increment en la mida de les seves cèl·lules. Depenent de l'estímul es poden induir dos tipus diferents d'hipertròfia cardíaca, la hipertròfia cardíaca fisiològica i la patològica.

La hipertròfia cardíaca fisiològica és la que s'associa amb el creixement normal del cor després del naixement fins l'edat adulta. Aquest tipus d'hipertròfia també és associada amb l'exercici o durant l'embaràs. En canvi, la hipertròfia cardíaca patològica és deguda a desordres com períodes llargs d'hipertensió, infart de miocardi, malalties de les artèries coronàries, insuficiència valvular, malformacions congènites i cardiomiopatia diabètica. La majoria d'aquests estímuls primer indueixen una hipertròfia compensatòria, en la que els miòcits individuals creixen en llargada i/o amplada amb la finalitat d'augmentar la funció cardíaca. També es produeix un increment en la deposició de col·làgens i components de la matriu extracel·lular (fibrosi). Finalment, a mesura que es van depositant les fibres de col·lagen la funció cardíaca és alterada progressivament i té lloc una fallada cardíaca⁹.

El creixement hipertròfic pot ser concèntric o excèntric, basat en la geometria dels cardiomiòcits individuals i del cor (Figura 4). La hipertròfia excèntrica no patològica és caracteritzada per un increment en el volum ventricular amb un creixement coordinat en el gruix de la paret i el septe, on els cardiomiòcits individuals creixen en amplada i llargada. Sota condicions patològiques, la hipertròfia excèntrica pot provocar la dilatació de la paret

amb un preferent allargament dels cardiomiòcits ja que es produeix un gran augment en el volum ventricular i un menor increment en la paret. En la hipertròfia concèntrica es produeix un increment en el gruix de la paret i una disminució de la cambra ventricular esquerra. Aquesta remodelació és associada amb un increment en l'amplada del miòcit¹⁰.

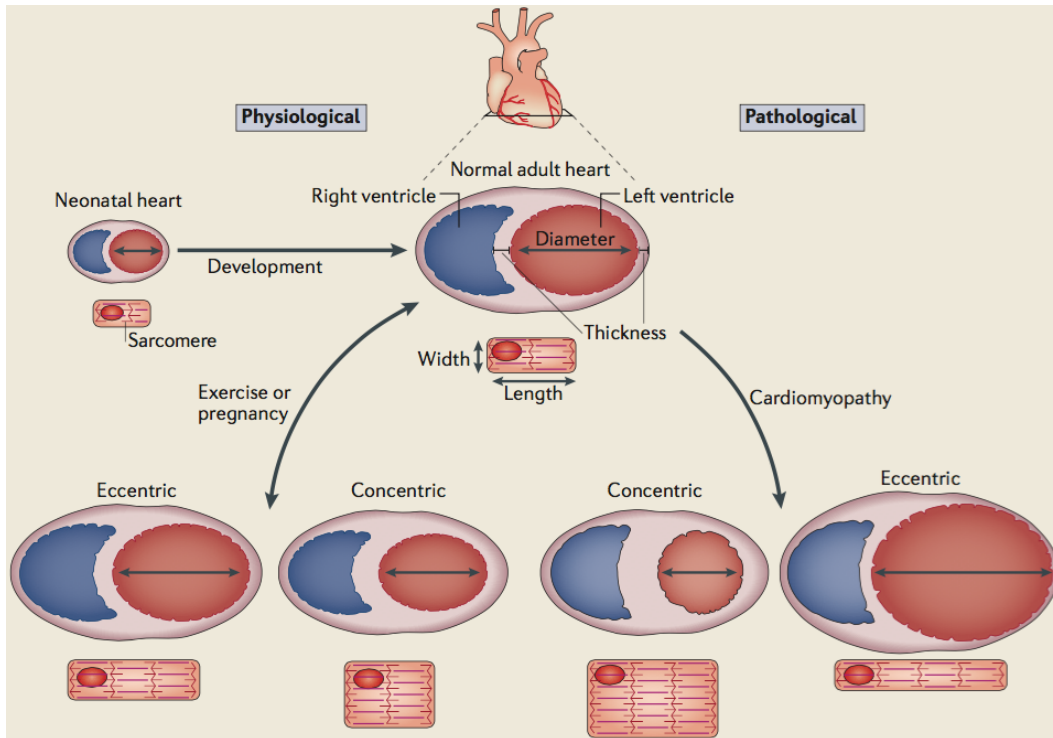


Figura 4. Geometries de la hipertròfia cardíaca¹⁰. Depenent de l'estímul es poden induir dos tipus d'hipertròfia, la fisiològica i la patològica originant així diferents formes de cardiomiòcits.

La hipertròfia cardíaca és acompanyada per la reprogramació i activació de l'expressió de gens cardíacs fetals, que codifiquen per proteïnes involucrades en la contracció, en el maneig del calci i en el metabolisme¹¹.

El cor és un òrgan capaç de metabolitzar una ampla gamma de substrats, inclosos àcids grassos, glucosa, cossos cetònics, lactat i aminoàcids, per satisfer una demanda contínua d'ATP¹². Sota condicions fisiològiques, el 90% d'ATP és produït mitjançant la fosforilació oxidativa mitocondrial dels àcids grassos. Degut a que l'oxidació dels àcids grassos és un procés completament depenent de l'oxigen, durant la isquèmia on el subministrament de l'oxigen pot estar molt limitat, la glicòlisi es converteix en la principal via metabòlica per generar energia en el cor¹³⁻¹⁵.

1.4.1 Vies d'inducció de la hipertròfia cardíaca

S'han identificat múltiples vies de senyalització intracel·lular en la coordinació del creixement del cor després d'una estimulació fisiològica i patològica¹⁶. En la Figura 5 es troben representades de manera esquemàtica molècules implicades en ambdós tipus d'hipertròfia.

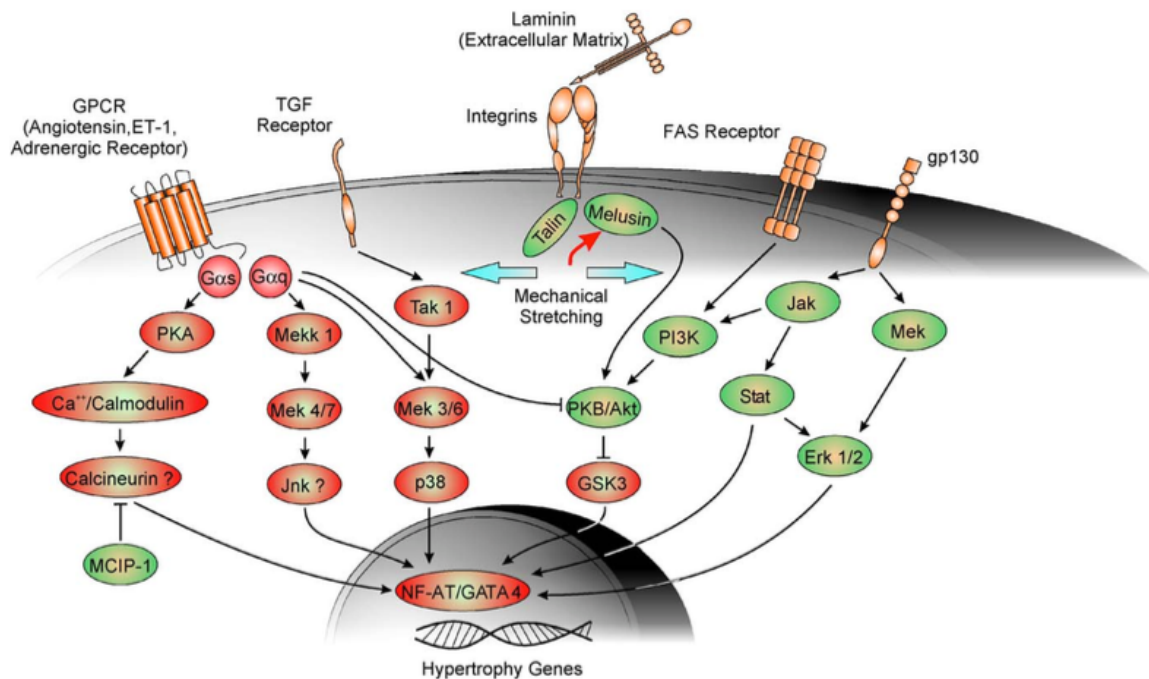


Figura 5. Molècules activades en la senyalització intracel·lular durant la hipertròfia cardíaca fisiològica i patològica¹⁶. Les molècules representades de color verd quan són activades exerceixen un rol protector en la progressió cap a la fallada cardíaca. En canvi, l'activació de les molècules representades de color vermell afavoreixen la transició cap a fallada cardíaca.

1.4.1.1 Mecanismes d'inducció de la hipertròfia fisiològica

La hipertròfia fisiològica pot ser induïda per diferents lligands, els qual inclouen l'hormona de creixement, l'hormona de la tiroides, insulina, IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) i VEGF (*vascular endothelial growth factors*). La hormona de la tiroides incrementa en els nens i ratolins després del naixement actuant com a activador transcripcional de creixement post-natal. En el cor, la senyalització de la insulina directament afecta al transport de la glucosa, la glicòlisi, l'oxidació de la glucosa, la síntesi del glicogen, l'oxidació d'àcids grassos i la síntesi de proteïna. La insulina s'uneix al seu receptor tirosina quinasa (IR) i es produeix la seva activació, la qual permet el reclutament i activació de les proteïnes adaptadores IRS1 i IRS2 (*insulin receptor substrate*), que aquestes finalment causaran

l'activació de la via de senyalització fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT. El lligant IGF1 és sintetitzat i secretat en el fetge en resposta a l'hormona de creixement i és enviat als teixits on mediarà el seu creixement. El lligant IGF1 s'uneix tant al receptor de la insulina com al receptor d'IGF1 (IGF1R), un receptor transmembrana tirosina quinasa que activa la via PI3K-AKT^{10,17}.

La sobreexpressió de les quinases PI3K i AKT promou una hipertròfia amb característiques fisiològiques amb absència de fibrosi en animals joves^{18,19}. AKT promou la traducció de proteïnes mitjançant la inhibició per fosforilació de GSK3 β (glycogen synthase kinase-3). Quan GSK3 β està activa fosforila i inhibeix diverses molècules involucrades amb la hipertròfia cardíaca^{20,21}. Així doncs, la sobreexpressió de GSK3 β en el cor adult bloqueja la hipertròfia postnatal²². La deleció de la fosfatasa PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa), que actua com un inhibidor endogen de la PI3K, promou el creixement del cor a nivells cel·lulars i d'organ²³.

També està implicada la via de les MAPK (*Mitogen- activated protein kinase*) ERK1/2 (*Extracellular-signal regulated kinases*) en la hipertròfia fisiològica. La sobreexpressió de ERK1/2 indueix una hipertròfia cardíaca concèntrica sense fibrosi i un augment significatiu en la funció cardíaca que és associada a una protecció del cor en front a un dany isquèmic²⁴. D'acord amb aquestes observacions, la inhibició de ERK1/2 resulta en una dilatació cardíaca major sota un estímul d'estrès²⁵. Es van observar resultats similars en ratolins amb una disrupció de ERK1/2 en el cor, mostrant fallada cardíaca sota estrès²⁶. Per tant, la via de senyalització ERK1/2 és un component important en la resposta hipertròfica adaptativa i de fet, protegeix als cardiomiòcits de la mort després d'un dany isquèmic²⁷.

La hipertròfia fisiològica també es pot produir a través de l'activació de sensors d'estirament, entre ells les integrines associades a proteïnes quinasa. Les integrines poden convertir forces mecàniques en senyals bioquímiques a través de la seva unió amb la matriu extracel·lular. Suppressions específiques de subunitats de les integrines empitjoren la malaltia hipertròfica deguda a la hipertensió^{28,29}.

1.4.1.2 Mecanismes d'inducció de la hipertròfia patològica

La hipertròfia patològica és associada amb un increment de mort del miòcit, remodelatge fibròtic i disminució de la funció sistòlica i diastòlica que sovint progressa cap a una fallada

cardíaca.

Un dels mecanismes d'inducció de la hipertròfia patològica és l'activació de receptors acoblats a proteïnes G, ja que la sobreexpressió de proteïnes G causa una hipertròfia excèntrica acoblada a una disfunció contràctil del ventricle esquerra³⁰. L'angiotensina II, endotelina-1 i catecolamines (α -adrenèrgic) s'uneixen a receptors transmembrana específics que són acoblats a proteïnes G. Aquestes proteïnes G són activadores de la fosfolipasa C β (PLC β), la qual indueix la generació de diacilglicerol (DAG) i inositol-1,4,5-trifosfat³¹. El DAG funciona com un lligant intracel·lular de la proteïnasa quinasa C (PKC), permetent la seva activació. L'acumulació de l'inositol-1,4,5-trifosfat permet la mobilització interna de calci mitjançant la unió amb el receptor de l'inositol 1,4,5-trifosfat localitzat en el reticle endoplàsmic o en l'embolcall nuclear. Es va demostrar que la generació de l'inositol 1,4,5-trifosfat i l'alliberament intern de calci mediaven la senyalització hipertròfica a través de la calcineurina³².

La calcineurina és una fosfatasa regulada per calci, que defosforila membres de la família dels factors de transcripció NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), causant la seva translocació nuclear on NFAT forma complexos amb cofactors com GATA4 o MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*), per tal d'activar la transcripció de gens diana hipertròfics³³. Els ratolins que sobreexpressen formes activades de la calcineurina o NFAT desenvolupen hipertròfia i fallada cardíaca en 2 mesos, demostrant així l'involucrament de la calcineurina en la hipertròfia patològica³⁴.

Un altre mecanisme implicat en la hipertròfia patològica és el que implica la via de les MAPK. Consisteixen en tres subfamílies, les JNKs, p38 i les ERK³⁵. Com ja s'ha mencionat, les MAPK ERK1/2 contribueixen a la hipertròfia adaptativa. Les JNK són essencials per la hipertròfia i disfunció induïda per les proteïnes G, ja que ratolins que presenten una sobreexpressió de proteïnes G però són deficients en MEKK1 (un regulador de JNK), no mostren hipertròfia i retenen una bona funció sistòlica³⁶.

El paper de p38 en la hipertròfia patològica ha sigut descrit mitjançant la sobreexpressió de Tak1, un activador de p38. La sobreexpressió de Tak1 causa hipertròfia cardíaca que condueix a una disfunció severa miocàrdica i una letalitat precoç³⁷. A més a més, la inhibició farmacològica de p38 incrementa la supervivència mitjançant la reducció de la hipertròfia ventricular esquerra en rates hipertenses³⁸.

1.5 Paper de la senyalització per apoptosi en el cor

El terme apoptosi va ser descrit l'any 1972 per Kerr, Wyllie i Currie quan van descobrir un tipus de mort diferent a la mort necròtica. L'apoptosi és un procés morfològicament definit caracteritzat per una reducció del volum cel·lular, fragmentació de l'ADN i condensació nuclear, formació dels cossos apoptòtics, de la fagocitació i degradació de la cèl·lula sense provocar resposta inflamatòria³⁹. Aquest tipus de mort cel·lular és important pel desenvolupament i morfogènesi d'organismes multicel·lulars, per tal de controlar el nombre cel·lular, eliminar cèl·lules infectades, mutades o danyades⁴⁰.

L'apoptosi està regulada per dos vies de mort conservades evolutivament (Figura 6): la via extrínseca, que s'inicia per estímuls exògens (deficiència de factors de supervivència, nutrients, radiació i altres estressos) utilitzant els receptors de mort de la superfície cel·lular⁴¹; i la via intrínseca, que s'activa per estímuls intracel·lulars (estrès oxidatiu, dany en l'ADN i proteïnes mal plegades) involucrant a la mitocòndria i al reticle endoplasmàtic. En la via intrínseca s'allibera el citocrom C de la mitocòndria cap al citoplasma, on s'unirà a la proteïna Apaf-1 formant un complex. Aquest, s'uneix a la Caspasa-9 (proteasa iniciadora), la qual s'activa i es forma l'apoptosoma^{42,43}. Les dues vies convergeixen en una via comuna implicant l'activació de les caspases executores, tallant un ampli espectre de proteïnes.

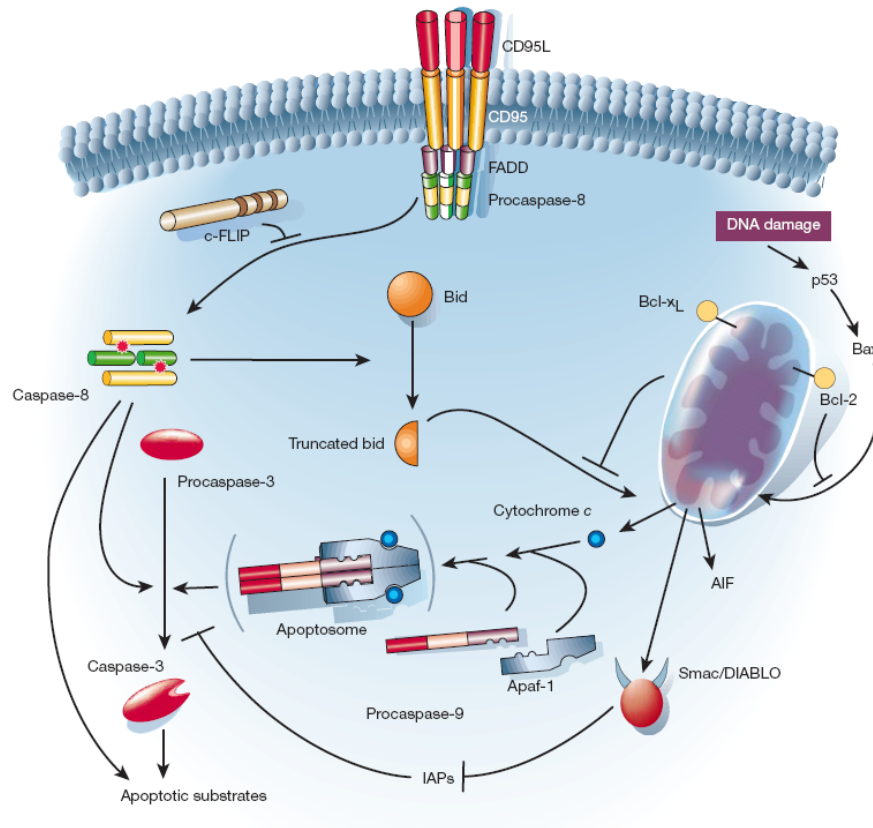


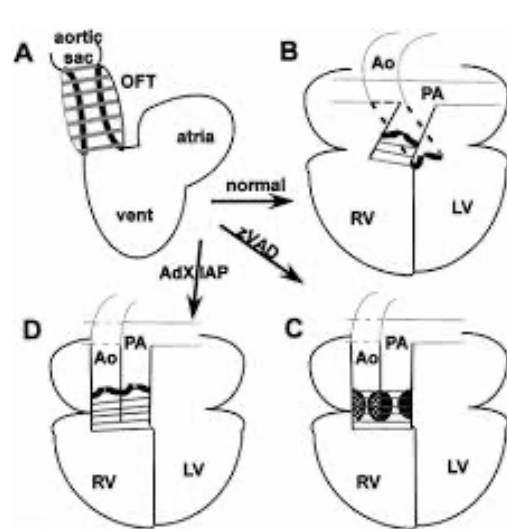
Figura 6 Les dues vies apoptòtiques majoritàries en les cèl·lules de mamífer. En la via extrínseca de l'apoptosi (esquerra), els receptors de membrana són activats per lligands extracel·lulars. En la via intrínseca (dreta) la mitocòndria juga un paper essencial amb la presència de proteïnes de la família Bcl-2⁴⁴.

La morfogènesi dels teixits cardiovasculars implica una regulació coordinada de la proliferació cel·lular i l'apoptosi. La prevalença de l'apoptosi durant el desenvolupament del cor ha estat ben documentada. Durant la formació de la vàlvula cardíaca, els coixins es formen com expansions localitzades d'una matriu extracel·lular, coneguts com "gelatina cardíaca", en els llocs de connexions atrioventriculars i ventriculoarterials. Les cèl·lules endotelials envaeixen els coixins i es diferencien en un tipus cel·lular mesenquimal, i els coixins donen lloc a les vàlvules d'entrada (mitral, tricúspide) i les vàlvules de sortida (aòrtica i pulmonar) i porcions dels septes atrials i ventriculars. Sembla que això passa en part per l'apoptosi^{45,46}.

Els conductes de sortida del cor (OFT, *outflow tract*) representen un dels principals defectes congènits del cor. És una estructura tubular senzilla que connecta l'únic ventricle primitiu amb el sac aòrtic i les artèries de l'arc aòrtic. Aquesta estructura experimenta una seqüència complexa de processos morfològics per tal de convertir-se en la porció del cor

que alinea els ventricles dret i esquerre amb l'artèria pulmonar i l'aorta. El procés de l'apoptosi està involucrat en la correcta formació del OFT ja que durant el desenvolupament passa a ser una estructura allargada a una estructura més petita en forma d'anell. Un estudi demostra que es produeix una reducció dels cardiomiòcits en el OFT durant el desenvolupament⁴⁷. A més a més, un altre estudi on utilitzen inhibidors de l'apoptosi demostren que no es produeix l'escurçament i rotació necessaris en el OFT (Figura 7)⁴⁸.

Per tant, l'apoptosi és important per eliminar estructures residuals i perquè les connexions



entre els ventricles i les artèries estiguin ben establertes.

Figura 7 Diagrama del remodelatge embriònic i dels efectes dels inhibidors de l'apoptosi.

A) Circulació única en el cor anterior al remodelatge del OFT. **B)** Escurçament del OFT en el miocardi, rotació de les artèries (Ao: aorta; PA: artèria pulmonar) i formació de les vàlvules cardíques durant el desenvolupament normal. **C)** Efecte dels inhibidors de caspasa, on no es produeix rotació del OFT i no s'han format bé les vàlvules cardíques. **D)** Efecte dels inhibidors de caspases XIAP, no es produeix l'escurçament ni la rotació però sí que es formen les vàlvules.

Estudis inicials suggerien que els miòcits moren a través de les vies extrínseca i intrínseca de l'apoptosi durant isquèmia i infart de miocardi, contribuint a la insuficiència cardíaca. Referent a la via extrínseca, ratolins deficientes per Fas exhibeixen reduccions en la mida de l'infart respecte als controls. Pel que fa a la via intrínseca, la mida de l'infart és reduïda mitjançant la sobre-expressió de Bcl-2 (proteïna antiapoptòtica), entre d'altres⁴⁹⁻⁵¹. Però actualment, cada vegada és més evident que l'apoptosi dependent de caspases juga un paper minoritari en la mort del miòcit adult^{52,53}. De fet, la teràpia experimental antiapoptòtica no mostra un benefici consistent en el cor ja que inhibint l'activació de les caspases no s'obté una reducció en la mida de l'infart en cors de rata⁵⁴. A més, el nostre grup ha demostrat que gens apoptòtics (com Apaf-1, caspasa 3, caspasa 7 o Bcl-2) són silenciats durant la diferenciació dels miòcits i que la mort del miòcit induïda per isquèmia i reperfusió és independent de caspases^{55,56}.

2. Nucleases apoptòtiques

En el 1980, Andrew Wyllie va observar que l'ADN nuclear apoptòtic era tallat resultant en un *ladder* (anomenat també LMWF: *low molecular weight fragmentation*) de fragments que eren múltiples de 200 parelles de bases. Aquest *ladder* era conseqüència de la digestió de la cromatina per una nucleasa endògena que tallava l'ADN entre els nucleosomes. Tot i que la formació del *ladder* d'ADN és un indicador distintiu de l'apoptosi, és de fet només el punt final de la degradació de l'ADN i no reflecteix el patró complet de fragmentació d'ADN que es produeix durant l'apoptosi. De fet, moltes cèl·lules no degraden el seu ADN fins a aquest punt. La degradació d'ADN durant l'apoptosi és un procés molt més complex que comença amb la generació de fragments d'ADN de major pes molecular (HMWF: *high molecular weight fragmentation*) i que no són detectables per electroforesi convencional⁵⁷. Aquests fragments més grans tenen una grandària de 50-300 kb i reflecteixen el tall endonucleolític de cromosomes interfàsics als llocs sensibles a la nucleasa, els quals resideixen en les fibres de cromatina com a resultat de plegar-se en estructures en forma de bucle (mida de 50 kb) i roseta (mida de 300 kb)⁵⁸.

La primera nucleasa que es va identificar per ser la principal responsable del LMWF va ser la nucleasa DFF40/CAD (*DNA fragmentation factor o caspase-activated DNase*). L'endonucleasa CAD es troba en les cèl·lules en una forma inactiva, degut a la seva unió amb la subunitat inhibidora DFF45/ICAD (*inhibitor of CAD*). L'activació de CAD té lloc mitjançant el tall proteolític de la subunitat inhibidora de ICAD⁵⁹. El ratolí ICAD^{-/-} tot i mostrar una significant reducció en la fragmentació de l'ADN, encara mostrava una fragmentació residual⁶⁰, essent la Endonucleasa G (EndoG) la responsable d'aquesta⁶¹.

2.1 Funcions apoptòtiques de les nucleases

Les nucleases estudiades en aquesta recerca són EndoG, TatD i ExoG. L'interès en EndoG i TatD va sorgir quan Parrish et al. mitjançant un anàlisi genòmic en *C. elegans* van identificar la nucleasa CPS-6 (homòloga d'EndoG en humans i prèviament coneguda per estar involucrada en la degradació de l'ADN apoptòtic) i 7 gens nous. Aquests gens codifiquen per 7 noves nucleases relacionades amb la mort cel·lular, entre les quals hi havia *crn-2* (homòloga de TatD en humans) (Figura 8).

Diversos d'aquests gens identificats en *C. elegans* tenen homòlegs en humans que són importants en el processament de l'ARN, plegament de proteïnes, replicació de l'ADN i

reparació de l'ADN danyat, suggerint rols duals per aquestes nucleases en la supervivència i en la mort cel·lular. Malgrat saber que la nucleasa *crn-2* codifica per la nucleasa TatD en mamífer, no es saben quines funcions té fins al moment i hem volgut estudiar-les. D'altra banda, existeixen un major nombre d'articles que descriuen les funcions d'EndoG en diverses espècies.

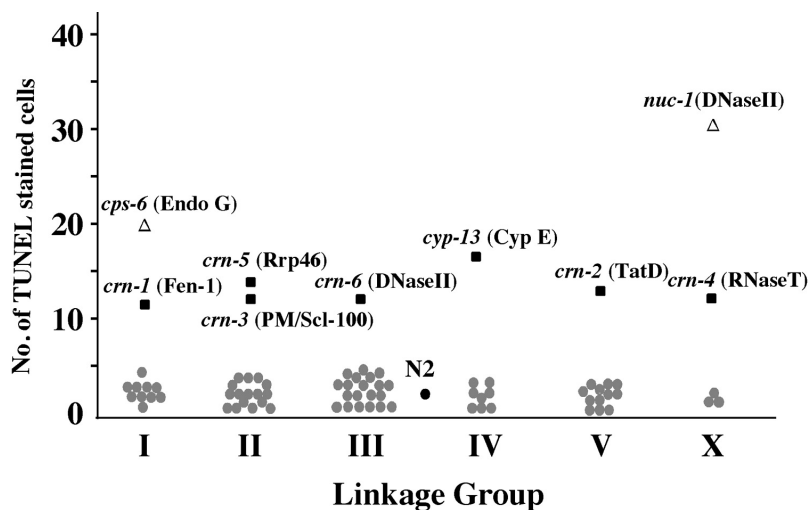


Figura 8. Nucleases apoptòtiques identificades en el genoma de *C. elegans*. Anàlisi genòmic basat amb l'ús d'ARN d'interferència combinat amb l'assaig TUNEL revela que 6 nous gens *crn* (*cell death related nucleases*) i *cyp-13* estan involucrats en la degradació de l'ADN nuclear durant l'apoptosi. També s'identifiquen dos gens (*cps-6* i *nuc-1*) ja coneguts prèviament. En la figura es troben representades el nombre de cèl·lules positives per TUNEL en l'eix de les Y i en l'eix de les X es mostra la posició cromosòmica (*Linkage Group*) de cada gen. Al costat de cada gen de *C. elegans* i en parentesi s'indica l'homòleg en mamífers⁶².

En canvi, el nostre grup es va interessar per la nucleasa ExoG quan Cymerman et al. la va descriure com un paràleg funcional d'EndoG en eucariotes superiors⁶³. Similarment a TatD, d'aquesta nucleasa no hi ha un gran nombre de publicacions al respecte. El fet de no disposar d'animals deficientes per *Tatd* i *Exog* limita el coneixement d'aquestes nucleases sobre el desenvolupament i les possibles patologies associades.

2.1.1 Endonucleasa G

EndoG és una nucleasa que es troba conservada evolutivament, localitzada a l'espai intermembrana i en la matriu mitocondrial⁶⁴. L'Endonucleasa G de mamífer és codificada en el nucli i produïda com una proteïna de 33 kDa amb una seqüència mitocondrial en el seu extrem N-terminal. Una vegada translocada a la mitocondria, la seqüència mitocondrial és tallada per donar lloc a la nucleasa madura de 28 kDa⁶⁵.

Va ser identificada i caracteritzada en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* com a Nuc1p^{66,67}, així com en extractes de cor de bou⁶⁸. La participació en l'apoptosi i desenvolupament de CPS-6 (homòleg d' EndoG humà en *C. elegans*) va ser demostrada a través de l'anàlisi del fenotip dels mutants de *cps-6*. Semblant als mutants *nuc-1* al llevat, la disminució de l'activitat de *cps-6* causa una acumulació de cèl·lules positives per TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) indicant que *cps-6* es necessita per a la correcta execució de la degradació de l'ADN al nemàtode. A més, la reducció de l'activitat de *cps-6* retarda l'aparició de cadàvers cel·lulars, suggerint que també és important per la progressió normal de l'apoptosi⁶⁹.

També es va demostrar el paper d'EndoG com nucleasa apoptòtica capaç d'induir talls en l'ADN en cèl·lules deficientes en el sistema CAD. A més a més, aquesta degradació en l'ADN no desapareixia quan en aquest model es tractaven les cèl·lules amb un inhibidor de caspases, suggerint que la degradació genòmica deguda a EndoG es produïa per una via independent de caspases⁶¹. Tot i així, existeixen evidències contradictòries sobre el mecanisme d'alliberament de la proteïna. Altres grups van suggerir que la sortida d'EndoG de la mitocòndria es produïa per una via dependent de caspases ja que en cèl·lules Hela tractades amb un estímul apoptòtic junt amb un inhibidor de caspases no es detectava EndoG al citosol⁷⁰. A més a més, es va sumar el fet que l'eliminació del gen d'*Endog* en el model murí *Endog*^{-/-} no causava defectes en el procés d'apoptosi davant d'una gran varietat d'estímuls apoptòtics indicant que el paper d'EndoG no és imprescindible en l'apoptosi^{64,71}.

Els resultats obtinguts pel nostre grup han ajudat a interpretar les dades contradictòries sobre la funció d'EndoG en l'apoptosi. En cardiomiòcits neonatals, on la via dependent de caspases es reprimeix durant la diferenciació d'aquests i no es reexpressa durant la isquèmia experimental, EndoG és important en la degradació de l'ADN. La reducció de l'expressió d'*Endog* en els cardiomiòcits, però no en fibroblasts, produeix una disminució en la fragmentació de baix pes molecular (LMWF). Resultat que indica que el paper apoptòtic d'EndoG és important només en un model de mort independent de caspases⁵⁶. L'alliberament d'EndoG al citosol no depèn de l'activació de les caspases, sinó de Bnip3⁷².

2.1.2 Endonuclease G-like 1 (ExoG)

ExoG és una endo/exonucleasa mitocondrial, localitzada a la membrana mitocondrial interna, que presenta activitat endonucleasa i 5'-3' exonucleasa. Degut a les activitats

enzimàtiques complementàries i l'origen evolutiu comú amb EndoG van anomenar-la amb el nom d' ExoG (Endonuclease G-like 1)⁶³.

S'ha vist que la reducció d'*Exog* causa una acumulació de trencaments de cadena simple (SSBs) en el genoma mitocondrial que poden ser restaurats quan s'afegeix aquesta proteïna recombinant. S'han realitzat assajos de reparació per tal de confirmar que l'activitat 5'-3' exonucleasa que presenta ExoG té rellevància en reparació conclouent que aquesta participa en la ruta de reparació d'escissió de bases LP-BER (*Long Patch- Base Excision Repair*) mitocondrial. L'acumulació de trencaments de cadena simple en l'ADN mitocondrial compromet la integritat d'aquest, causant una pèrdua en el potencial de membrana mitocondrial i un augment en la generació de ROS, els quals encara produeixen més dany en el genoma mitocondrial, i subseqüentment produint un dany en el genoma nuclear, conduint a l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi. Conclouen que s'activa la via intrínseca degut a la disminució de la pro-caspasa 9, activació de la caspasa 3 i detecció del fragment de PARP (Poli ADP-ribosa polimerasa)⁷³.

Per tant, la disminució d'ExoG mitjançant interferència d'ARN desencadena la mort cel·lular a través de l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi degut a una disfunció mitocondrial.

2.1.3 TatD

TatD és una proteïna conservada en diferents espècies, incloent bacteris, fongs, plantes i animals. No obstant aquest fet, les funcions cel·lulars de TatD en cèl·lules procariotes o eucariotes no són gaire conegudes.

L'interès en TatD va sorgir quan va ser identificada i nomenada com una *cell death related nuclease (crn-2)*, a través d'un anàlisi genòmic funcional basat en interferència en ARN en *C. elegans* (Figura 8). Semblant als mutants *cps-6* (homòleg d'EndoG en *C. elegans*), la disminució de l'activitat de *crn-2* causa una acumulació de cèl·lules positives per TUNEL indicant la seva participació en la degradació de l'ADN. A més a més, es produeix un retard en l'aparició dels cadàvers cel·lulars en el nematode. Aquests autors també mostren que *crn-2* i *cps-6* actuen en vies independents en la degradació de l'ADN, ja que la disminució simultània d'ambdues produeix un increment addicional en cèl·lules positives per TUNEL⁶².

També es va demostrar el paper en apoptosi de TatD en organismes eucariotes unicel·lulars, com en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*⁷⁴, en el paràsit *Trypanosoma Brucei*⁷⁵, i en el paràsit *Leishmania*⁷⁶. En ambdós paràsits, sota estímuls apoptòtics TatD és translocada del citoplasma al nucli on interacciona amb EndoG per tal de formar un complex eficient en la degradació de l'ADN.

2.2 Funcions no apoptòtiques d'EndoG, ExoG i TatD

2.2.1 Endonucleasa G

La nucleasa EndoG és important per la correcta proliferació en diferents organismes i tipus cel·lulars. En *C. elegans* la reducció d'aquesta produeix un retràs en la divisió cel·lular durant el desenvolupament⁶⁹. Pel que fa a *S. cerevisiae*, la depleció d'*endog* genera una acumulació de cèl·lules en la fase G2 del cicle cel·lular⁷⁷. En altres models cel·lulars com en cèl·lules endotelials i en 293T, quan es redueix l'expressió d'*Endog* també es produeix una disminució en la proliferació, incrementant el nombre de cèl·lules presents en la fase G2/M^{78,79}. Malgrat aquests resultats inicials i degut a possibles efectes off-target del sistema de silenciament, no queda clar si EndoG és realment rellevant pel control de la proliferació cel·lular. Els resultats del nostre grup recentment publicats demostren que en els nostres models utilitzats es produeix un defecte en proliferació que genera una acumulació de cèl·lules en la fase G1/S. Concretament els models estudiats són: fibroblasts de pell *Endog*^{-/-}, cèl·lules Rat-1 transduïdes lentiviralment per shRNAs d'*Endog* i cèl·lules 293T *Endog*^{-/-} generades a partir del sistema CRISPR/Cas9⁸⁰.

D'altra banda, en cèl·lules post-mitòtiques com els cardiomiòcits la reducció d' *Endog* és associada a un increment en la seva mida i en un augment en l'abundància d'espècies reactives de l'oxigen en el cor de ratolins. La hipertròfia dels cardiomiòcits derivada de la delecio d'*Endog* és depenent de ROS i probablement relacionada amb l'activació de la via MEF2 implicada en la transcripció de gens hipertròfics^{81,82}. Una possible explicació a l'increment de ROS és degut a la capacitat reduïda de sintetitzar i mantenir l'ADN mitocondrial per part de les cèl·lules *Endog*^{-/-}⁸¹.

Una de les altres funcions mitocondrials d'aquesta nucleasa sembla ser la reparació de l'ADN danyat. Assajos *in vitro* mostren que EndoG presenta una major afinitat per ADN amb dany oxidatiu⁸³. A més a més, EndoG es troba expressada principalment en teixits amb un alt consum d'oxigen i, consegüentment amb una major taxa de dany oxidatiu de

l'ADN mitocondrial⁸⁴. Mutacions en el gen *d'Endog* en *Drosophila* causen anormalitats morfològiques en les mitocòndries i una major letalitat induïdes per l'exposició a agents reticulants⁸⁵. EndoG també s'ha trobat associada amb la proteïna Fen1, endonucleasa implicada en processos de reparació, tant en *C. elegans*⁸⁶ com en humans⁸⁷.

A més a més, tot i ser una nucleasa mitocondrial s'han descrit funcions en el nucli. Concretament, EndoG catalitza talls de doble cadena en regions riques en el nucleòtid 5-hidroximetilcitosina, iniciant la recombinació homòloga. Aquest procés és important en la regulació transcripcional i la pluripotència de les cèl·lules mare⁸⁸. Altres grups evidencien que EndoG participa en la recombinació α del virus simple de l'herpes⁸⁹, en el canvi de classe d'immunoglobulines en cèl·lules B⁹⁰ i en el reordenament de gens associats a la leucèmia mieloide/limfoide⁹¹, entre d'altres. Recentment, s'ha descobert una nova funció nuclear d'EndoG proposant que participa en la maduració de l'ARNm de hTERT⁹² i DNAsa1⁹³ en cèl·lules del sistema immunitari.

Respecte al fenotip del ratolí deficient en *Endog*, proves conductuals d'aquest revelen una nova funció d'aquesta proteïna en la regulació de l'ansietat, essent menys ansiosos els ratolins *Endog*^{-/-} que els ratolins *Endog*^{+/+}. EndoG s'expressa en totes les àrees del cervell però està especialment augmentada en l'estriat. Concretament, es troba localitzada en compartiments pre-sinàptics i no en post-sinàptics. Juntament aquests resultats suggereixen que EndoG podria regular l'ansietat mitjançant la modulació de components sinàptics⁹⁴.

2.2.2 Endonuclease G-like 1 (ExoG)

ExoG té una funció important en el manteniment de l'ADN mitocondrial sota una situació d'estrès oxidatiu en mioblasts proliferatius de ratolí. La sobreexpressió d'*Exog* incrementa la resistència a estrès en aquests a través de l'augment en la integritat del genoma mitocondrial⁹⁵. D'altra banda, ni el silenciament d'*Exog* en miotúbuls⁹⁵ ni en cardiomiòcits neonatals de rata afecta a la integritat de l'ADN mitocondrial⁹⁶.

A més de participar en la integritat de l'ADN mitocondrial en mioblasts proliferatius, ExoG participa en la regulació de la mida dels cardiomiòcits neonatals de manera depenent de ROS, donat que el silenciament d'aquest gen indueix hipertròfia dels cardiomiòcits neonatals que pot ser revertida eliminant els ROS. Malgrat la inducció d'hipertròfia en els cardiomiòcits deficients per *Exog*, no s'indueix una activació de les vies típiques de

senyalització d'hipertròfia tot i l'augment en l'emissió de ROS degut a un augment en la respiració mitocondrial⁹⁶. Malgrat aquest augment en la respiració mitocondrial, una depleció prolongada d'*Exog* en cardiomiòcits resulta en una disfunció mitocondrial i aquest fet s'agreuja amb l'estimulació amb fenilefrina⁹⁷.

S'ha descrit un rol d'*ExoG* durant la replicació de l'ADN mitocondrial, procés essencial pel manteniment de les funcions d'aquest orgànul en cèl·lules de mamífer. Durant la replicació de l'ADN mitocondrial, els *primers* d'ARN que es generen han de ser eliminats abans que les cadenes d'ADN circular es tornin a unir. L'eliminació de la major part dels *primers* d'ARN la duu a terme la RNAsa H1 mitocondrial, però aquesta deixa dos ribonucleòtids connectats a l'extrem 5' de l'ADN naixent que són eliminats posteriorment per *ExoG*⁹⁸. No obstant això, un grup independent mitjançant models cel·lulars no li atribueixen cap funció en la degradació de l'ADN mitocondrial⁹⁹. En canvi, s'ha descrit un rol d'*ExoG* en la degradació de l'ADN mitocondrial en les cèl·lules infectades pel virus de l'herpes simple, important pel procés d'infecció d'aquest¹⁰⁰.

2.2.3 TatD

TatD és codificada per l'operó *Tat* (*twin-arginine translocation pathway*), el qual codifica per les proteïnes TatA, TatB, TatC i TatD en *Escherichia coli*. TatA, TatB i TatC es troben unides a la membrana. Aquestes tres proteïnes formen un receptor essencial per unir i transportar proteïnes plegades que presenten pèptids senyal d'arginina des del citoplasma fins al periplasma. En canvi, TatD és una proteïna citoplasmàtica a *E. coli* amb activitat DNAsa dependent de Mg^{2+} , no essencial en el transport de proteïnes en el sistema *Tat*¹⁰¹ segons estudis realitzats *in vitro*. Malgrat no ser requerida en el transport, és essencial per l'eliminació de proteïnes mal plegades essent una part del sistema de control de qualitat¹⁰².

En *E. coli* identifiquen TatD com un membre implicat en la reparació de l'ADN. Concretament, TatD és capaç de reparar nucleòtids desaminats per l'acció oxidant del peròxid d'hidrogen. Així doncs, la deleció d'aquesta nucleasa sensibilitza a les cèl·lules a la mort induïda per peròxid d'hidrogen¹⁰³.

En les espècies de *Plasmodium* s'ha descrit TatD com un factor virulent en el paràsit, important en l'evasió del sistema immune. Una de les funcions de TatD en aquestes espècies és contrarestar les trampes extracel·lulars formades per l'ADN i les proteases

alliberades per macròfags i neutròfils durant la infecció de microbis. TatD es sintetitza en el citoplasma del paràsit, es trasllada a la membrana parasitòfora i es segrega fora de l'eritròcit infectat. A més a més, la infectivitat dels paràsits s'atenua significativament amb la supressió del gen que codifica per la proteïna TatD. Els ratolins immunitzats amb la proteïna TatD recombinant mostren una resistència important a la infecció del paràsit. Per tant, en conjunt aquests resultats indiquen que TatD és important en la supervivència dels paràsits de la malària en l'hoste i que podria ser una potencial candidata utilitzada per la vacuna de la malària^{104,105}. El mateix grup demostra que TatD és important durant la fase de desenvolupament sexual del paràsit en el mosquit. Durant aquest període TatD s'expressa a la superfície dels gametòcits masculins, femenins i de l'ooquinet. Anticossos específics contra TatD eviten la formació del flagel del gametòcit masculí i la conversió de l'ooquinet a l'oocist¹⁰⁵.

Un altre estudi independent demostra que TatD és un factor de virulència en *Streptococcus pneumoniae*. Aquest és un patògen bacterià que causa pneumònia i septicèmia en humans. TatD es troba associada a vesícules extracel·lulars amb activitat DNAsa, que l'utilitza per degradar les trampes extracel·lulars dels neutròfils humans¹⁰⁶. Aquest estudi, juntament amb l'anteriorment descrit en *Plasmodium* evidencien la funció de TatD en l'evasió del sistema immune.

S'ha descrit que en el mateix locus genòmic de *Tatd* han trobat un ARN no codificant (Long non-coding RNA; LncRNA) important per adhesió, proliferació, migració i invasió de cèl·lules d'un tipus de càncer de pulmó¹⁰⁷, carcinoma hepatocel·lular¹⁰⁸ i càncer de mama¹⁰⁹. No obstant això, la seqüència utilitzada pel silenciament en els articles mencionats correspon a la ORF que codifica per la proteïna Tatdn1. Aquest fet fa que no es pugui diferenciar si l'efecte observat és degut al silenciament de la proteïna o del LncRNA.

L'activitat endonucleasa de TatD en el peix zebra és important en els processos de decatenació que tenen lloc durant la segregació dels cromosomes. Donat la mala segregació dels cromosomes, s'atura el cicle cel·lular en la fase S. A més a més, la seva disminució produeix estructures aberrants de la cromatina i un augment de cèl·lules poliploides. L'anàlisi de l'expressió de TatD en aquest organisme revela que es troba expressada principalment en l'ull, suggerint una funció especialment rellevant en aquest teixit. Concretament, la seva disminució ocasiona defectes en el desenvolupament ocular i

una mida reduïda de l'ull en l'individu adult¹¹⁰.

3. Proliferació cel·lular: control del cicle i càncer

La divisió cel·lular consisteix en dos processos consecutius, caracteritzada principalment per la replicació de l'ADN i segregació dels cromosomes replicats en dues cèl·lules filles. El cicle cel·lular eucariòtic es divideix en 4 fases. La fase G1, on les cèl·lules creixen i poden entrar en la fase de síntesi, la fase S, on l'ADN nuclear es replica. Les cèl·lules sovint creixen també en la fase G2 del cicle i es preparen per entrar en la fase de la mitosi (fase M). En la fase M, les cromàtides germanes es separen i es distribueixen en les noves cèl·lules filles. Es produeixen 4 estadis diferents durant la mitosi: la profase, la metafase, l'anafase i la telofase. Acabada la fase de la mitosi té lloc la citocinesi, la qual completa el programa de divisió cel·lular mitjançant la formació de dues cèl·lules filles separades amb una membrana plasmàtica i, depenent de les espècies, una paret cel·lular¹¹¹.

3.1 Regulació per les quinases depenents de ciclins

La transició d'una fase del cicle cel·lular a una altra es produeix de manera ordenada i està regulada per diferents proteïnes cel·lulars. Les proteïnes reguladores del cicle són les quinases depenents de ciclina (CDK), una família de proteïnes quinasa que s'activen en punts específics dels cicle cel·lular. S'han detectat 5 CDKs actives durant el cicle cel·lular; durant la fase G1 (CDK4, CDK6 i CDK2), durant la fase S (CDK2) i durant la fase G2 i M (CDK1)¹¹². Els nivells de les CDK es mantenen estables durant el cicle cel·lular, a diferència de les proteïnes activadores, les ciclins.

Els nivells de les ciclins augmenten i disminueixen durant el cicle cel·lular i d'aquesta manera activen a les CDK corresponents. Es requereixen diferents ciclins a les diferents fases del cicle cel·lular. Les ciclins D (ciclina D1, D2 i D3) s'uneixen a les quinases CDK4 i CDK6, complexes essencials per l'entrada a la fase G1 del cicle¹¹³. Una altra ciclina important en G1 és la ciclina E que s'associa amb CDK2 per regular la progressió de la fase G1 a la fase S¹¹⁴. La ciclina A s'uneix a CDK2, complex requerit durant la fase S¹¹⁵. A finals de la fase G2 i principis de la fase M, es formen els complexes ciclina A amb CDK1 per tal de promoure l'entrada a la fase M. La mitosi està regulada pel complex ciclina B amb CDK1^{116,117}.

L'activitat de les CDK pot ser inhibida per proteïnes inhibidores del cicle cel·lular, anomenades inhibidors de les CDKs (CKI), que s'uneixen a la CDK o al complex ciclina-CDK. S'han descobert dos famílies d'inhibidors de les CDKs, la família INK4 i la família Cip/Kip. La família INK4 inclou p15¹¹⁸, p16¹¹⁹, p18¹²⁰, p19¹²¹ que inactiven específicament les CDKs de G1 (CDK4 i CDK6). Aquests inhibidors formen complexos estables amb la CDK abans de la seva unió amb la ciclina, prevenint l'associació amb la ciclina D. La segona família d'inhibidors, la família Cip/Kip, inclou p21¹²², p27¹²³ i p57¹²⁴. Aquests inhibidors inactiven els complexos ciclina-CDK. La família Cip/Kip té una capacitat inhibidora molt més àmplia ja que són capaços d'inhibir l'activitat de les quinases dependents de Ciclina A, E, D i B.

3.2 Punts de control durant el cicle

Els punts de control durant el cicle cel·lular serveixen per assegurar una correcta divisió de la cèl·lula. Es troben tres punts de control durant el cicle cel·lular: el punt de control en G1/S, en G2/M i el punt del control del fus.

El **punt de restricció de G1/S** evita la duplicació de l'ADN danyat i es troba regulat per p53. ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) i ATR (*ataxia and rad3 related*) són dos proteïnes quinasa que reconeixen el dany en l'ADN i en resposta a aquest fosforilen a p53, la qual activa la transcripció de gens, entre ells l'inhibidor p21 que s'uneix i inhibeix als diferents complexos ciclina-CDK impedit així la progressió a la fase S¹²⁵.

El **punt de restricció de G2/M** evita l'entrada a la mitosi quan el dany en l'ADN té lloc durant la fase G2. Durant el dany en l'ADN, les proteïnes quinasa Chk1 i Chk2 s'activen i fosforilen a Cdc25 per tal d'inhibir-la. Cdc25 és la fosfatasa encarregada d'hidrolitzar la fosforilació inhibidora dels complexos ciclina-CDK. A més a més, Chk1 és capaç d'activar la tirosina quinasa Wee1 que fosforila i inhibeix el complex ciclina B-CDK^{126,127}.

El **punt del control del fus** detecta l'alineació incorrecta dels cromosomes al fus mitòtic i atura el cicle cel·lular en la metafase. S'inhibeix la subunitat Cdc20 del complex promotor de l'anafase (APC), resultant en la prevenció de la transició de la metafase-anafase¹²⁸.

3.3 Desregulació del cicle cel·lular i càncer

En el càncer es produeixen alteracions fonamentals en el control genètic de la divisió cel·lular, donant lloc a una proliferació cel·lular sense restriccions. Les mutacions es produeixen principalment en dues classes de gens: els proto-oncogens i els gens supressors tumorals. A les cèl·lules normals, els productes de proto-oncogens actuen a diferents nivells al llarg de les vies estimulants la proliferació cel·lular. Les mutacions en proto-oncogens o oncogens poden promoure al creixement del tumor. La inactivació de gens supressors tumorals com pRb i p53 provoca una disfunció en proteïnes que normalment inhibeixen la progressió del cicle cel·lular. La desregulació del cicle cel·lular associada al càncer es produeix per mutació de proteïnes importants en diferents nivells del cicle cel·lular. En el càncer, s'han observat mutacions en gens que codifiquen per CDKs, ciclines, enzims activadors de CDK, CKI, substrats de les CDK i proteïnes de control¹²⁹.

3.3.1 Gen supressor tumoral PTEN

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*) és un gen supressor tumoral localitzat en el cromosoma 10 en humans, mentre que en ratolins es troba al cromosoma 19. Aquest gen també és conegut com MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancers*) o TEP1 (*TGF β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase*). Es va descobrir quan diversos grups independents van observar que una regió del cromosoma 10 era objecte de mutacions o en aquesta regió es patia una pèrdua d'heterozigosi en molts càncers humans, incloent glioblastomes, càncers d'endometri i de pròstata¹³⁰⁻¹³².

Estructuralment, PTEN presenta dos dominis que són requerits per la seva funció; el domini fosfatasa (domini catalític) i el lloc d'unió a la membrana lipídica (domini C2). Altres dominis com el domini d'unió PDZ i la regió carboxi-terminal (conté seqüències PEST) poden contribuir a l'estabilitat i activitat de la proteïna. A més a més, també presenta un domini d'unió al fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat, domini PBD (*PIP2 binding domain*) (Figura 9).

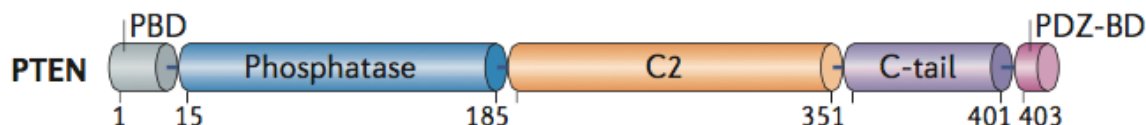


Figura 9. Estructura del supressor tumoral PTEN. PTEN és una proteïna de 403 aminoàcids composta per 5 dominis funcionals: un domini d'unió a fosfatidilinositol-4,5-bifosfat PBD, un domini fosfatasa, un domini C2, una cua carboxi terminal i un domini d'unió PDZ¹³³.

PTEN és una fosfatasa lipídica que regula negativament la via de senyalització PI3K/Akt. Aquesta via és important en la proliferació i supervivència cel·lular, sobretot en les cèl·lules que responen a la unió de factors de creixement.

3.3.1.1 Activitat de PTEN en la via PI3K/Akt/mTOR

La via de la PI3K/Akt (Figura 10) s'activa a través de diversos estímuls, incloent factors de creixement, citoquines i hormones. També es pot activar a través de receptors acoblats a proteïnes G¹³⁴ o a través de la GTPasa Ras¹³⁵.

L'activació de la via comença quan s'uneixen els lligants als receptors tirosina quinasa (RTK) transmembrana, fet que resulta en l'autofosforilació de residus de tirosina en la regió citoplasmàtica del receptor i serveix d'anclatge pel domini SH2 (*SRC-homology 2*) de p85, la subunitat reguladora de la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*). Aquesta interacció permet activar la subunitat catalítica de la PI3K, la subunitat p110. Una vegada activada la PI3K, catalitza la fosforilació de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfat) per tal de generar el segon missatger PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat). Aquests lípids recluten i anclen a la membrana proteïnes que contenen dominis PH (*plekstrin domain*), com les proteïnes Akt i PDK1 (*3-phosphoinositol-dependent protein kinase-1*). Una vegada posicionats a la membrana, Akt és activada per la fosforilació a la Thr308 mediada per PDK1 i la fosforilació a la Ser473 pel complex mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*). La proteïna Akt fosforilada activa és transportada de la membrana cel·lular a altres regions de la cèl·lula per tal de fosforilar múltiples substrats i així dur a terme la seva funció¹³⁶.

PTEN antagonitza la funció de la PI3K a través de la defosforilació de PIP3 a PIP2¹³⁷. La pèrdua de funció de PTEN permet l'increment dels nivells de PIP3 i una activació potent de la proteïna PDK1 i Akt estimulants el creixement i la supervivència^{133,138,139}.

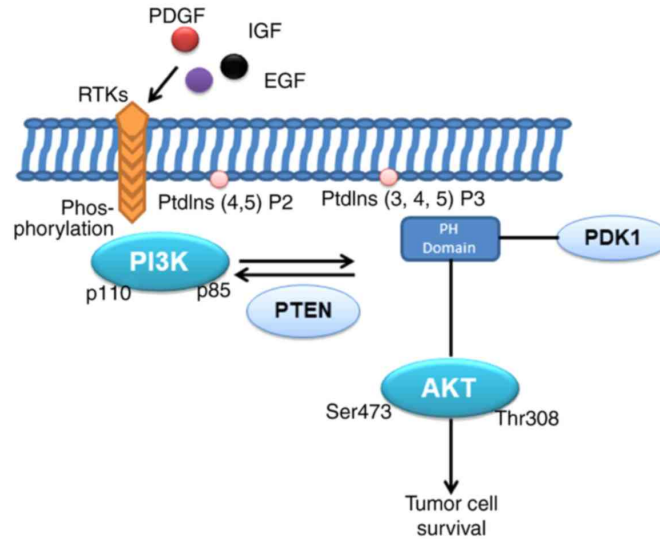


Figura 10. Esquema de la via de senyalització de la PI3K/Akt. El receptor tirosina quinasa (RTK) recluta a la PI3K que fosforila a Ptdlns (4,5) P2 a Ptdlns (3,4,5) P3, que activa a Akt a través del reclutament de PDK1, permetent així l'activació de la via i estímul la supervivència cel·lular. PTEN antagonitza la funció de la PI3K defosforilant les Ptdlns (3,4,5) P3 a Ptdlns (4,5) P2¹⁴⁰.

3.3.1.2 PTEN i carcinoma d'endometri

El carcinoma d'endometri (*endometrial carcinoma, EC*) és el càncer genital més freqüent i representa la quarta neoplàsia més comú entre dones de països desenvolupats¹⁴¹. El 67% de càncers uterins s'originen a partir de les glàndules endometrials, motiu pel qual s'anomena adenocarcinoma d'endometri¹⁴². Els càncers d'endometri es troben classificats en dos categories diferents depenent de les característiques clíniques, metabòliques i endocrines¹⁴³. Els tumors de classe I, són tumors de baix grau i generalment benignes associats amb un excés d'estrògens, obesitat i una hiperplàsia endometrial. En canvi, els tumors de tipus II són tumors més agressius, no presenten ni desordres metabòlics ni endocrins i estan associats a un endometri atrofíic.

D'altra banda, a nivell histològic el càncer d'endometri es pot classificar com endometrioides, serós, carcinosarcomes i carcinomes de cèl·lules clares. Majoritàriament, els tumors de tipus I són endometrioides (*ECC, endometriod endometrial carcinoma*), expressen alts nivells de receptors d'estrògen i progesterona i es diagnostiquen en estadis inicials en dones perimenopàusiques. Els tumors de tipus II són no endometrioides (*NECC, non endometriod endometrial carcinoma*), generalment de tipus serós, expressen baixos nivells de receptors hormonals i són diagnosticats en estadis avançats de la malaltia en dones post-menopàusiques. Els tumors més freqüents són els tumors de tipus I (85%) ja que els tumors de tipus II només suposen un 15 % dels casos¹⁴³.

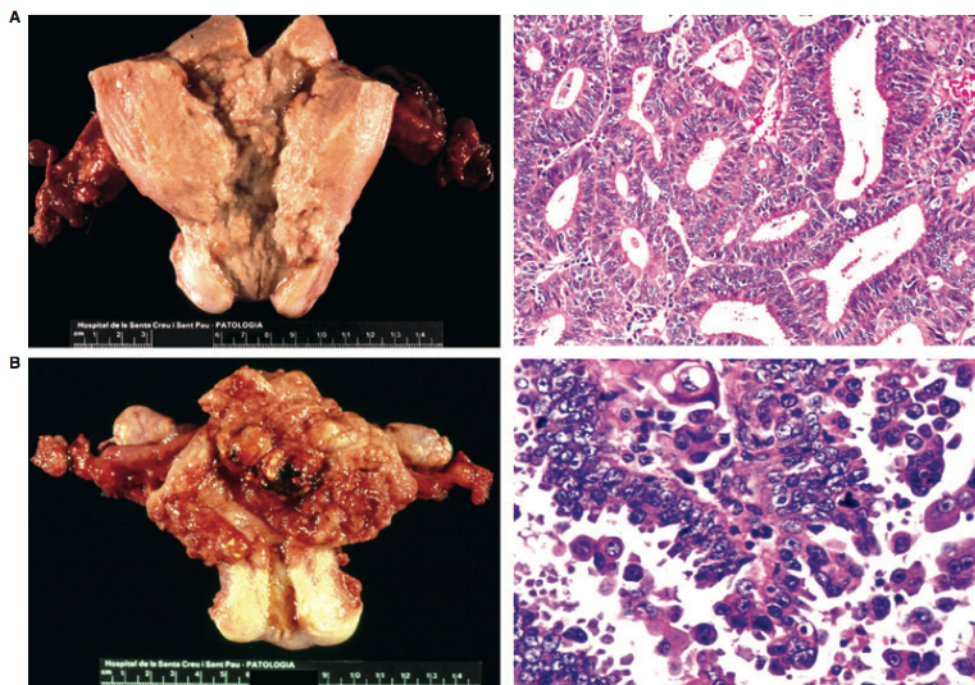


Figura 11. Carcinoma d'endometri. A) Representació d'un carcinoma d'endometri de tipus endometriode. El tall histològic (dreta) mostra una citoarquitectura glandular normal, indicador de que el tumor és ben diferenciat. **B)** Representació d'un carcinoma d'endometri no endometriode. S'aprecia una citoarquitectura aberrant típica d'un tumor d'alt grau¹⁴⁴.

Les alteracions moleculars entre els tumors de tipus I i de tipus II són diferents. Pel que fa als tumors de tipus I, estan preferencialment associats a mutacions en PTEN, KRAS, CTNNB1 i PIK3CA, i inestabilitat de microsatèl·lit. En canvi, els tumors de tipus II mostren inestabilitat cromosòmica, mutacions en p53 i amplificacions de l'oncogen HER2^{144,145}.

En el 80% dels tumors endometriodes el gen supressor tumoral PTEN, regulador negatiu de la via PI3K/AKT/mTOR, és mutat o deletat¹⁴⁶. Les mutacions en PTEN s'han detectat en el 55% de pacients amb hiperplàsia endometrial^{147,148}, i un conjunt de ratolins heterozigots per *Pten* desenvolupen tumors endometriodes^{149,150}. Per tant, s'ha proposat la pèrdua de funció de PTEN com un esdeveniment precoç en la patogènesi del càncer endometriode. A més a més, altres components de la via PI3K/AKT/mTOR són freqüentment mutats en aquests tipus de càncer. Per exemple, PIK3CA, que codifica per la subunitat catalítica de la PI3K (p110), és mutada en el 52%, PIK3R1, que codifica per la subunitat reguladora de la PI3K (p85), és mutada en el 43%, i KRAS que és mutada en el 43% dels càncers endometrials¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

3.3.1.3 Estudi de PTEN en models animals

Els models de ratolí knock-out (KO) de *Pten* han proporcionat evidències sobre el paper de PTEN en carcinogènesi. Ratolins amb la deleció monoal·lèlica de *Pten* (*Pten*^{+/-}) desenvolupen neoplasmes en múltiples òrgans, incloent l'endometri, mama, pròstata, tracte gastrointestinal, teixits limfoides i de la tiroides^{149,155,156}. Els ratolins *Pten*^{+/-} són una bona eina per modelar el fenotip neoplàsic observat en individus amb PTHS (*PTEN tumor hamartoma syndromes*)¹⁵⁰. Malauradament, la letalitat embrionària dels ratolins amb l'excisió bial·lèlica de *Pten* ha limitat l'estudi de l'eliminació completa del gen en el desenvolupament del càncer. Aquesta limitació es va resoldre a través de la generació de ratolins KO condicionals de *Pten*, que presenten ambdós al·lells flanquejats per llocs loxP¹⁵⁷. Per tal de generar la deleció de *Pten* de manera controlada espacialment i temporalment, els ratolins KO condicionals es van creuar amb soques de ratolins que expressen la recombinasa Cre sota un promotor específic de teixit o induïble. Aquesta estratègia va permetre l'eliminació bial·lèlica de *Pten* en diferents tipus cel·lulars o òrgans^{158,159}, com la glàndula adrenal¹⁶⁰, glàndula mamària¹⁶¹, tiroides¹⁶², pròstata^{163,164}, astròcits¹⁶⁵ o hepatòcits¹⁶⁶.

El control temporal en la deleció de *Pten* va ser aconseguit mitjançant el creuament del ratolí condicional KO de *Pten* amb el ratolí que expressa la recombinasa Cre induïble per tamoxifè (Cre-ER^T)^{167,168}, sota el control del promotor Rosa26 (R26Cre-ER^T)¹⁶⁹. En aquest model animal, el tamoxifè causa la deleció de *Pten* en un ampli espectre de cèl·lules, permetent el desenvolupament de múltiples tumors. Malgrat haver molts models disponibles amb la deleció específica de teixit, el nombre de models animals per ambdós tipus de delecions, deleció específica del tipus cel·lular i induïble, és limitat. Específicament en l'úter, la deleció bial·lèlica de *Pten* es va aconseguir mitjançant el creuament del ratolí condicional KO de *Pten* amb un ratolí que expressa la Cre sota el promotor del receptor de la progesterona (PR-Cre)¹⁷⁰. El ratolí transgènic PR-Cre permet la deleció de *Pten* en totes les cèl·lules que expressen el receptor de la progesterona, incloent cèl·lules de l'estroma i de l'epiteli endometrial. Similarment, l'activació de la Cre induïda per tamoxifè en el ratolí R26Cre-ER^T resulta en la deleció de *Pten* en els compartiments epitelials i estromals¹⁶⁹.

En aquest treball utilitzem un model de ratolí induïble per tamoxifè i amb la deleció condicional de *Pten*. L'expressió de Cre es troba sota el promotor de l'actina de pollastre (CAG, *chicken actin promoter*) que principalment permet la deleció en cèl·lules epitelials,

però no en cèl·lules estromals ni hematopoiètiques. Aquesta deleció específica causa desenvolupament d'hiperplàsies i neoplàsies en teixits com l'endometri, la pròstata i la tiroides, però no en altres teixits epitelials. Per tant, aquest model és una eina útil per estudiar els mecanismes moleculars relacionats a la carcinogènesi deguda a la pèrdua de *Pten*¹⁷¹.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Resultats previs del nostre grup mostren que la nucleasa EndoG és la principal executora de la degradació de l'ADN nuclear en cardiomiòcits durant la isquèmia, un model de mort independent de caspases⁵⁶. A més a més, hem demostrat que EndoG també participa en processos no relacionats amb la mort cel·lular. Concretament, hem trobat que EndoG té un paper en la regulació del creixement dels cardiomiòcits¹⁷² i en la proliferació de cèl·lules somàtiques, incloent els cardiomiòcits (Blasco N et al., resultats no publicats). Les nostres dades prèvies també mostren que els efectes sobre la proliferació cel·lular deguts a la manca d'EndoG en cardiomiòcits es relaciona amb canvis en la fosforilació de Akt/PKB (Blasco et al., resultats no publicats). D'altra banda, estudis d'altres grups han mostrat que la nucleasa ExoG, un paràleg d'EndoG en eucariotes superiors⁶³ i la nucleasa TatD, al igual que EndoG, són rellevants durant el procés de mort cel·lular en *C. elegans*¹⁷³. En base al què s'ha publicat sobre EndoG, ExoG i TatD, i els resultats previs del grup que hem exposat anteriorment, la nostra hipòtesi de partida és que les nucleases mitocondrials EndoG, ExoG i la nucleasa TatD tenen funcions importants en el dany a l'ADN durant la mort cel·lular, però també són importants en la regulació d'aspectes rellevants de la biologia cel·lular com el creixement i la proliferació.

Els **objectius** generals d'aquest treball són:

1. Caracteritzar els nivells d'expressió d'*ENDOG/Endog* en línies tumorals humanes i models tumorals de ratolí, quantificar l'efecte del silenciament d'*ENDOG/Endog* sobre la proliferació cel·lular i identificar les vies de senyalització afectades.
2. Caracteritzar l'expressió d'*Exog* a nivell tissular i cel·lular, i analitzar els seus efectes sobre la degradació de l'ADN, el creixement cel·lular i la proliferació, tant en cèl·lules normals com en un model de tumor depenent de *PTEN*.
3. Caracteritzar el fenotip del ratolí deficient en TatD (*Tatdn1* knockout).

MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

1.1 Consideracions prèvies

Els mètodes experimentals utilitzats en els animals de laboratori s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.
- Directiva ECC 63/2010, de 22 de setembre, del Parlament Europeu sobre la protecció d'animals utilitzats amb fins científics.

A més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

1.2 Animals

Els animals han tingut disponibles el menjar i l'aigua *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12.

1.2.1 Rates *Sprague-Dawley*

Les rates *Sprague-Dawley* neonatals de 2 -3 dies d'edat s'han utilitzat per realitzar cultius primaris de cardiomiòcits. També s'han emprat aquestes rates neonatals juntament amb rates adultes de 11 mesos per extreure diferents teixits d'aquestes.

1.2.2 Ratolins *Endog*^{-/-}

Els ratolins *Endog*^{-/-} van ser generats pel laboratori del Dr. Michael Lieber de la Universitat de Califòrnia del Sur, els quals van descriure que l'eliminació d'*Endog* no causava cap efecte en el nombre de còpies de l'ADN mitocondrial, ni en l'estructura ni en el rang de

mutacions al llarg de les 5 primeres generacions. El ratolí *Endog*^{-/-} era viable i no mostrava anomalies anatòmiques o histològiques relacionades amb l'edat o generacionals. El vector utilitzat va ser construït amb un casset d'expressió de la neomicina que servia de separació entre els dos blocs de la seqüència homòloga a *Endog*. El primer bloc d'homologia compren l'exó 1 i intró 1 del gen d'*Endog*. El segon bloc compren l'intró 2 i l'exó 3 del gen d'*Endog* com els exons 10, 11 i 12 d'un gen superposat. Es van electroporar cèl·lules mare amb el vector linealitzat i el resultat va ser la substitució de l'exó 2 d'*Endog* pel casset de la neomicina. Posteriorment, es van seleccionar els clons resistents a la neomicina i aquests van ser utilitzats per ser injectats als blastocists. Els ratolins quimèrics van ser creuats amb ratolins C57Bl/6J per tal d'assegurar la transmissió a la línia germinal.

1.2.3 Ratolins *Pten*^{-/-} i *Endog*^{-/-}

Per tal de generar aquesta nova soca de ratolí el nostre grup ha col·laborat amb el grup del Dr. Xavier Dolcet, el qual ens ha proporcionat el ratolí homozigot floxejat per l'exó 5 de *Pten* (exó que codifica pel domini fosfatasa de la proteïna) que expressa la recombinasa Cre-ER^{T/+} de forma induïble per tamoxifè. S'utilitza aquest ratolí knock-out condicional ja que l'eliminació dels dos al·lels de *Pten* genera letalitat embrional.

Mitjançant el creuament del ratolí *Pten* condicional amb el ratolí transgènic expressant una Cre-ER induïble per tamoxifè sota el control del promotor de la beta actina de pollastre (CAG), van generar un model de ratolí que permetia la deleció temporal de *Pten*, on l'administració d'una única dosi de tamoxifè resultava en la deleció de *Pten* principalment en les cèl·lules epitelials, però no en cèl·lules estromals, mesenquimals ni hematopoiètiques.

El mecanisme d'acció del tamoxifè és a través de la unió amb la proteïna de fusió entre la Cre i una forma mutant del domini d'unió a lligant del receptor d'estrògens murí (ER^T). Aquesta proteïna de fusió no s'uneix a estrògens endògens, de manera que es manté en el citoplasma en absència de tamoxifè. Una vegada s'injecta el tamoxifè, aquest s'uneix a la proteïna de fusió Cre-ER^T, i s'indueix la translocació cap al nucli on actua com a recombinasa sobre els llocs loxP.

Així doncs, el nostre grup ha creuat l'animal floxejat per *Pten* expressant Cre-ER^{T +/-} amb els ratolins *Endog*^{-/-}. Els ratolins knock-out per *Endog* tenen fons genètic C57BL/6J, i van ser generats pel laboratori del Dr. Michael Lieber de la Universitat de Califòrnia del Sur⁷¹.

Per tal d'obtenir els ratolins portadors dels dos al·lels floxejats per *Pten*, una simple còpia de Cre-ER^{T +/-}, i les dues còpies eliminades del gen d' *Endog*, s'han creuat entre si els animals obtinguts en la primera generació: Cre-ER^{+/-}*Pten*^{fl/+}*Endog*^{+/-} amb Cre-ER^{-/-}*Pten*^{fl/+}*Endog*^{+/-}.

Una vegada obtinguts els ratolins amb els diferents genotips desitjats; Cre-ER^{+/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}, Cre-ER^{+/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{+/+}, Cre-ER^{-/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{+/+}, Cre-ER^{-/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}; s'injecta intraperitonealment el tamoxifè d'1 mg a les 4-5 setmanes d'edat.

1.2.4 Ratolins *Tatd*^{-/-}

L'estratègia de disseny dels plasmidis necessaris i la generació del ratolí floxejat per *Tatd* va ser encomanada a l'Institut Australià de Medicina Regenerativa (ARMI) adscrit a la Universitat de Monash a Melbourne, Austràlia.

En primer lloc es prepara el plasmidi d'ADN que permetrà introduir les seqüències loxP flanquejant l'exó 3 de *Tatd*. En la Figura 12A, de forma molt esquematitzada es troba representat l'al·lel wild type i el de l'al·lel floxejat en el que s'ha insertat la construcció generada per recombinació homòloga, on es flanqueja l'exó 3 de *Tatd* per llocs loxP, que seran reconeguts i tallats més endavant per la nucleasa Cre. El protocol s'inicia mitjançant la clonació del gen de *Tatd* en el vector BAC (cromosoma artificial de bacteris) i a continuació es subclona una part del clon *Tatd* en un plasmidi d'alt nombre de còpies. En el subclon de *Tatd* s'insereix un casset loxP-neo-loxP, que porta un gen que confereix resistència a la neomicina, el qual és tallat per Cre deixant només un lloc loxP al subclon. Finalment s'insereix un casset FRT-neo-FRT-loxP en el subclon de *Tatd*-loxP creant el constructe knock-out per *Tatd*. La diana FRT serà reconeguda posteriorment per la recombinasa FLP1 que permetrà l'eliminació del gen neo.

Una vegada dissenyat i preparat el constructe, s'utilitzen cèl·lules mare embrionals (ES) per tal d'introduir la modificació genètica mitjançant electroporació. Es seleccionen les cèl·lules ES amb antibiòtic G418, donat que el constructe conté la casset de resistència a la neomicina. S'expandeixen els diferents clons seleccionats i mitjançant anàlisis d'ADN s'identifica si hi ha hagut recombinació homòloga del vector.

A continuació, s'injecten les cèl·lules embrionals modificades en els blastòcits acceptors i s'implanten en la mare adoptiva. Els animals que neixen es denominen quimeres degut a que deriven de dos tipus de cèl·lules mare, les originals i les modificades. Es creuen ratolins quimera amb ratolins C57BL6 per tal de transmetre el gen a la línia germinal. S'identifica la progènie que ha incorporat el gen a la línia germinal amb el color del pèl del ratolí, ja que les cèl·lules embrionàries genèticament modificades procedeixen d'animals amb un color de pèl diferent als blastòcits als que s'injecten aquestes cèl·lules. Finalment es creuen els animals heterozigots entre si per tal de generar una línia de ratolí homozigòtica (Figura 12B).

La deleció de l'exó 3 resulta en l'aparició d'un codó de terminació prematur en el transcrit d'ARN, la qual cosa impedeix la traducció de la proteïna (Figura 12C).

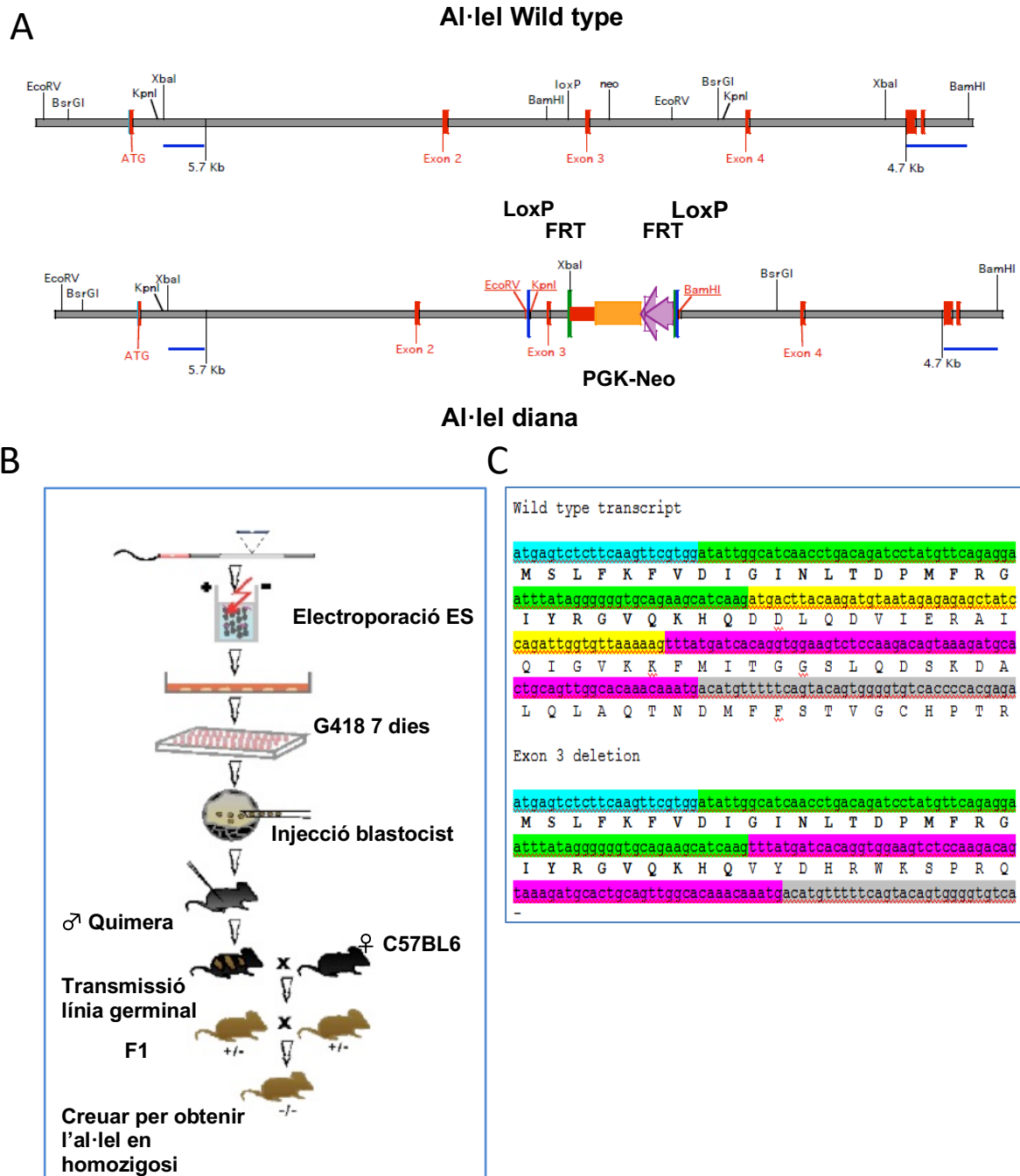


Figura 12. Procés de generació del ratolí *Tatd^{fl/fl}*. **A)** Esquema dels al·lells wild type, on s'indica la ubicació escollida per incloure la diàna loxP i el gen de resistència a la neomicina; i knock-out de *Tatd*, on s'indiquen les dianes loxP (blau), FRT (verd) i el gen de resistència a la neomicina (groc) amb el promotor (lila) i la seqüència poliA (vermell). **B)** Esquema general d'obtenció d'un ratolí knock-out per un gen en concret. **C)** Esquema dels transcrits i seqüència d'aminoàcids resultants de l'eliminació de l'exó 3 de *Tatd*.

Un cop obtinguts els ratolins homozigots floxejats per l'exó 3 amb el casset de la neomicina, aquests s'envien al Servei d'Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona (PCB) on es realitzen els creuaments posteriors per obtenir els animals KO.

Amb la finalitat d'eliminar el gen de resistència a antibiòtic, el ratolí floxejat és creua amb el ratolí ROSA-FLPe (línia B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1(FLP1)Dym/RainJ, fons genètic C57BL/6 adquirit a Jackson Lab.) que expressa el gen de llevat per la recombinasa FLP1 induït pel promotor Gt(ROSA)26Sor. La recombinasa FLP1 reconeix les seqüències que flanquegen el gen de la neomicina (seqüències FRT). Una vegada eliminada la neomicina del genoma del ratolí transgènic, aquest es creua amb el ratolí transgènic que porta el gen cre (línia CAG-Cre B6.Cg-Tg(CAG-cre)CZ-MO2Osb adquirit a RIKEN), una recombinasa que reconeix les seqüències loxP que flanquegen l'exó 3 de *Tatd*, de manera que aquest serà eliminat. Els al·lels que es generen després d'ambdós creuaments explicats es troben en la Figura 13.

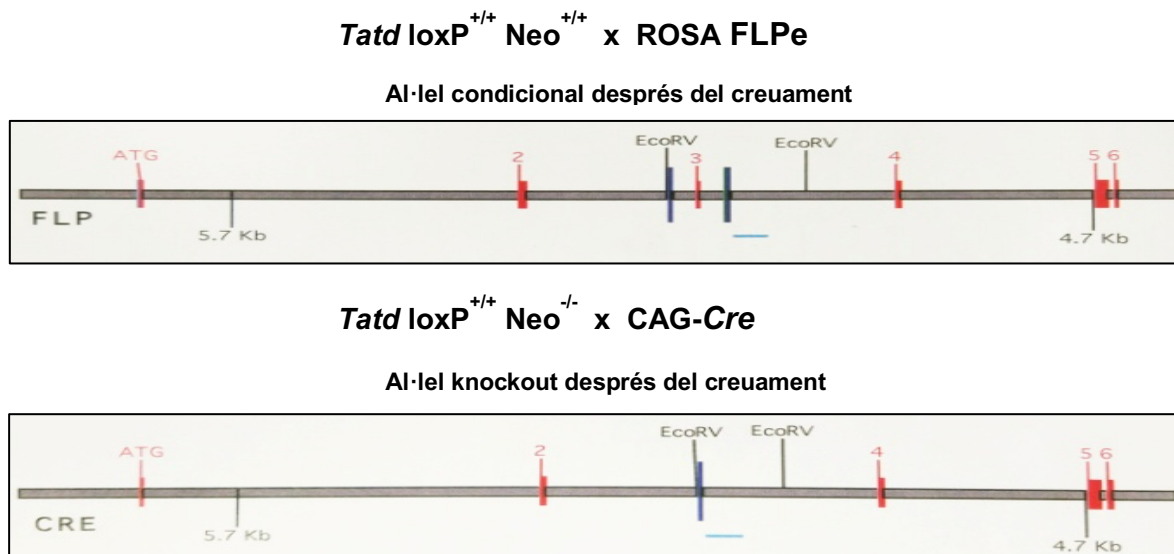


Figura 13. Esquema dels al·lels condicionals resultants després dels creuaments amb el ratolí transgènic flipasa i ratolí transgènic CAG-cre.

1.3 Genotipatge de ratolins

Els animals es sexen i es deslleten als 21 dies de vida, moment en el que es procedeix amb el genotipatge d'aquests. Es marquen amb un codi de talls a les orelles i s'agafa una petita biòpsia de la cua. A continuació, es digereix la cua amb un tampó que conté 100 mM de Tris pH=8.5, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 0.2% de SDS i proteïnasa K a 10

mg/mL. La reacció té lloc a a 55°C durant 4 hores amb agitació. Una vegada digerida la cua, es precipita l'ADN amb etanol al 100%. Per acabar, es dissolt l'ADN amb aigua i es realitza la PCR amb els primers corresponents (Taula 1).

Taula 1. Genotipatge dels animals generats en l'estudi.

Al·lel	Seqüència de primers		Programa de PCR			Bandes	
			T ^a (°C)	Temps	Cicles	Genotip	Mida (bp)
Tatd loxP neo	Fwd	CTACTCTTAAAGACAGCCTTCC	95	3 min	1	loxP ^{+/+} neo ^{+/+}	441
	Fwd	GGTGGATGTGGAATGTGTGC	95	30 sec		loxP ^{+/+} neo ^{-/-}	400
	Rev	CTTTATTTCTCAGATGTGTGGGC	60	30 sec	35	loxP ^{-/-}	270
			72	45 sec			
			72	2 min	1		
CAG cre	Fwd	AGGTTTCGTTCACTCATGGA	95	2 min	1	Cre ^{-/-}	-
	Rev	TCGACCAGTTTAGTTACCC	95	1 min		Cre ^{+/+}	250
			55	1 min	30		
			72	1 min			
			72	10 min	1		
Tatd	Fwd	GGGCTCCAGGTTCACTGAGAG	95	3 min	1	Tatd ^{+/+}	270
	Rev	CTTTATTTCTCAGATGTGTGGGC	95	1 min		Tatd ^{-/-}	500
	Fwd	CTACTCTTAAAGACAGCCTTCC	60	1 min	35		
			72	1 min			
			72	10 min	1		
	Fwd	ACGAACCTGGTCAAATCGTGCG	94	2 min	1	Cre ^{-/-}	-
	Rev	CGGTCGATGCAACGAGTGATGAG	94	45 sec		Cre ^{+/+}	350

CreER			65	45 sec	32		
			72	45 sec			
			72	5 min	1		
<i>Pten</i> floxed	Fwd	CAAGCACTCTGCGAACTGAG	94	3 min	1	<i>Pten</i> ^{+/+}	156
	Rev	AGGTTTTTGAAGGCAAGATGC	94	30 sec		<i>Pten</i> ^{fl/fl}	328
			60	1 min	32		
			72	2 min			
			72	2 min	1		
<i>Endog</i>	Fwd	CAGCTTGACGCGAACTTACC	94	3 min		<i>Endog</i> ^{+/+}	500
	Rev	CTCACGTGACTGTAACCTG	94	20 sec	12	<i>Endog</i> ^{-/-}	250
	Fwd	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	64	30 sec	-0.5°/c		
	Rev	AGGTGAGATGACAGGAGATC					
			72	35 sec			
			94	20 sec	17		
			58	30 sec			
			72	35 sec			
			72	2 min	1		

1.4 Tests de comportament de ratolins *Tatd*^{-/-}

Degut als resultats obtinguts a l'estudi d'expressió gènica comparativa entre ratolins wild type i *Tatd* KO realitzat amb mostres de cor i cervell (array, apartat 3.9), es va decidir realitzar un estudi neuro-comportamental per avaluar si hi havia canvis en l'estat de salut neurològic general, ansietat, activitat locomotora, simptomatologia depressiva, coordinació motora i diversos tipus d'aprenentatge i memòria dels ratolins *Tatd*^{-/-}. Aquesta part del treball es va realitzar en col·laboració amb el grup de Fisiopatologia i Tractament de les Malalties Neurodegeneratives coordinat pel Dr. Albert Giralt a Barcelona on vaig estar realitzant la meva estada.

En concret, els diferents tests realitzats van ser els següents: camp obert, NORT, plus maze, rotarod acceleratiu, T-SAT, força d'adherència, evitació passiva i test de natació forçada, tots representats de manera molt esquemàtica en la Figura 14.

Al final de cada assaig, s'elimina qualsevol defecació i es neteja l'aparell amb etanol al 70%. Els animals són rastrejats i gravats amb el software SMART junior (Panlab, Espanya).

1.4.1 CAMP OBERT/ NORT

Per tal d'estudiar l'activitat locomotora espontània s'ha utilitzat el test del camp obert. Es situen els animals en el centre de l'aparell i se'ls permet explorar lliurement durant 30 min mentre s'enregistra el seu moviment.

El test de reconeixement de nou objecte (NORT) s'ha usat per analitzar la memòria de reconeixement. Durant el primer dia els ratolins s'habituen a la zona en absència d'objectes (camp obert). En el dia d'entrenament, dos objectes idèntics es presenten a cada ratolí durant 10 minuts. Al dia següent, es canvia un dels objectes coneguts i se n'incorpora un de nou i es deixa als ratolins explorar els dos objectes durant 5 minuts. Es mesura la preferència d'explorar el nou objecte introduït en l'assaig.

1.4.2 PLUS MAZE

Per tal d'analitzar l'ansietat del ratolí s'ha utilitzat el plus maze. Aquest laberint està fet de fusta i està compost per dos braços oberts oposats (30 x 8 cm), i dos braços tancats oposats (30 x 8 cm) amb parets de 15 cm d'alçada. L'aparell es troba a 50 cm del terra. Cada ratolí es col·loca a la zona central i es grava el seu comportament durant 5 min.

Es registra el temps dedicat als braços oberts ja que normalment es correlaciona amb nivells baixos d'ansietat.

1.4.3 T-SAT

El test T-maze spontaneous alternation task (T-SAT) s'ha utilitzat per estudiar la memòria espacial. L'aparell està fet de fusta i està compost per tres braços, dos d'ells situats a 180° l'un de l'altre, i el tercer, situat a 90° respecte als altres dos. Tots els braços mesuren 45 cm de llargada, 8 cm d'amplada i estan tancats per una paret de 20 cm. El braç que està situat a 90° respecte als altres dos és el braç d'inici del test i es separa de les altres

zones perquè està tancat per una porta de fusta. També estan situades dos portes idèntiques en les entrades als braços situats a 180°. El laberint està elevat 60 cm per sobre del terra. En la prova d'entrenament, un dels braços està tancat (braç nou). Es col·loca el ratolí en el braç d'inici i se li permet explorar aquest braç i l'altre braç que té disponible (braç familiar) durant 10 minuts. Transcorreguts els 10 minuts, es retorna el ratolí a la seva gàbia. Al cap d'1 hora, es col·loca el ratolí al braç d'inici i se li deixa explorar els tres braços durant 5 minuts. Els animals haurien de mostrar una menor tendència a entrar al braç que els resulta més familiar.

1.4.4 ROTAROD ACCELERATIU

En aquest test s'avalua l'aprenentatge motor dels animals. Els animals es col·loquen en el rotarod (30 mm de diàmetre). La velocitat de rotació augmenta gradualment de 4 a 40 rpm. al llarg de 5 min. Es registra la latència del temps quan l'animal és incapaç de mantenir-se amb l'increment de velocitat i cau. Es realitzen 4 assajos al dia durant 3 dies consecutius. Entre els diferents assaigs es deixen descansar els animals durant 30 minuts.

1.4.5 FORÇA D'ADHERÈNCIA

S'avalua la força muscular del ratolí. Es col·loca el ratolí damunt d'una quadrícula, aquesta es gira i durant un minut es mesura la latència que té el ratolí a caure.

1.4.6 TEST DE NATACIÓ FORÇADA

Aquest test s'utilitza per analitzar la desesperació conductual. Els ratolins es posen dins d'un cilindre ple d'aigua durant 6 minuts. Es mesura el temps que es manté nadant cada ratolí fins que es dona per vençut.

1.4.7 EVITACIÓ PASSIVA

El test d'evitació passiva és utilitzat com a indicador de memòria associativa. Aquest test s'ha dut a terme mitjançant un aparell format per dues cambres. Una de les cambres és il·luminada amb llum blanca i l'altra es troba a les fosques, ambdues connectades per una porta corredissa. Primerament es posa el ratolí en la cambra il·luminada amb la porta corredissa tancada, per tal de separar la cambra fosca de la il·luminada. Transcorreguts 10 segons, s'obre la porta. Un cop el ratolí entri completament a la cambra fosca (amb les quatre potes dins), la porta que separa les cambres es tanca. Es registra la latència del ratolí a entrar a la cambra fosca en el moment que s'obre la porta que connecta les dues

cambres i tarda en creuar. Immediatament després de tancar la porta, l'animal rep un xoc de dos segons (1mA d'intensitat). Vint segons després del xoc, es retira el ratolí de la cambra fosca i es torna a posar a la seva gàbia. Passades les 24 hores de l'entrenament, es torna a posar el ratolí a la cambra il·luminada durant 10 segons, s'obre la porta i es calcula de nou el temps que tarda en travessar a la cambra fosca (amb temps màxim de 10 min). Durant aquest test no es produeix cap xoc.

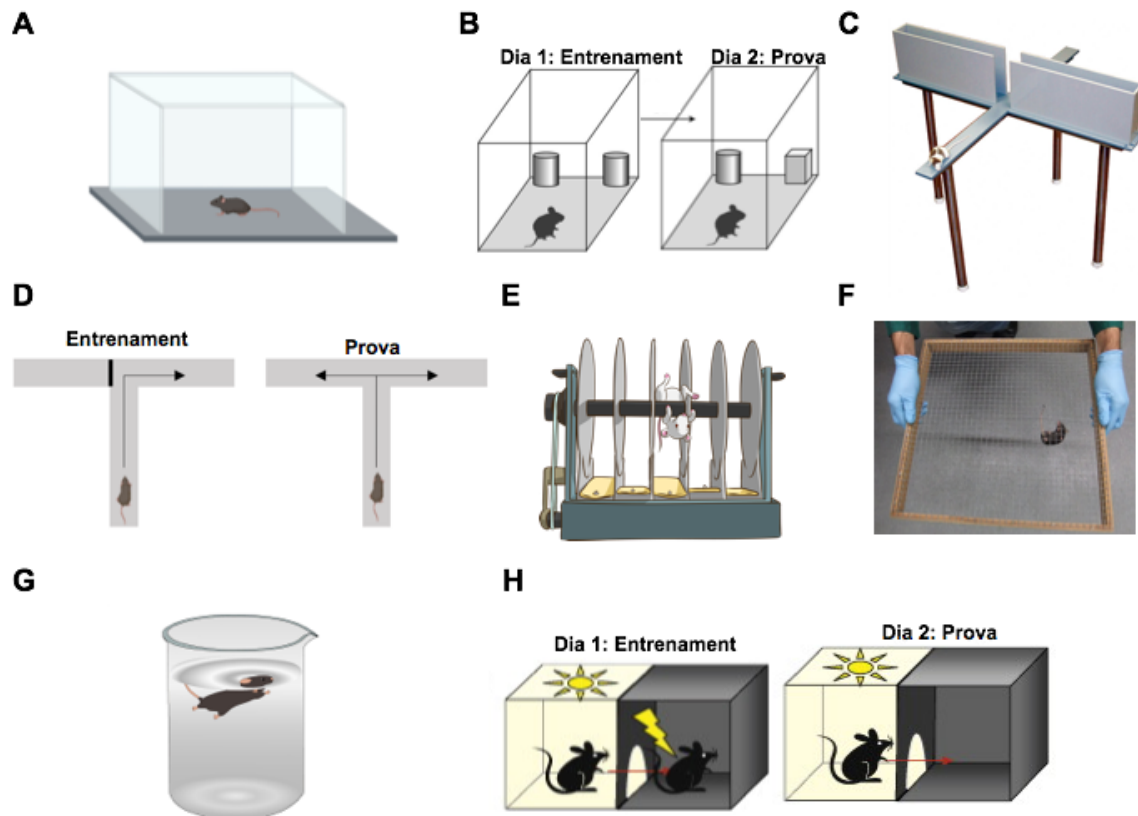


Figura 14. Representació esquemàtica de les proves de comportament realitzades. A) Camp obert. **B)** Test de reconeixement de nou objecte. **C)** Plus maze. **D)** T-maze spontaneous alternation task. **E)** Rotarod acceleratiu. **F)** Força d'adherència. **G)** Test de natació forçada. **H)** Evitació passiva.

2. BIOLOGIA CEL·LULAR

2.1 Cultius cel·lulars

Totes les cèl·lules amb les que s'ha treballat es cultiven en un incubador sota una atmosfera humida a 37°C i 5% de CO_2 . Els medis de cultiu i suplementes que s'utilitzen són de GIBCO Invitrogen: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) amb L-glutamina

(#25030-024), Fetal Bovine Serum (FBS #10270-106) inactivat per calor a 56°C durant 30 minuts i Horse Serum (HS #26050-088), , piruvat sòdic 100 mM (#11360-039), Non-essential Aminoacids (NEAA) (#11140-035), HEPES 1M (#15630-056), Penicil·lina/Streptomocina (P/S) (#15140-122) i tripsina-EDTA (#25200-056).

2.1.1 Línies cel·lulars tumorals humanes.

Les línies tumorals humanes utilitzades en aquest treball han estat cedides pels grups de Patologia Oncològica de l'IRBLleida i Oncologia i Hematologia de l'IDIBAPS (Barcelona). S'han utilitzat línies d'adenocarcinoma d'endometri, de carcinoma fol·licular i anaplàstic de tiroides, d'adenocarcinoma de colon i leucèmia limfàtica crònica (LLC) (Taula 2). Totes les línies creixen de forma adherent excepte la línia de la leucèmia limfàtica crònica (MEC-1).

Pel que fa al protocol de manteniment és el mateix per totes les línies excepte la línia MEC-1 ja que aquestes al créixer en suspensió no requereixen de la disgregació amb tripsina. En referència a les altres, es renta la placa amb tampó fosfat salí (PBS 1X). Seguidament, s'afegeix Tripsina-EDTA amb la finalitat de desenganxar les cèl·lules de la placa, s'inactiva la tripsina amb medi amb sèrum i es centrifuga a 1000 rpm durant 4 minuts per recollir les cèl·lules. Finalment, es sembren en plaques de cultiu en la dilució adequada a cada línia (Taula 2).

El manteniment de la línia limfàtica crònica consisteix en recollir les cèl·lules de la placa en un tub estèril de 15 mL. S'afegeix 6.4 mL de medi en els tubs nous i 1.6 mL de cèl·lules provinents del tub amb la suspensió cel·lular.

Taula 2. Característiques i manteniment de les línies cel·lulars tumorals

Nom de la línia	Patologia	Dilució de subcultiu
IK	Adenocarcinoma d'endometri	1/5
MFE	Adenocarcinoma d'endometri	1/3
HEC-1-A	Adenocarcinoma d'endometri	1/4
FTC-133	Carcinoma fol·licular de tiroides	1/2
Cal-62	Carcinoma anaplàstic de tiroides	1/5
HT-29	Adenocarcinoma de colon	1/4

CACO-2	Adenocarcinoma de colon	1/5
MEC-1	Leucèmia limfàtica crònica	1/5

El requeriment nutricional varia entre aquestes línies cel·lulars, per aquest motiu, s'adjunta la Taula 3 dels medis utilitzats per cada una d'elles.

Taula 3. Medis utilitzats en les línies cel·lulars tumorals

IK, HEC-1-A, MFE-296, FTC-133 i CAL-62.	HT-29	CACO-2	MEC-1
500 mL DMEM	500 mL RPMI	500 mL DMEM	500 mL IMDM
55 mL FBS (10%)	55 mL FBS (20%)	100 mL FBS (10%)	50 mL FBS (10%)
2 mL P/S	5 mL P/S	4 mL P/S	
5 mL HEPES	5 mL HEPES	5 mL NEAA	
5 mL sodi piruvat	5 mL sodi piruvat		

2.1.2 Línia cel·lular HEK293T

És una línia cel·lular humana derivada de cèl·lules de ronyó embrional. Hem utilitzat aquesta línia per la seva capacitat d'empaquetar i produir partícules lentivirals així com a estudis de proliferació cel·lular. Es cultiven amb medi DMEM suplementat amb 10% de FBS, 1:500 penicil·lina/ estreptomycina (P/S), 1:100 NEAA, 1:100 piruvat sòdic i es mantenen en una atmosfera humida al 5% de CO_2 . Per tal de mantenir aquesta línia cel·lular, es renta la placa amb tampó fosfat salí (PBS 1X). Seguidament, s'afegeix Tripsina-EDTA amb la finalitat de desenganxar les cèl·lules de la placa, s'inactiva la tripsina amb medi amb sèrum i es centrifuga a 1000 rpm durant 4 minuts per recollir les cèl·lules. Finalment, es sembren en plaques en la dilució desitjada (dilució habitual 1/10).

2.1.3 Línia cel·lular Rat-2

La línia cel·lular Rat-2 és una línia cel·lular de rata derivada de fibroblasts 3T3 resistent a la 5'-bromodesoxiuridina. Aquesta línia es transfecta fàcilment per ADN exogen.

Creixen en medi DMEM #41965 (4,5 gr/l glucosa) suplementat amb 10% FBS_{hi}, 1mM de Piruvat Sòdic (GIBCO), 1% d'aminoàcids no essencials (GIBCO) i 1% d'antibiòtic penicil·lina/estreptomicina (P/S). El manteniment d'aquesta línia es realitza dues vegades per setmana, realitzant els següents passos: s'afegeix tripsina, es deixa actuar la tripsina durant 3 minuts a 37°C. Posteriorment es recullen les cèl·lules amb medi DMEM i es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 minuts. S'elimina el medi i es resuspen el pellet de cèl·lules en medi complet. Finalment, es sembren en plaques a una dilució 1/10.

2.1.4 Cultiu de cardiomiòcits primaris de rata i ratolí

Els cardiomiòcits primaris s'obtenen a partir de cries de rata Sprague-Dawley de 2-3 dies d'edat. Es prepara el medi de cardiomiòcits (3/4 medi DMEM 1g/L de glucosa #31885, ¼ medi M199 #31150, 10% HS, 5% FBS, 1% L-Glutamina, 1% P/S) així com una solució salina tamponada (ADS 1x) a partir d'una solució mare d'ADS 10 X (6.8g NaCl, 120 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 400 mg KCl, 197 mg $MgSO_4 \cdot 7HO_2$, 1g glucosa, 4.8g Hepes, enrasar amb aigua als 100 mL pH 7.4). S'extreuen els cors i es deixen en una placa p100 amb la solució d'ADS 1X freda. Es pressionen els cors suaument perquè expulsin la sang i es transfereixen a una altra placa amb una nova solució d'ADS 1X freda. S'eliminen les aurícules per reduir la contaminació del cultiu amb fibroblasts i musculatura llisa i es netegen de vasos sanguinis. Es realitzen de 8 a 10 talls longitudinals als ventricles, afavorint d'aquesta manera el procés de digestió. Es transfereixen 4 cors per tub eppendorf amb 1 mL de solució de digestió pre-escalfat (20 µL de col·lagenasa tipus II de Worthington (10U/mL) + 1 mL d'ADS 1X escalfat a 37°C) i s'incuben durant 15 min a 37°C amb una agitació de 1000 rpm. El sobrenedant es recull a un tub estèril contenint 5 mL de medi de cardiomiòcits per neutralitzar la col·lagenasa. Al tub eppendorf anterior s'afegeix de nou 1 mL de solució de digestió i es repeteix el procés de digestió 3 vegades per tal d'assegurar-nos que tot el teixit estigui digerit. A continuació, es centrifuguen els tubs amb els cardiomiòcits a 800 rpm durant 5 min. Es resuspen el pellet de cardiomiòcits de 8 cors en 1 mL de medi que es sembla en una placa p100 amb 9 mL de medi i s'incuba durant 45 min a 37°C, 5% CO_2 . Durant aquest temps els fibroblasts cardíacs i les cèl·lules endotelials es queden adherides a la placa, mentre que els cardiomiòcits no s'adhereixen al no tenir el substrat adequat. Mentrestant, es preparen les plaques que s'utilitzaran en l'experiment amb 0.2% de gelatina (tipus A, de pell de porc, SIGMA). Transcorreguts els 45 min es recull el sobrenedant amb els cardiomiòcits en un tub estèril i es centrifuga durant 5 min a 800 rpm. El pellet es resuspen en 4 mL de medi i es procedeix a comptar el

nombre de cardiomiòcits presents. Per tal de realitzar el comptatge s'agafen 25 μL del medi amb els cardiomiòcits, s'afegeixen 25 μL de Trypan Blue que tenyeix les cèl·lules mortes, ajustant a un volum final de 100 μL amb 50 μL d'ADS 1X. Segons la finalitat de l'experiment i, per tant, del tamany de placa utilitzat es sembra un determinat nombre de cardiomiòcits en plaques pretractades amb gelatina. Transcorregudes les 3-4 hores, si les cèl·lules estan adherides es fan 2 rentats amb PBS 1X i se'ls afegeix medi nou. Aquest pas és important per eliminar totes les cèl·lules que no siguin cardiomiòcits, cèl·lules sanguínies i/o cèl·lules mortes, que es quedaran enganxades als cardiomiòcits si no es fan rentats al poc temps d'haver-los sembrat. Es recomana renovar cada dia el medi dels cardiomiòcits durant els dies que es mantinguin en cultiu. La densitat de sembra és la següent: 75.000 cèl·lules/pou en M4; $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa en p35, $2.5 \cdot 10^6$ cèl·lules/placa en p60.

Pel que fa al cultiu de cardiomiòcits de ratolí el procediment és similar però té algunes excepcions ja que aquests són més sensibles que els de la rata. Es realitzen 3 digestions de 10 min a 800 rpm a 37°C i les plaques que es fan servir a l'experiment es tracten amb 0.5% de gelatina. Com que el rendiment en cardiomiòcits que s'obté és molt menor, les plaques que s'utilitzen durant els 45 min de "pre-plating" perquè els fibroblasts s'adhereixin són p60. Els altres passos del protocol són idèntics al cultiu de cardiomiòcits de rata.

2.1.5 Cultiu de fibroblasts primaris de ratolí

Els fibroblasts primaris de ratolí s'obtenen a partir de cries de la soca C57BL/6 i ratolins transgènics generats al laboratori de 5 dies d'edat. S'extreu la pell i es col·loca en una placa amb ADS 1X. Per tal de facilitar la digestió, es trosseja la pell i es transfereix a un eppendorf que conté el tampó de digestió (1 mL d'ADS 1x, 20 μL de col·lagenasa). Es realitzen 3 cicles de digestió de 45 minuts cadascuna a 37°C i a 1000 rpm. Després de cada cicle de digestió, es transfereix el sobrenedant en un tub de 15 mL que conté 5 mL de medi (DMEM 4,5 g/L glucosa, 5% Piruvat Sòdic 100 mM, 5% aminoàcids no essencials, 15% de FBS i 1% de P/S). Una vegada realitzades les 3 digestions, es centrifuga a 1000 rpm durant 4 minuts i el pellet es resuspen en medi. Es sembra cada pellet de fibroblasts en una placa p60, i al cap de dos dies es transfereixen a una placa p100. El primer dia es sembren en una placa p60 perquè els fibroblasts necessiten una certa densitat per començar a créixer.

2.1.6 Cultiu de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí

Les cèl·lules epitelials d'endometri s'obtenen de femelles d'uns 30 dies d'edat aproximadament. S'extreu l'úter i es talla en 3-4 trossos d'uns 4 mm. A continuació, aquests trossos es netegen amb PBS 1X i es digereixen amb 1% de tripsina (Invitrogen) en HBSS (Hank's balanced salt solution- Invitrogen) durant 1 hora a 4°C. Transcorreguda aquesta hora, els trossos d'úter es deixen incubant durant 45 minuts a temperatura ambient. S'afegeix medi DMEM, el qual conté un 10% de sèrum fetal boví, per tal d'aturar la digestió amb la tripsina.

Per tal d'extreure una làmina de cèl·lules epitelials de la llum de l'úter, s'aplica una petita pressió sobre els trossos d'úter amb una fulla de bisturí. Aquesta làmina es recull i es neteja amb HBSS dues vegades. Seguidament, es realitza una disgregació mecànica a través d'una punta de pipeta d'1 mL 50 vegades. Es resuspenen les cèl·lules en medi basal formant agregats de 4-5 cèl·lules (la individualització de cèl·lules indueix una disminució de la viabilitat cel·lular). El medi basal és medi DMEM/F12 (Invitrogen), complementat amb 1 mM Hepes, 1% de penicil·lina/ estreptomicina i fungizone (Invitrogen). Per tal de sembrar les cèl·lules en dues dimensions s'afegeix un 2% de DCC (dextran-coated charcoal-stripped serum-GIBCO) en el medi basal. Finalment, es deixen les cèl·lules durant 24 hores en un incubador a 37°C i 5% de CO₂.

A l'endemà, les cèl·lules es netegen amb PBS 1X i es tripsinitzen amb Tripsina-EDTA durant 5 minuts a 37°C. S'afegeix DMEM/10% FBS per tal d'aturar la digestió i es recullen les cèl·lules en tubs de 15 mL. A continuació, es centrifuguen les cèl·lules a 800 rpm durant 5 minuts i es netegen un parell de cops amb PBS disgregant-les mecànicament fins formar agregats de 2 a 8 cèl·lules. Es torna a centrifugar durant 5 min a 800 rpm. Per tal de sembrar les cèl·lules en tres dimensions, es tracta la placa amb 3% de matrigel (BD-Bioscience) i també se'ls afegeix matrigel en el medi de les cèl·lules. Al cap de 24 hores, es canvia el medi basal per medi complet (BIE), el qual és medi basal complementat amb 5 ng/ mL d'EGF, una dilució 1:100 d'ITS (insulina-transferrina i selenit de sodi) i 3% de matrigel. Finalment, es renova el medi cada 2-3 dies.

2.2 Obtenció de partícules lentivirals en la línia cel·lular HEK293T

Transfecció amb polietilenimina (PEI)

La polietilenimina (Sigma Aldrich) és un lípid catiònic que neutralitza les càrregues negatives de l'ADN permetent la formació de complexos, els quals presenten una elevada afinitat per la majoria de membranes cel·lulars ja que es troben carregades negativament.

Dia 1. El dia abans de la transfecció es sembren 4 plaques p100 de cèl·lules a una concentració de 2.5×10^6 cèl·lules per placa.

Dia 2. Es canvia el medi per 8 mL de medi DMEM sense sèrum fetal boví ni antibiòtics. Es necessiten 40 µg d'ADN per placa (Taula 4), i es necessiten 5 µL de PEI per cada µg d'ADN. Per tant, s'afegeixen 200 µL de PEI i 800 µL de NaCl 150 mM per cada placa.

Taula 4. Vectors utilitzats en la transfecció

Vector lentiviral (shRNA)	20 µg
Plasmidi empaquetador (psPAX2)	13 µg
Plasmidi embolcall víric (pMD2G)	7 µg

Es dilueixen els 200 µL de PEI en 800 µL de NaCl 150 mM, i els 40 µg d'ADN en 990 µL de NaCl 150mM. Tot seguit, s'afegeix la dissolució de PEI a l'ADN (no al contrari), es vorteja durant 1 min i es deixa la mescla a temperatura ambient durant 10 min. Finalment, s'afegeix la mescla a cada placa p100 de HEK293T i es deixen les plaques a l'incubador durant 3 hores. Transcorregudes les 3 h, es canvia el medi de transfecció per un medi complet.

Dia 5. A les 48 hores de la transfecció es recull el medi de la placa dins la cabina BioIIA, ja que aquest conté els lentivirus. Es centrifuga durant 5 min a 2500 rpm. Es recupera el sobrenedant i es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm, i es centrifuga a 50.000g durant 3 hores a 4°C. S'aspira el sobrenedant i es resuspen el pellet de virus en una solució de PBS a l'1% d'albumina de sèrum boví (30 µL per cada placa p100 de partida). Finalment, es congelen les alíquotes de virus a -80°C fins a la seva utilització o es transdueixen les cèl·lules directament. Els virus es titulen amb cèl·lules HEK293, afegint volums creixents de virus i s'estableix la proporció de virus/cèl·lules que dona major eficiència de

transducció, amb menor toxicitat, mitjançant la observació de les cèl·lules que expressen la proteïna verda fluorescent (GFP) en el microscopi de fluorescència.

2.3 Transducció cel·lular

En els experiments amb sobre-expressió o disminució de gens, s'ha utilitzat transducció lentiviral. Es sembren les cèl·lules en plaques de cultiu a una densitat de 150.000 cèl·lules per pou de P35 (si les cèl·lules són cardiomiòcits es sembren a una densitat de 1.000.000 cèl·lules/pou) i es transdueixen amb 15 µL de virus concentrats directament al medi de cultiu. El medi es renova el dia següent i es deixen les plaques a 37°C durant 72h. L'eficiència en la transducció es monitoritza en el microscopi de fluorescència per les construccions que contenen la seqüència codificant per la GFP.

2.4 Sobreexpressió de TatD-FLAG

La línia cel·lular HEK293 va ser transfectada amb lipofectamina 2000 (Invitrogen) i amb la construcció de TatD-FLAG. Es va utilitzar 1 µL de lipofectamina per 1 µg d'ADN. Per tal de comprovar la sobreexpressió es va realitzar una immunofluorescència i un western blot amb l'anticòs monoclonal anti-FLAG (SIGMA, F3165).

2.5 Anàlisi de la proliferació cel·lular

Per determinar la taxa de proliferació cel·lular *in vitro* s'han realitzat comptatges cel·lulars amb la càmera de Neubauer en diferents tipus cel·lulars amb una expressió d'*Endog*, *Exog*, *Tatd* normal o reduïda. En aquest mètode és important establir el nombre de cèl·lules en el moment inicial del creixement, així com el nombre de cèl·lules presents en el punt final del procés proliferatiu. Es sembla un nombre determinat de cèl·lules en funció del temps de duplicació de la línia cel·lular amb la qual es treballa, el tipus de placa on seran sembrades aquestes cèl·lules i el temps que romandran en cultiu. Transcorregudes 3-5 hores durant les quals les cèl·lules s'adheriran al substrat, es realitza el primer comptatge que permet fixar el nombre de cèl·lules inicials i correspondrà al temps inicial. Al cap de 48-72h es compta el nombre de cèl·lules presents en el temps final, expressant-se la divisió cel·lular com el nombre de cicles completats segons la fórmula $\log_2(N^{\circ} \text{ cèl·lules temps final} / N^{\circ} \text{ cèl·lules temps inicial})$.

2.6 Anàlisi de la proliferació mitjançant assaig d'incorporació de la BrdU

La Brdu (Bromodeoxyuridino 5-bromo-2'-deoxyuridine) és un compost que s'utilitza per

tal de detectar cèl·lules en proliferació ja que és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina i és incorporada en les noves cadenes d'ADN substituint aquesta última.

S'afegeix la BrdU en les cèl·lules en cultiu a una concentració final de 4 µg/ml durant 16 hores. Passades les 16 hores, es fixen les cèl·lules amb paraformaldehid (PFA) al 4%/PBS i en fred durant 20 minuts. Seguidament, es realitzen tres rentats amb PBS 1X. A continuació, s'afegeix HCl 2M durant 30 min a 37°C amb la finalitat de desnaturalitzar l'ADN. S'ha de desnaturalitzar l'ADN per tal que l'anticòs primari pugui reconèixer la BrdU. Transcorreguts els 30 min, s'afegeix tetraborat sòdic 0.1M durant 2 min per tal de neutralitzar el HCl. Es realitzen 3 rentats amb PBS i s'incuben les cèl·lules durant 1 hora amb solució de bloqueig (5% HS, 5% FBS, 0.2% glicina, 0.1% tritó en PBS). Es fan 3 rentats amb PBS i s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs primari en agitació a 4°C durant tota la nit. El dia següent s'elimina l'anticòs primari, es renten els pous tres vegades amb PBS i s'afegeix l'anticòs secundari amb el Hoeschst 33258 en agitació a 4°C durant tota la nit.

2.7 Recompte de cardiomiòcits procedents de teixit cardíac

El protocol pel recompte de cardiomiòcits neonatals procedents de teixit cardíac ha sigut optimitzat en el nostre laboratori basant-nos amb els treballs de Shin et al. i Tamura et al.^{174,175}. El fonament d'aquest protocol és digerir els teixits després de la fixació en formol amb hidròxid de potassi (KOH), disgregant-se les cèl·lules individualment i obtenint-les en suspensió per poder-les comptar.

Els cors neonatals extrets es netegen amb PBS 1X i es fixen durant tota la nit a 4°C amb formol. Al dia següent, els cors es netegen amb PBS 1X, es trossegueixen i es posen en KOH 12.5 M a 4°C durant tota la nit. Passada la incubació amb KOH, es netegen bé els trossos dels cors amb PBS 1X i es col·loquen en un tub amb 3 mL de PBS 1X que es vortejarà durant 10 min. Després del vòrtex es passa per una malla de 250 µM amb l'ajuda d'una xeringa i es recupera la suspensió que la travessa. A continuació es centrifuga 5 min a 1000 rpm, el pellet es resuspen en PBS 1X i ja es poden comptar les cèl·lules amb la càmera de Neubauer. El nombre aproximat de cardiomiòcits que podem obtenir amb aquest protocol és de $1 \cdot 10^6$ cardiomiòcits per cor.

2.8 Subfraccionament cel·lular

Per analitzar la localització específica d'una proteïna dins de la cèl·lula s'ha realitzat un subfraccionament cel·lular que consisteix en la separació dels components de la cèl·lula,

concretament el nucli, el citosol i els mitocondris. D'aquesta manera es pot obtenir la proteïna total de cada una de les fraccions cel·lulars per separat i estudiar, per exemple mitjançant western blot, on es troba la proteïna que ens interessa. Això es possible aplicant un protocol amb tampons de lisi i extracció proteica específics per cada fracció cel·lular, que permeten enriquir la fracció d'interès.

Pel que fa a l'extracció de nuclis s'ha utilitzat el kit Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation (Sigma-Aldrich #NUC-101). Es parteix aproximadament de $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules, que es centrifuguen i a les quals s'afegeix el tampó de lisi durant 5 min en gel. Transcorreguts els 5 min es centrifuguen les cèl·lules a 500g i s'elimina el sobrenedant que conté el citoplasma. Al pellet que correspon a la fracció nuclear es torna a afegir el tampó de lisi, s'incuba en gel durant 5 min i es centrifuga a 500g. El pellet final es resuspen en el tampó de lisi de proteïna i es quantifica la mostra pel mètode de Lowry (Kit Bio-Rad DC Protein Assay).

Pel que fa a l'extracció de les mitocondries s'ha utilitzat el kit Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific #89874). Aquest protocol es basa en utilitzar reactius específics i en realitzar varies centrifugacions diferencials per tal de separar les fraccions citosòliques de les mitocondrials. Es parteix aproximadament de $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules a les quals s'afegeixen 800 μ L del reactiu A. Es vorteja a mitja velocitat durant 5 segons i s'incuba el tub al gel durant 2 min. A continuació, s'afegeixen 10 μ L del reactiu B i es vorteja a màxima velocitat durant 5 segons. S'incuba el tub en gel durant 5 min, vortejant a màxima velocitat a intervals d'un minut. S'afegeixen 800 μ L de reactiu C i s'inverteix el tub varies vegades sense vortejar. Es centrifuga a 700g durant 10 min a 4°C. Una vegada centrifugat es transfereix el sobrenedant a un nou tub de 2 mL i es centrifuga a 12000g durant 15 min a 4°C. El sobrenedant s'elimina (correspon a la fracció citosòlica) i es resuspen el pellet (correspon a les mitocondries aïllades) amb 500 μ L del reactiu C. Es torna a centrifugar a 12000g durant 5 min. Finalment, es descarta el sobrenedant i es resuspen el pellet amb el tampó de lisi de proteïna.

Pel que fa a l'extracció de citosol no s'utilitza cap kit comercial. Es centrifuguen les cèl·lules a 800rpm durant 5 min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es dilueix el pellet en 100 μ L de tampó d'extracció a temperatura ambient. El tampó d'extracció conté 220 mM mannitol, 70 mM de sucrosa, 50 mM Hepes, 10 mM KCl, 5 mM d'EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM d'inhibidors de proteases. S'incuba el tub en gel durant 25 min, colpejant-lo cada 10 min. Transcorreguts els 25 min, es centrifuga a 750g durant 20 min a 4°C i es recupera el

sobrenedant. Es torna a centrifugar a 10000g durant 20 min a 4°C i es recupera el sobrenedant que correspon a l'extracte citosòlic.

2.9 Immunofluorescència (IF)

La immunofluorescència és una tècnica en la qual s'utilitzen anticossos conjugats a fluorocroms, per visualitzar la distribució d'una proteïna específica en cèl·lules o seccions de teixits. El marcatge immunofluorescent es pot realitzar en cèl·lules fixades sobre el plàstic de cultiu o creixent sobre cobreobjectes de vidre.

Les mostres marcades les hem visualitzat sota un microscopi de fluorescència Olympus IX70 connectat a una càmera digital.

Les cèl·lules es sembren en plaques de 4 pous (M4) a una densitat que depèn del tipus cel·lular.

Fixació i Bloqueig. Transcorregut el temps de tractament, es fixen les cèl·lules durant 20 min amb 4% de paraformaldehid (PFA) en PBS 1x. Les cèl·lules fixades es renten amb PBS i es bloquegen amb solució de bloqueig (5% FBS, 5% BSA, 0.1% Tritó X-100 en PBS) durant 1 hora en agitació a temperatura ambient.

Incubació amb els anticossos. Després s'incuba durant 1 hora en agitació a temperatura ambient, amb l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig (Taula 5), i seguidament es fan 2 rentats de 5 min amb solució de bloqueig. A continuació, s'incuba durant 1 hora amb el corresponent anticòs secundari (Taula 5) junt amb les sals de bisbenzimidà Hoescht 33342 (1µg/mL) diluït en solució de bloqueig. Finalment, es realitzen 3 rentats amb PBS.

Montatge. Es monta cada mostra amb una gota de Vectashield (Vector Laboratories, H-1000) i es cobreix amb un cobreobjectes.

En acabar es guarden les plaques a 4°C a les fosques fins la seva observació al microscopi invertit d'epifluorescència Olympus IX70 o bé al microscopi Confocal Olympus FV-1000.

Taula 5. Anticossos utilitzats en immunofluorescència

Anticòs	Casa comercial	Referència	Dilució	Aplicació
α -ACTININ	Sigma	A7811	1:500	IF
BrdU	DAKO	M0744	1:250	IF
Ratolí IgG Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A11005	1:500	IF
Ratolí IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11001	1:500	IF
Conill IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11029	1:500	IF
Conill IgG Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A11002	1:500	IF

2.10 Citometria de flux.

La distribució del cicle cel·lular s'ha determinat mitjançant l'addició de iodur de propidi (PI). És una molècula que s'utilitza com marcador del contingut d'ADN i ARN. La intensitat de fluorescència és proporcional a la quantitat de fluorocrom, que a la seva vegada és proporcional a la quantitat d'ADN de la cèl·lula.

Les cèl·lules es renten amb PBS, es tripsinitzen i es centrifuguen 3 min a 200g. El pellet es renta amb PBS fred, es resuspen en PBS i s'afegeix etanol 100% (-20°C) per obtenir una concentració final del 70%. S'inverteixen els tubs un parell de vegades i es vortejen per assegurar que es barregin i es fixin correctament les cèl·lules.

Finalment, es guarden les mostres a -20°C un mínim de 30 min o fins el dia que s'analitzin en el citòmetre de flux. El dia de l'anàlisi les mostres es renten amb PBS fred dues vegades, es centrifuguen 5 min a 200g 4°C i el pellet es resuspen en 0.5 mg/ml PI en PBS, pH 7.2 (generalment en un volum de 500 μ L, però s'ha d'adequar el volum segons la densitat cel·lular). Les mostres s'incuben 30 min a 37°C en la foscor. La distribució del cicle cel·lular s'analitza utilitzant el citòmetre BD FACSCantoll (Becton Dickinson).

3. BIOLOGIA MOLECULAR

3.1 Estratègia general d'inserció d'un insert en un plasmidi

El clonatge d'un insert d'ADN en un plasmidi s'aconsegueix mitjançant la digestió tant del plasmidi com de l'insert amb els enzims de restricció corresponents. Una vegada digerits, s'utilitza un kit comercial de purificació d'ADN (Nucleospin Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel #740609) que ens permet eliminar tot tipus de material no desitjat, com per exemple sals i enzims. Es quantifica l'insert i el vector amb un espectrofotòmetre (Nanodrop) i tot seguit es realitza la lligació del vector amb l'insert en una proporció 1:3 respectivament.

Per la reacció de lligació s'utilitza l'enzim T4 lligasa a 16°C en un bany d'aigua refrigerat durant tota la nit. La reacció de lligació ha de contenir: el vector i l'insert (proporció 1:3), 1 µL de rATP 10 mM, 1 µL d'enzim T4 lligasa, 1,5 µL de tampó 10x i el volum necessari d'aigua per obtenir un volum final de 15 µL.

La lligació es transforma en una soca bacteriana *E. coli* DH5α (Invitrogen) que s'ha fet competent mitjançant un mètode químic i és sotmesa a un xoc tèrmic. El mètode consisteix en posar tota la reacció de lligació en 50 µL de bactèries competents, es mescla i s'incuba durant 30 minuts en gel. Transcorreguts els 30 minuts, es realitza el xoc tèrmic a 42°C durant 40 segons i immediatament es torna a posar en gel durant dos minuts. S'afegeix 1 mL de medi Luria Broth (LB) i s'incuba a 37°C durant 1 hora en agitació (250 rpm aproximadament) i finalment es sembra la suspensió de cèl·lules en plaques de LB/agar amb l'antibiòtic de selecció corresponent. Es deixen créixer els bacteris en un incubador a 37°C durant tota la nit.

3.2 Test per la identificació de colònies positives per l'insert

Un cop acabada la transformació s'han de distingir les colònies de bacteris que han adquirit el plasmidi amb l'insert de les que han internalitzat el plasmidi buit mitjançant assaig de PCR.

S'afegeix un inòcul de cada colònia que es vol analitzar, en un tub de PCR amb 5 µL d'aigua i s'afegeix la mescla de PCR amb els oligonucleòtids que flanquegin l'insert. El programa de PCR és el següent: 94°C 5 min, (94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s) x 30 cicles, 72°C 7 min,

4°C ∞. En paral·lel es realitza una estria de cada colònia testada així com un precultiu en 2mL de LB amb anitbiòtic.

3.3 Purificació del vector amb l'insert

Per cada insert dissenyat s'elegeix una colònia positiva. Transcorregudes 5 hores d'incubació dels precultius (2mL de LB, 25 µg/mL d'ampicil·lina a 37°C, es transfereix el mini cultiu a un cultiu compost per 440 mL de LB i 880 µL d'antibiòtic (500x) i es deixa créixer a 37°C, en agitació durant tota la nit amb la finalitat d'obtenir una gran quantitat de vector amb insert. A l'endemà es purifica l'ADN amb un kit comercial (NucleoBond Xtra Maxi Plus). La concentració de plasmidi eluïda és determinada amb el Nanodrop.

3.4 Silenciament de l'expressió gènica per interferència d'ARN

La interferència d'ARN (ARNi) és una eina que permet reduir l'expressió dels gens, facilitant l'estudi de la seva funció en comparar amb cèl·lules expressant els nivells normals d'aquests. El mecanisme d'ARNi es basa en la degradació específica o el bloqueig de la traducció de l'ARN missatger (mRNA) de l'hoste a través de l'alliberació citoplasmàtica d'ARN de doble cadena (dsRNA, double stranded RNA) idèntic a la seqüència diana. La degradació de l'ARN del gen diana s'aconsegueix a través d'una via enzimàtica endògena involucrant el complex RISC (RNA-induced silencing complex). Dins de les cèl·lules, els dsRNAs són reconeguts i tallats per Dicer, enzim que talla molècules llargues d'ARN bicatenari generant els siRNAs (small interfering RNAs), molècules d'ARN bicatenari de 19-21 nucleòtids amb 2 nucleòtids desaparellats en cada extrem 3'. Cada cadena d'ARN conté un grup fosfat en l'extrem 5' i un grup hidroxil en l'extrem 3'.

Una de les cadenes del siRNA (la cadena guia) és carregada al complex RISC amb l'ajuda de proteïnes Argonauta (Ago) i proteïnes d'unió a doble cadena de RNA. El RISC localitza la cadena guia a la molècula de mRNA complementària, que subseqüentment és tallat per Ago al voltant de l'híbrid. El mRNA tallat és degradat per altres nucleases endògenes prevenint la seva traducció.

Al llarg del temps s'han desenvolupat diversos mètodes de ARNi, els siRNAs i els shRNAs (small hairpin RNAs). L'aproximació més simple de RNA d'interferència és l'ús de siRNAs ja que aquests es sintetitzen químicament i es transfecten directament al citosol. Els inconvenients que presenta aquesta tècnica és que s'obtenen eficiències de transfecció variables i la concentració de siRNA es va diluint a mesura que la cèl·lula es va dividint. En canvi, els shRNAs són capaços d'integrar-se en el genoma hoste permetent la generació de

línies cel·lulars amb un silenciament que es manté en el temps, eliminant la necessitat de múltiples rondes de transfecció. Per aquestes raons, el mètode d'interferència que hem escollit és el que es basa en la tecnologia del shRNA mitjançant vectors lentivirals.

Els shRNAs són RNAs de doble cadena que contenen una seqüència d'uns 19-21 nucleòtids homòloga a la seqüència del gen que es vol silenciar (cadena sense) seguida d'uns quants nucleòtids que generaran la forquilla ("hairpin") i una seqüència reversa complementària de 19-21 nucleòtids a l'anterior (antisense). La construcció presenta una seqüència de terminació de la transcripció, rica en T.

3.5 Disseny d'oligonucleòtids

S'obté la seqüència d'*Endog* i *Exog* a través de la base de dades "Nucleotide" de NCBI. Degut a la possible homologia entre les seqüències d'*Exog* i *Endog*, es realitza un alineament mitjançant el programa ClustalW2. Es trien seqüències de 21 nucleòtids amb capacitat d'induir silenciament per ambdós gens amb una eina lliure de disseny de ARN. L'enllaç és el següent: <https://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>.

Es dissenyen diversos parells d'oligonucleòtids pel nostre gen diana i un parell d'oligonucleòtids amb la mateixa composició en nucleòtids però ordenats aleatòriament que seran el nostre control negatiu ja que aquests no seran capaços de disminuir l'expressió del gen d'interès ni de cap altre gen cel·lular (Taula 6).

Taula 6. Seqüències dels oligonucleòtids

Seqüències d'oligonucleòtids (5'-3')	
Endog Hs1	gatccccGGGAGTATTAAGGTGGTGAttcaagagaATCACCACCTTTAATACTCCCtttta
	agcttaaaaaGGGAGTATTAAGGTGGTGATtctcttgaaATCACCACCTTTAATACTCCCggg
Endog Hs2	gatccccGGAACAACCTGGAGAAATAttcaagagaTATTTCTCCAGGTTGTTCCtttta
	agcttaaaaaGGAACAACCTGGAGAAATAtctcttgaaTATTTCTCCAGGTTGTTCCggg
Endog Rn1	gatccccGGAACAACCTTGAGAAGTAttcaagagaTACTTCTCAAGGTTGTTCCtttta
	agcttaaaaaGGAACAACCTTGAGAAGTAtctcttgaaTACTTCTCAAGGTTGTTCCggg
Endog Rn2	gatccccGCAGCTTGACTCGAACTTAttcaagagaTAAGTTTCGAGTCAAGCTGCtttta
	agcttaaaaaGCAGCTTGACTCGAACTTAtctcttgaaTAAGTTTCGAGTCAAGCTGCggg
Exog Rn1	gatccccGGAGAGATTTGAAGATGTTTGtcaagagaCAAACATCTTCAAATCTCTCtttta
	agcttaaaaaGGAGAGATTTGAAGATGTTTGtctcttgaaCAAACATCTTCAAATCTCTCggg
Exog Rn2	gatccccGGAACGAAGACAGTTAGTTACTtcaagagaGTAACATACTGTCTTCGTTCCtttta
	agcttaaaaaGGAACGAAGACAGTTAGTTACTtctcttgaaGTAACATACTGTCTTCGTTCCggg
Scrambled	gatccccGGTATGCACCGAATACTACACTtcaagagaGTGTAGTATTCGGTGCATACCtttta
	agcttaaaaaGGTATGCACCGAATACTACACTtctcttgaaGTGTAGTATTCGGTGCATACCggg

Els oligonucleòtids liofilitzats van ser comprats a SIGMA-ALDRICH. Una vegada rebuts, es dissolen a una concentració de 3 µg/µL. Per realitzar l'anellament de cada parell d'oligonucleòtids s'utilitzen 2 µL de cada un d'ells i 46 µL de tampó (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4).

El programa que s'utilitza per l'anellament és un programa seqüencial de reducció de temperatura a diferents intervals de temps:

90°C 4 min, 70°C 10 min, 60°C 15 min, 50°C 20 min, 37°C 35 min, 10°C 40 min

Es verifica l'anellament dels oligonucleòtids mitjançant un gel d'agarosa al 2%.

Els extrems dels oligonucleòtids anellats contenen hemidianes BgIII i HindIII, per tal d'introduir-los al vector pSUPER digerit. Es compren els oligonucleòtids amb les hemidianes amb la finalitat de poder-ho lligar directament al vector.

Pel que fa al silenciament de *Tatd* es van emprar dos vectors comercials pLKO.1 puro (SIGMA) amb les següents seqüències:

- CCGGCATCAAGATGACTTACAAGATCTCGAGATCTTGTAAGTCATCTTGATGTTTTTTG
- CCGGCAACCTGACAGATCCTATGTTCTCGAGAACATAGGATCTGTCAGGTTGTTTTTTG

3.6 Subclonatge del shRNA en el vector pSUPER

El vector pSUPER retro.puro (Oligo Engine) és un vector d'expressió en mamífers que dirigeix la síntesi intracel·lular dels transcrits dels shRNAs. El vector conté el promotor H1 per la RNA polimerasa III que condueix a la producció endògena del shRNA. Per aquest motiu, el promotor H1 es troba situat davant de la nostra seqüència d'interès. Les cèl·lules que adquireixen el plasmidi posseeixen resistència a ampicil·lina ja que aquest conté el gen de resistència a l'antibiòtic.

Per tal d'introduir els oligonucleòtids anellats, es digereix el vector pSUPER amb els enzims BgIII i HindIII (TaKaRa) ja que tenim aquestes dianes en el lloc de clonació. Es realitzen dos digestions successives perquè els tampons no són compatibles. Es digereix 3 µg de vector, amb 1 µL de cada enzim, 2 µL de tampó i s'afegeix aigua per obtenir un volum final de 20 µL. Cada reacció té lloc a 37°C durant 3 hores. D'una digestió a la següent es realitza un clean-up.

Una vegada linealitzat, es lliga el vector i els oligonucleòtids anellats mitjançant la reacció de lligació i es transforma amb la soca bacteriana DH5-α.

A continuació, es purifica el vector amb el shRNA i es talla el fragment que conté el promotor H1 per la RNA polimerasa III amb la seqüència del shRNA mitjançant els llocs de restricció EcoRI i ClaI i es subclona en el plasmidi pLVTHM digerit.

3.7 Subclonatge del shRNA en el vector pLVTHM

El vector pLVTHM és el vector lentiviral que s'ha utilitzat per la transducció dels shRNA en cèl·lules de mamífer. El vector presenta el promotor H1 que serà reemplaçat pel fragment "H1-shRNA" del vector pSUPER, mitjançant els llocs de restricció EcoRI i ClaI. També conté el gen de la proteïna verda fluorescent (GFP) que ens permetrà saber si les nostres cèl·lules han estat transduïdes exitosament.

Per tal de corroborar que el plasmidi conté l'insert, s'envien els plasmidis amb els diferents inserts dissenyats al Servei de Proteòmica i Genòmica de la Universitat de Lleida. La

seqüenciació es realitza amb els oligonucleòtids específics que flanquegen la zona on hauria d'estar l'insert (el shRNA).

3.8 Subclonatge de TatD-FLAG

La seqüència codificant de Tatd de ratolí (MGC:74327 IMAGE:30277245 (MRC Gene Service) va ser amplificada mitjançant PCR. Aquesta seqüència estava flanquejada per les seqüències de llocs de restricció de BamHI i EcoRI. A continuació, es va subclonar en un plasmidi d'expressió pCDNA3.1 (Invitrogen) en pauta de lectura amb l'epítot 3xFLAG.

3.9 Transcripció Reversa i Reacció en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

3.9.1 Extracció d'ARN

Es realitza l'extracció d'ARN dels cultius cel·lulars mitjançant el kit comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Per l'extracció d'ARN dels teixits es segueix el protocol del reactiu Trizol (Life Technologies). Una vegada extret l'ARN, es comprova que no hi hagi degradació mitjançant un gel d'agarosa al 1% i es quantifica la quantitat d'ARN al Nanodrop. Els extractes d'ARN es guarden a -80°C.

3.9.2 Transcripció reversa (RT)

La transcripció reversa és la reacció que ens permet obtenir cADN a partir de ARN. La reacció de la RT conté 5µL H₂O, 4µL tampó 10X, 9µL MgCl₂ (25 mM), 8µL de dNTPs (25 mM cadascun), 2 µL d'hexàmers a l'atzar, 1 µL d' inhibidor de RNAses, i 1µL de retrotranscriptasa, 10 µL d'ARN (conté 1µg ARN) obtenint un volum final de 40 µL. Primer es posen les mostres de ARN a 90°C durant 2 min. Transcorreguts els dos minuts es transfereixen les mostres en gel i s'afegeix la barreja de reacció en tots els tubs i s'inicia el programa de la transcripció que és el següent:

25°C	42°C	95°C	4°C
10 min	60 min	5 min	∞

Els productes finals s'emmagatzemen a -20°C o es continua amb la PCR.

3.9.3 PCR en temps real

Es realitza la PCR en temps real en un sistema de detecció iCycler iQ PCR i el software iQ v.3 i iQ v.5 (BioRad), utilitzant el Taq Man Gene Expression Master Mix (Cat.N. 4369016).

La PCR en temps real quantitativa es realitza en el Servei de Proteòmica i Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Lleida, utilitzant sondes de gens específiques. Les sondes que s'utilitzen estan marcades amb el fluorocrom FAM que el termociclador CFX96 llegeix. El programa utilitzat és el següent: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 cicles a [95°C 15 segons i 60°C 1 min]. Els gens analitzats i la referència de cada sonda es troben a la Taula 7. S'obtenen els resultats en forma de Ct (Cycle threshold), que és el cicle que es determina a partir de la qual el senyal específic sobresurt del soroll de fons. Així doncs, com més cADN hi hagi a la mostra, més baix serà el Ct.

Taula 7. Assajos TaqMan per la PCR en temps real

Nom del Gen	Referència
ExoG (rata)	Rn01445592_m1
ExoG (ratolí)	Mm00549899_m1
EndoG (rata)	Rn01435492_m1
Tatd (ratolí)	Mm00613250_m1
Cd59a (ratolí)	Mm01276238_m1
Cbln4 (ratolí)	Mm00558663_m1
F2RL2 (ratolí)	Mm00438852_m1
Slc22a17 (ratolí)	Mm00480684_g1
Tmprss13 (ratolí)	Mm01179270_m1
Lama5 (ratolí)	Mm01222020_gH
Amy1 (ratolí)	Mm01316918_m1
Lag3 (ratolí)	Mm01185093_g1
Gapdh (rata)	Rn01775763_g1
Gapdh (ratolí)	Mm99999915_g1

3.10 Micro-array d'expressió gènica

Les plaques de micro-array emprades són d'Affymetrix (Mouse Clariom S Array). Aquest anàlisi es va realitzar en col·laboració amb la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) i la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebron (VHIR). L'estudi es

va basar en 24 mostres, entre les quals 12 corresponien a teixit cardíac i 12 a teixit neuronal. De les 12 mostres, 6 corresponien al genotip *Tatd*^{+/+} i 6 al genotip *Tatd*^{-/-} en ambdós tipus de teixit. L'extracció d'ARN utilitzada en aquest protocol es troba explicada en l'apartat 3.8.1. La quantificació de l'expressió gènica en aquest sistema es basa en la hibridació d'exons constitutius de gens anotats amb sondes immobilitzades a la placa.

Amb la finalitat de comprovar que totes les mostres es comportaven similarment, abans de començar l'estudi es van realitzar diversos controls de qualitat de les mostres. El primer que es va dur a terme va ser l'anàlisi en la distribució de la intensitat dels gens analitzats en cada mostra. En aquest cas, es van observar diferències entre els teixits. No obstant això no es van trobar diferències en la distribució entre genotips. Tant l'anàlisi de la component principal (PCA) com el *heatmap* van mostrar que la variable principal que explica les diferències en la distribució d'intensitats de les mostres és el tipus de teixit. Per tal d'incrementar el poder estadístic i eliminar possibles gens amb variacions degudes a les condicions experimentals, es van eliminar aquells que presentaven una desviació estàndard superior al percentil 65. Finalment, es van incloure en l'anàlisi 7105 gens de un total de 35.000.

La manera d'expressar la quantitat relativa de transcrits entre WT i KO va ser el logaritme decimal de la intensitat en el grup WT respecte al KO (logFC). L'anàlisi estadístic seleccionat per comparar cada gen individualment entre WT i KO va ser prova T de Student, ajustant el valor pel procediment estadístic Benjamini-Hochberg. Pel que fa a l'estadística multivariant, es va emprar l'anàlisi tipus *heatmap* i *volcano*. En el *heatmap* es van incloure 440 gens amb un *p-value* menor que 0.01.

4. BIOQUÍMICA

4.1 Western Blot (WB)

Aquesta tècnica s'utilitza per a detectar proteïnes específiques en una mostra determinada i comparar els nivells d'expressió entre mostres diferents i després dels tractaments utilitzats. Els extractes proteics dels lisats són separats mitjançant els gels de poliacrilamida-SDS, depenent del seu pes molecular.

Lisi cel·lular i quantificació proteica. Es renten dues vegades les monocapes de cèl·lules amb PBS1X fred i es lisen amb el tampó de lisis (100 mM Tris-HCl pH6.8, 2%

SDS). Per tal de fragmentar l'ADN genòmic i evitar que interfereixi en el pipeteig es soniquen les mostres. Si les mostres corresponen a teixits, es posa el teixit en el tampó d'extracció i s'homogeneïtza uns 20 segons amb el politrò (Heidolph DIAX 900-5mm). A continuació, es centrifuguen les mostres durant 5 min a 14,000 rpm per eliminar restes de teixit i es recupera el sobrenedant. Una vegada obtingudes les mostres, es quantifica la proteïna total pel mètode de Lowry utilitzant el Kit Bio-Rad DC Protein Assay.

Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Es separen les proteïnes de la mostra utilitzant gels desnaturalitzants de poliactilamida amb SDS. Es preparen els gels de poliactilamida depenent del pes molecular de la proteïna diana. El gel està format per dos parts amb percentatges d'actilamida diferents, el gel separador i el gel apilador. Es prepara el gel separador en el tampó Tris-HCl pH 8.8, 0.1% de SDS i finalment s'afegeix 0.08% de persulfat d'amoni (PSA) i 1 µg/mL de TEMED. Es prepara el gel apilador en Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.067% de PSA i 1.7 µg/mL de TEMED. El percentatge de poliactilamida del gel apilador és un 5%.

Es preparen les mostres de proteïna afegint el tampó de càrrega 5x (10% SDS, Tris pH 6.8, 50% de glicerol, 25% β-mercaptoetanol i blau de bromofenol). Com que tots els pous han de tenir el mateix volum final de mostra, s'ajusten totes les mostres amb tampó de càrrega 1X. En un dels pous es carrega el marcador de pesos moleculars (Invitrogen). Es realitza la migració del gel en el tampó d'electroforesi que conté glicina 110 mM, 0.1% de SDS i 25 mM Tris i a un amperatge constant de 20-25 mA/gel.

Transferència. El sistema de transferència utilitzat és un sistema Hoefer semi-dry TE70X. Es transfereixen les proteïnes del gel a una membrana de polifluorur de polivinilidè PVDF (Immobilon-P, Millipore), prèviament hidratada amb metanol, rentada amb aigua i equilibrada amb el tampó de transferència (48 mM Tris, 0.0375% SDS, 39 mM glicina, 20% metanol). El gel també s'equilibra amb el tampó de transferència.

Es tallen 4 papers de filtre gruixut (Hoefer™ blotting paper), es mullen amb el tampó de transferència i es col·loquen dos papers de transferència sobre la placa base (l'ànode), a sobre es posa la membrana, el gel i després dos papers de transferència més. Finalment, es posa el càtode i s'inicia la transferència a un amperatge constant de 0.8 mA/cm² de membrana durant 1 h.

Una vegada realitzada la transferència de la proteïna del gel a la membrana es comprova que aquesta s'hagi realitzat correctament mitjançant la tinció del gel i de la membrana amb Blau de Comassie i Ponceau S respectivament.

- **Blau de Comassie:** ens serveix com a control de càrrega del Western Blot ja que marca les proteïnes presents en els gels de poliacrilamida. Es deixa el gel tota la nit amb la solució de tinció (0.1% blau de Comassie R-250, 25% d'isopropanol, 10% àcid acètic). A l'endemà, es destenyeix el gel amb la solució que conté 10% d'isopropanol i 10% d'àcid acètic, que permet que el gel quedi transparent però que les proteïnes romanguin blaves.
- **Ponceau S:** es tenyeix la membrana amb el Ponceau (0.1% Ponceau, 5% àcid acètic i H_2O fins 50 mL) durant 5 min a temperatura ambient per tal de verificar si les proteïnes s'han transferit correctament. Després es renta la membrana amb TBS-T (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) fins que la coloració desaparegui i es continua amb el pas del bloqueig.

Bloqueig. Es bloqueja la membrana amb 20 mL de 5% llet desnatada en pols en TBS-T durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. A continuació, la membrana es renta amb TBS- T (3 rentats de 10 min).

Incubació amb l'anticòs primari. La solució de l'anticòs primari es prepara en TBS-T amb 0.02% d'Azida sòdica i s'afegeix el volum d'anticòs primari segons la dilució indicada per la casa comercial (Taula 8). Normalment la incubació amb l'anticòs primari té lloc durant tota la nit a 4°C i en agitació. Però per anticossos que tenen una intensitat de senyal molt alta el temps d'incubació és d'1h a temperatura ambient.

Incubació amb l'anticòs secundari. Al dia següent, es renten les membranes tres vegades (10 min/rentat) amb TBS-T i seguidament s'incuben amb l'anticòs secundari conjugat amb la HRP (Horseradish peroxidase), que produeix luminescència en proporció al percentatge de proteïna present a la mostra. Es dilueix l'anticòs secundari en la solució de bloqueig i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació (Taula 9). Després, es tornen a rentar tres vegades durant 10 min amb TBS-T.

Desenvolupament. S'utilitza el kit de quimioluminescència EZ-ECL (Biological Industries) o Super Signal West Dura (Pierce), depenent de l'anticòs primari utilitzat. Després de la reacció amb l'EZ-ECL o Super Signal, s'exposen les membranes en films Fuji RX

fotosensibles a diferents intervals de temps, i es revelen utilitzant una solució reveladora i una fixadora en la reveladora automàtica Optimax (Protec, Alemanya).

Control de càrrega. Finalitzat el Western blot, es realitza un control de càrrega. S'incuba la membrana amb l'anticòs anti-GAPDH o bé es tenyeix amb blau de naftalè (Sigma-Aldrich) seguint el següent procediment: incubació de la membrana amb la solució de blau de naftalè (0.1% blau de naftalè en 10% metanol-8% àcid acètic) durant 10 minuts, seguint de tres rentats de 5 min cadascun amb la solució de rentat que conté 50% de metanol i 7% d'àcid acètic i es deixa secar la membrana a temperatura ambient.

Taula 8. Anticossos primaris utilitzats en Western Blot.

Anticòs	Casa Comercial	Referència	Dilució
PTEN	Cell Signaling	9559	1:1000
pSer473-AKT	Cell Signaling	4060	1:1000
AKT total	Santa Cruz	sc-1618	1:1000
Ciclina D1	Santa Cruz	sc-20044	1:1000
EndoG	Abcam	ab76122	1:5000
ExoG	Sigma	HPA013609	1:1000
Tatd	Sigma	HPA023634	1:1000
Lipoamida deshidrogenasa	Abcam	ab133551	1:20000
COX-IV	Molecular Probes	A21348	1:10000
Citocrom C	Cell Signaling	4272	1:5000
Lamina A+C	BD Biosciences Pharmingen	612162	1:1000

Lactat Deshidrogenasa	Rockland	200-1173-0100	1:5000
GAPDH	Abcam	ab8245	1:10000

Taula 9. Anticossos secundaris utilitzats en el Western Blot

Anticòs	Casa Comercial	Referència	Dilució
Mouse-IgG HRP	Sigma	A9044	1: 10000
Rabbit-IgG HRP	Sigma	A0545	1:5000
Goat IgG-HRP	Sigma	A9046	1:10000

4.2 Anàlisi de la degradació de l'ADN per electroforesi –CHEF i LADDER

El mètode d'electroforesi de camp pulsant (Pulsed Field Electrophoresis, Contour-Clamped Homogeneous Electric Field CHEF) permet analitzar la degradació d'ADN d'alt pes molecular que no pot ser observada en gels d'electroforesi convencionals. L'aparell utilitzat és el CHEF-DRII System (BioRad) i et permet separar fragments de 5 Kb a 6 Mb.

Aquesta tècnica es basa en aplicar un camp elèctric homogeni controlat que canvia de direcció en un angle predeterminat (120°C) a les mostres d'ADN submergides en el gel. Aquest angle és l'ídoni per separar fragments de 100 Kb a 6 Mb. D'aquesta manera, l'ADN es pot reorientar i moure's a diferent velocitat cada vegada que canvia el camp elèctric.

Recollida de les mostres. Després d'aplicar els tractaments, es recullen les mostres amb un rascador amb la finalitat d'aixecar la monocapa de cèl·lules juntament amb el medi i es transfereix en un tub eppendorf i es centrifuga 5 min a 10000 rpm. A continuació, es renta el pellet amb PBS 1X fred i es torna a centrifugar a 4°C durant 5 min a 11000 rpm. S'aspira el PBS, es congela el pellet a -80°C o es segueix amb el protocol.

Preparació de les mostres. Per poder realitzar l'anàlisi s'han de generar uns blocs d'agarosa que continguin les cèl·lules obtingudes en el pas anterior. Les cèl·lules es

suspenen en 40 µL de PBS 1X i s'atemperen a 60°C durant 5 min. Seguidament, s'afegeixen 40 µL d'agarosa de baix punt de fusió (*Agarose Low Melting Point*, Sigma) al 1% en TBE 0.5X (TBE 0.5X: 45 mM de Tris, 45 mM d'àcid bòric, 1 mM EDTA a pH 8.3) mantinguda en un bany a 60°C. Una vegada homogeneïtzada la mostra es transfereixen els 80 µL en un motlle d'inserció i es deixa solidificar aproximadament 45 min. Una vegada les mostres ja han solidificat, es transfereixen els blocs, de forma individual, a tubs eppendorfs i s'incuben en 1 mL de tampó de lisis (10 mM de Tris, 0.5 M d'EDTA, 1% Lauril Sarcosil) al qual se li afegeix la proteïnasa K (100 µg/mL). La digestió es deixa 24 h en un forn d'hibridació a 50°C en agitació suau. Passades les 24 h, obtenim dos mostres diferents: el bloc d'agarosa que ens servirà per l'anàlisi de la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular, i el tampó que servirà per l'anàlisi de la fragmentació d'ADN de baix pes molecular, també conegut com a *ladder*.

- Anàlisi de CHEF o fragmentació d'alt pes molecular. Els blocs d'agarosa es renten dues vegades amb 1 mL de 0.5X TBE durant 1 hora a temperatura ambient i en constant moviment. Mentrestant es prepara el gel d'agarosa pel CHEF (*Agarose for pulsed field electrophoresis*, SIGMA) a l'1% en TBE 0.5X. Una vegada passat el temps dels rentats, es carreguen els blocs en el gel d'agarosa i es sellegen amb agarosa de baix punt de fusió. Prèviament, l'aparell CHEF es posa en funcionament, afegint 2L de TBE 0.5X i deixant que arribi a una temperatura de 14°C. A continuació, es posa a córrer el gel durant 14 hores a 14°C, a un voltatge constant de 6V/cm i un temps inicial i final de 5-50 segons respectivament. Una vegada finalitzat, es tenyeix el gel amb bromur d'etidi durant 30 min i s'observen les bandes en un transil·luminador de llum ultraviolada (254-360 nm) capturant la imatge amb la càmera fotogràfica.
- Anàlisi de *ladder* o fragmentació de baix pes molecular. Es recupera el tampó de lisi de la incubació amb els blocs d'agarosa i es barreja amb el mateix volum d'etanol al 100% (-20°C). Es barreja per inversió i es deixa tota la nit a -20°C per tal que precipiti l'ADN. Al dia següent, es centrifuga la mostra durant 15 min a 14000 rpm, es renta el pellet amb 1 mL d'etanol al 70% i es torna a centrifugar en les mateixes condicions. A continuació, es deixa assecar el precipitat durant 3-4 hores (fins que veiem que el precipitat es torna transparent). Una vegada sec, es suspèn el precipitat en 10 µL de tampó TE (10 mM Tris, HCl pH 7.5, 1 mM EDTA), s'afegeix RNAsa (10 µL/mL) i s'incuba durant 1 hora a 37°C. Posteriorment, s'escalfen les mostres durant 5 min en un bany a 60°C per tal de garantir que l'ADN es dissolgui

bé. Es prepara un gel d'agarosa a l'1.5% en el tampó TAE 1X amb SYBER Safe (1:10,000) i les mostres es carreguen amb 5 µL d'Orange G (0.15% Orange G, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 30% Glicerol). S'inicia l'electroforesi a 150V i finalment s'observa el gel en el transil·luminador de llum ultravioleta capturant la imatge amb la càmera fotogràfica.

4.3 Activitat nucleasa in vitro

Els extractes citosòlics es van obtenir tal com s'ha descrit en l'apartat de Subfraccionament cel·lular. Concretament, en aquest experiment es van utilitzar fibroblasts dèrmics de ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}*. Una vegada obtinguts els extractes citosòlics (10-30 µg de proteïna), es van incubar amb 1 µg del plasmidi pcDNA3.1 (Invitrogen) linealitzat amb BglII (TaKara, 1021A), en un tampó d'incubació de 50 mM de Tris pH 8, 5 mM de MgCl₂ a 37°C durant 2 hores. Finalitzades les dues hores, les mostres es van correr en un gel d'agarosa al 1% tenyit amb SYBR Safe (Molecular Probes). 63

5. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Segons s'indica a les llegendes de les figures l'anàlisi estadístic es realitza mitjançant l'ús dels tests següents: unpaired Student's t-test, one-way ANOVA, two-way ANOVA i els tests no paramètrics Mann-Whitney i Krustal-Wallis quan es desconeixia si les distribucions eren Gaussianes o hi havia poques rèpliques. Valors de $p < 0.05$ són considerats estadísticament significatius.

RESULTATS

Bloc Endog

1. Caracterització de l'expressió d'*Endog* en línies tumorals d'endometri, tiroides, colon i leucèmia

Resultats previs del nostre grup demostren que la deficiència d'*Endog* genera una disminució en la proliferació en cultius primaris de cèl·lules provinents dels ratolins *Endog*^{-/-} i en línies cel·lulars transduïdes amb els shRNAs d'*Endog*. Donat que es veu afectada la proliferació en cèl·lules no tumorals, vam voler analitzar si aquest defecte en proliferació també té lloc en línies tumorals humanes. Primer de tot, vam analitzar l'expressió basal d'EndoG en tres línies d'adenocarcinoma d'endometri (IK, MFE, Hec-1), dues línies de carcinoma de tiroides (Cal-62 i FTC-133), dues línies d'adenocarcinoma de colon (CACO2 i HT-29) i una línia de leucèmia limfocítica crònica. La línia que presenta més expressió d'EndoG és la línia HT-29, seguida de la línia MEC-1 (Figura 15).

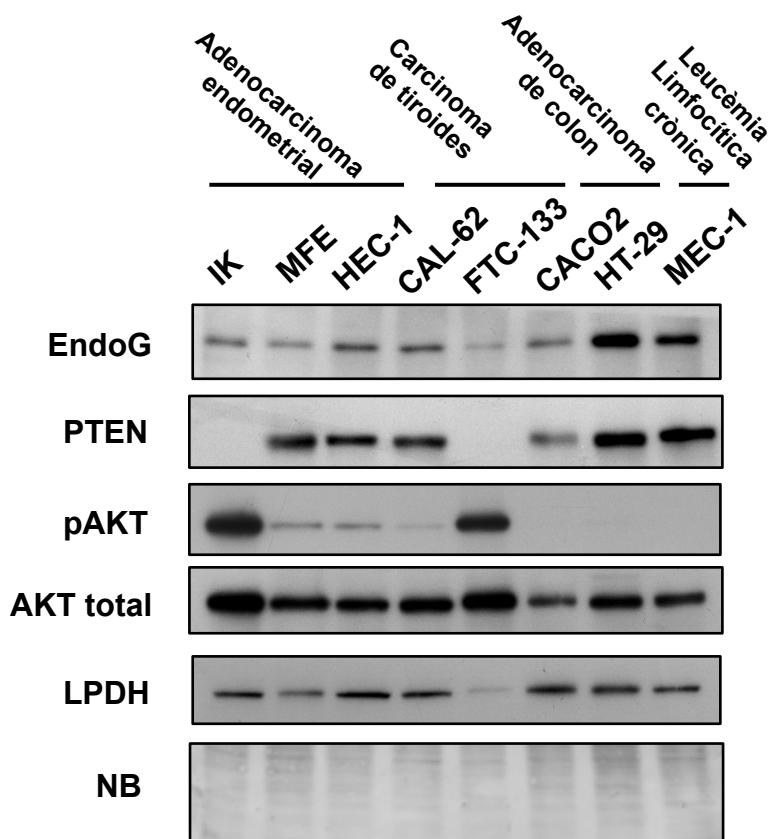


Figura 15. La línia d'adenocarcinoma de colon HT-29 és la línia que presenta els nivells d'expressió d'EndoG més elevats. Western blot mostrant l'expressió d'EndoG, la fosforilació de AKT, l'expressió de PTEN i l'expressió de la lipoamida deshidrogenasa (LPDH) utilitzada com a marcador mitocondrial. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphtol blue (NB).

En cèl·lules normals la disminució de l'expressió d'*Endog* comporta una disminució en la fosforilació de Akt (resultats previs no publicats), proteïna important en la senyalització de la via PI3K/Akt, relacionada amb el cicle cel·lular. Per aquesta raó, vam analitzar els nivells de la fosforilació de Akt en les diferents línies tumorals descrites. Les línies que presenten nivells elevats en la fosforilació de Akt són la línia Ishikawa i la línia FTC-133, línia d'adenocarcinoma d'endometri i línia d'adenocarcinoma de colon, respectivament. Els alts nivells de fosforilació d'Akt en ambdues línies correlacionen amb la nul·la expressió de la fosfatasa PTEN, fosfatasa que inactiva la senyalització de la via PI3K/Akt.

Degut a que *Endog* és una nucleasa mitocondrial, es va analitzar l'expressió de la lipoamida deshidrogenasa (LPDH). Aquesta forma part del complex multienzimàtic 2-oxoglutarat deshidrogenasa, situat en la matriu mitocondrial. La seva expressió ens permet saber si existeix una correlació entre l'expressió d'aquest marcador mitocondrial i EndoG. En la majoria de línies tumorals existeix una correlació en l'expressió de la LPDH i EndoG, a excepció de la línia HT-29.

2. Efecte d'*Endog* sobre la proliferació en línies tumorals d'endometri, tiroides i colon

Per tal d'estudiar l'efecte que es produeix degut a la disminució d'*Endog*, es van seleccionar diferents línies tumorals i es van transduïr amb el vector *scrambled* i amb dos shRNAs d'*Endog* humans. Concretament, les línies cel·lulars estudiades van ser les IK, Cal-62, FTC-133 i HT29 (Figura 16).

Es van seleccionar la línia IK i la línia FTC-133 per l'elevada fosforilació d'Akt que presenten. En les IK, les cèl·lules transduïdes amb els shRNAs d'*Endog* completen un menor nombre de cicles en 72 hores que les cèl·lules transduïdes amb el vector *scrambled* (Figura 16A). En canvi, en les FTC-133 no es produeix un defecte en proliferació significatiu (Figura 16C). En aquestes cèl·lules, l'eficiència de la transducció va ser menor que en la resta de línies transduïdes i en conseqüència la reducció de l'expressió d'*Endog* va ser baixa. Per tant, es va seleccionar l'altra línia de tiroides, la Cal-62, per als estudis posteriors. En aquesta línia, l'eficiència de transducció va ser molt elevada i els nivells d'expressió d'EndoG es redueixen molt en les cèl·lules tractades amb els shRNAs. Tot i així, aquestes cèl·lules es dividien de la mateixa manera que les cèl·lules *scrambled* (Figura 16B).

També es va realitzar l'estudi en proliferació en la línia HT-29 (Figura 16D), línia interessant

pels alts nivells d'expressió d'EndoG que presenten respecte les altres línies estudiades. En aquest cas, tot i la notable reducció de l'expressió d'EndoG amb els shRNAs, les cèl·lules amb els shRNAs d'EndoG completen el mateix nombre de cicles que el control en 72 hores.

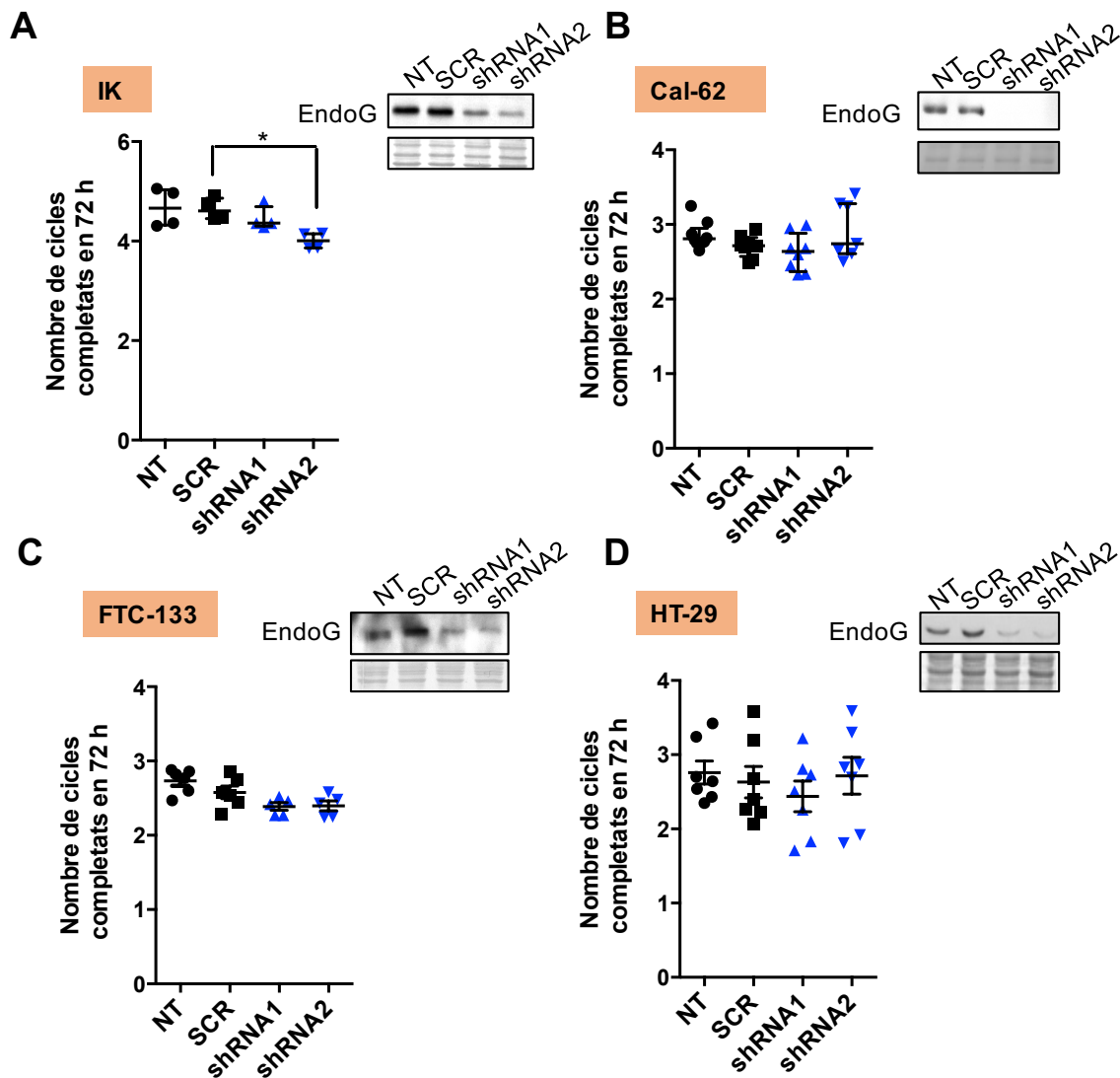


Figura 16 La disminució de l'expressió d'EndoG disminueix la proliferació en la línia tumoral Ishikawa, però no en les altres línies cel·lulars estudiades. Nombre de cicles que completen en 72 hores les cèl·lules tumorals transduïdes lentiviralment amb el vector scrambled (SCR) i amb dos shRNAs d'EndoG. **A)** Ishikawa **B)** Cal-62 **C)** FTC-133 **D)** HT-29. Tots els experiments realitzats han sigut validats mitjançant l'anàlisi d'expressió de proteïna per Western Blot. *p-value < 0.05 (1way ANOVA).

3. Caracterització dels nivells de fosforilació d'Akt en línies cel·lulars de glioblastoma

Tal com es mostra en la Figura 16, *Endog* té un efecte major en la proliferació en la línia Ishikawa, una de les dues línies amb més fosforilació d'Akt. Es sap que l'activitat de la proteïna Akt és elevada en les cèl·lules de glioblastoma degut a la mutació del supressor tumoral PTEN. Per aquest motiu, vam voler analitzar i comparar el nivell d'ambdues proteïnes en dues línies cel·lulars de glioblastoma, la U-87 i la U-251 (Figura 17). En el western blot es van incloure com a control dues línies tumorals d'endometri, les IK com a control positiu d'elevada fosforilació d'Akt i les MFE com a control negatiu de baixa expressió de la fosforilació d'aquesta proteïna. Les U-251 tenen nivells de fosforilació d'Akt similars a les IK i les U-87 similars a les MFE. Així doncs, la línia U-251 presenta una major fosforilació d'Akt respecte a la línia U-87. En canvi, cap de les dues línies presenten expressió de PTEN.

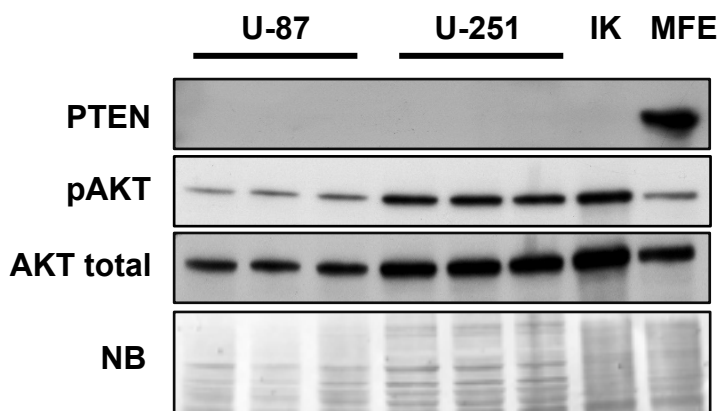


Figura 17. Els nivells de fosforilació d'Akt són més elevats en la línia U-251 de glioblastoma. Extractes totals de proteïna de tres rèpliques diferents procedents de les línies U-87 i tres rèpliques de les línies U-251, en els quals s'ha analitzat la presència de pSer473-Akt, Akt total, PTEN. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphtol blue (NB).

4. Efecte d'*Endog* sobre la proliferació en les línies tumorals de glioblastoma

Una vegada coneguts els nivells basals de fosforilació d'Akt en les dues línies tumorals de glioblastoma, es van dur a terme els experiments de proliferació silenciant *Endog*. Es van transduir ambdues línies amb els dos shRNAs d'*Endog* humans i al cap de 72 hores es van calcular el nombre de cicles completats en les cèl·lules control i en les cèl·lules tractades

amb els shRNAs. En la línia U-87, les cèl·lules que presenten una baixada d'expressió d'EndoG no presenten un retràs en la proliferació cel·lular (Figura 18A). En canvi, en la línia U-251 les cèl·lules tractades amb els shRNAs es divideixen més lentament que les cèl·lules tractades amb el vector scrambled (Figura 18B).

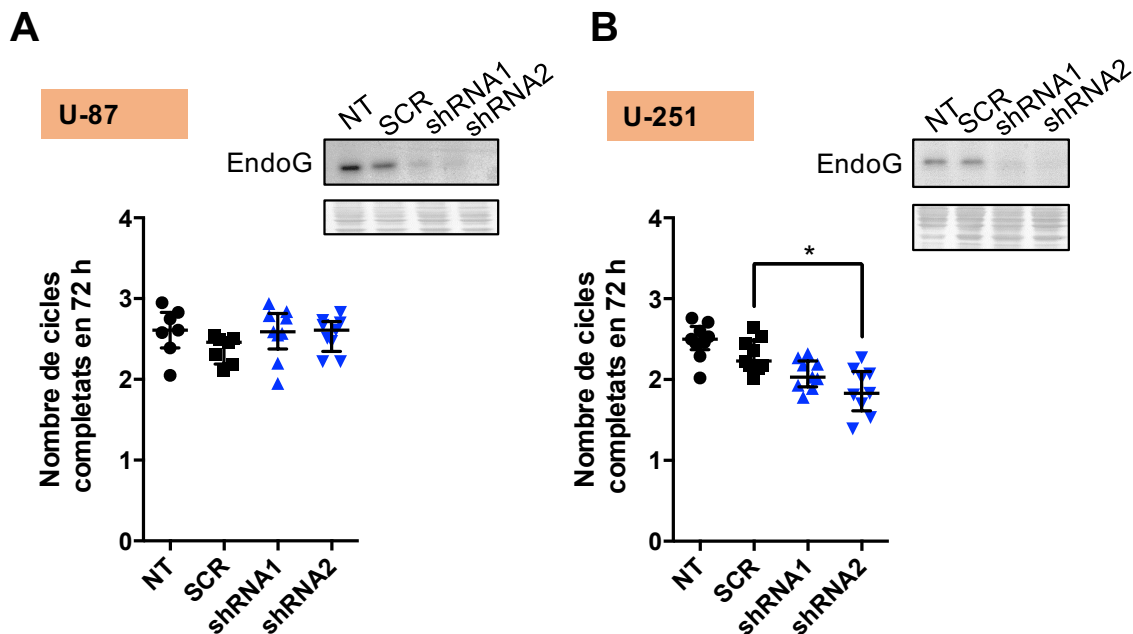


Figura 18. La reducció de l'expressió d'*Endog* genera un defecte en proliferació en la línia U-251 de glioblastoma. Nombre de cicles que completen les cèl·lules de glioblastoma transduïdes lentiviralment amb el vector *scrambled* (SCR) i amb dos shRNAs d'*Endog*. **A)** U-87 **B)** U-251. *p-value < 0.05 (1way ANOVA).

5. Estudi de l'efecte de la reducció d'*Endog* en cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri

Tenint en compte els resultats obtinguts en la línia tumoral d'endometri, vam decidir estudiar l'efecte d'*Endog* en cultius tridimensionals (3D). Aquests imiten l'organització del teixit *in vivo* i tenen un paper fonamental en la investigació de la participació dels gens d'adhesió i polaritat cel·lular en la patogènesis dels càncers epitelials. El grup de patologia oncològica del IRB Lleida va desenvolupar un model de cultiu 3D a partir de cèl·lules epitelials d'endometri de ratolí, on van demostrar que el creixement d'aquestes depèn de la via PI3K/Akt. A més a més, van demostrar que la inhibició de l'expressió de *Pten* augmenta la proliferació de les glàndules d'endometri. Aprofitant aquest model experimental es va

avaluar si la disminució d'*Endog* causava una reducció en el tamany de les glàndules d'endometri deficients en *Pten*.

Es van transduir cèl·lules epitelials d'endometri *wild type* (*Pten*^{+/+}) i *knock-out* (*Pten*^{-/-}) per *Pten* amb un vector *scrambled* i un shRNA d'*Endog*. Passats 8-10 dies després de la infecció, vam veure que el shRNA d'*Endog* era capaç de disminuir l'increment de mida glandular generat pel *knock-out* de *Pten* (Figura 19A). Les mesures del perímetre glandular van confirmar l'increment de mida generat per la pèrdua de *Pten* i també, la disminució de la mida en les glàndules *Pten*^{-/-} quan les cèl·lules eren transduïdes amb el shRNA d'*Endog* (Figura 19B).

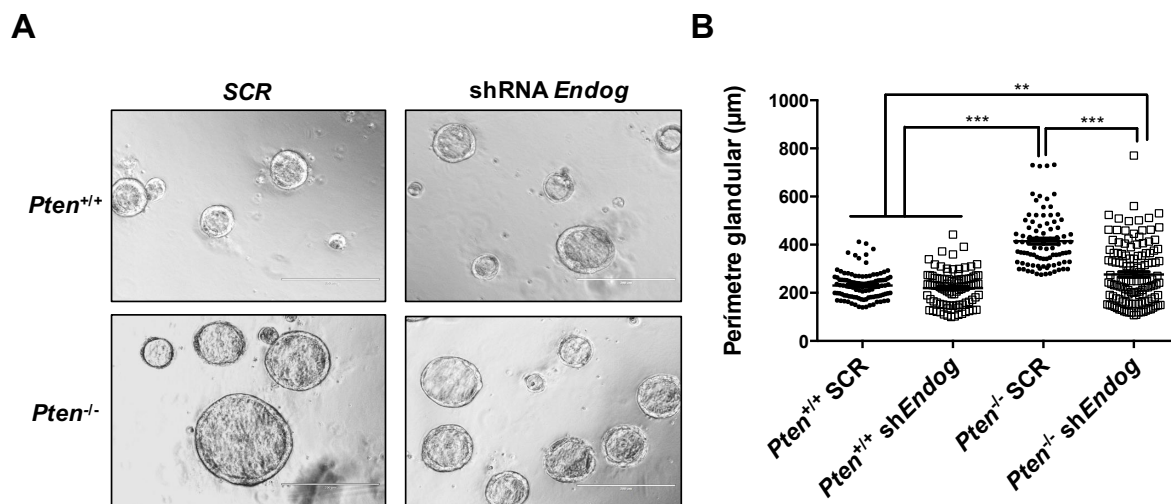


Figura 19. El silenciament d'*Endog* disminueix el tamany de les glàndules en cultius tridimensionals de cèl·lules d'endometri *Pten*^{-/-}. A) Imatges de contrast de fases de cultius 3D *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} infectats amb el vector *scrambled* i amb el shRNA d'*Endog*. B) Quantificació dels perímetres glandulars dels cultius 3D *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} transduïts amb el vector control i amb el shRNA d'*Endog*. **p-value<0.01, ***p-value<0.001 (1way ANOVA).

Es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna PTEN i EndoG per tal de confirmar els genotips *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} i la disminució de l'expressió d'*Endog* causada pel shRNA d'*Endog*. Com s'observa en la Figura 20, la deficiència de *Pten* causa un increment de l'expressió d'EndoG. A continuació, es van analitzar els nivells de fosforilació d'Akt i l'expressió de Ciclina D1 per valorar l'estat proliferatiu de les glàndules. Es produeix un increment en la fosforilació d'Akt i un increment de l'expressió de la Ciclina D1 en les glàndules *Pten*^{-/-} transduïdes amb el vector control. Ambdós increments són revertits quan les cèl·lules *Pten*^{-/-} són transduïdes amb el shRNA d'*Endog*.

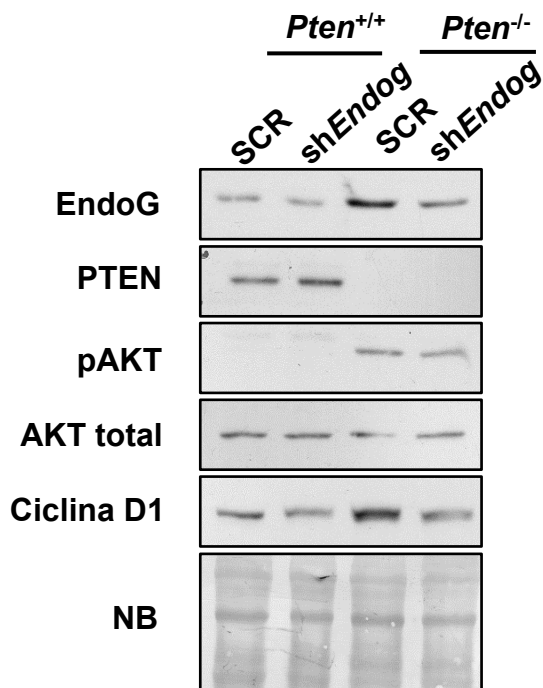


Figura 20. La pèrdua de PTEN genera un increment en l'expressió d'EndoG, de la ciclina D1 i en la fosforilació d'Akt, increment que es veu revertit per la reducció de l'expressió d'Endog. Es van aïllar extractes proteics de glàndules d'endometri *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-}, les quals van ser transduïdes amb el vector *scrambled* (SCR) i el shRNA d'Endog durant 8 dies. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenir la membrana amb naphthol blue (NB).

6. Generació del model animal Cre-ER^{T +/-} Pten^{fl/fl} Endog^{-/-}

Els resultats obtinguts amb el shRNA d'Endog en els cultius tridimensionals de cèl·lules d'endometri *Pten*^{-/-}, ens van dur a generar un model murí que ens permetés la deleció simultània de *Pten* i *Endog*, evitant així la transducció lentiviral. En la Figura 21 es troba representada l'estratègia que es va fer servir per aconseguir el nou model animal. Tal com s'ha explicat en l'apartat de materials i mètodes es va crear el ratolí Cre-ER^{T +/-} *Pten*^{fl/fl} amb el ratolí *Endog*^{-/-}, on es van haver de crear dues generacions per tal d'obtenir els genotips desitjats. Els genotips d'interès són els següents: Cre-ER^{T -/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{+/+}, Cre-ER^{T -/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}, Cre-ER^{T +/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{+/+}, Cre-ER^{T +/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}.

Per tal de facilitar la nomenclatura en les figures de resultats, quan els animals tinguin l'expressió de la recombinasa Cre-ER els anomenarem *Pten*^{-/-}, ja que en presència de

tamoxifè la Cre-ER reconeixerà les seqüències fl/fl de *Pten* i es generarà la deleció d'aquest gen. En canvi, quan els ratolins no expressin la recombinasa Cre-ER, els anomenarem *Pten*^{+/+}.

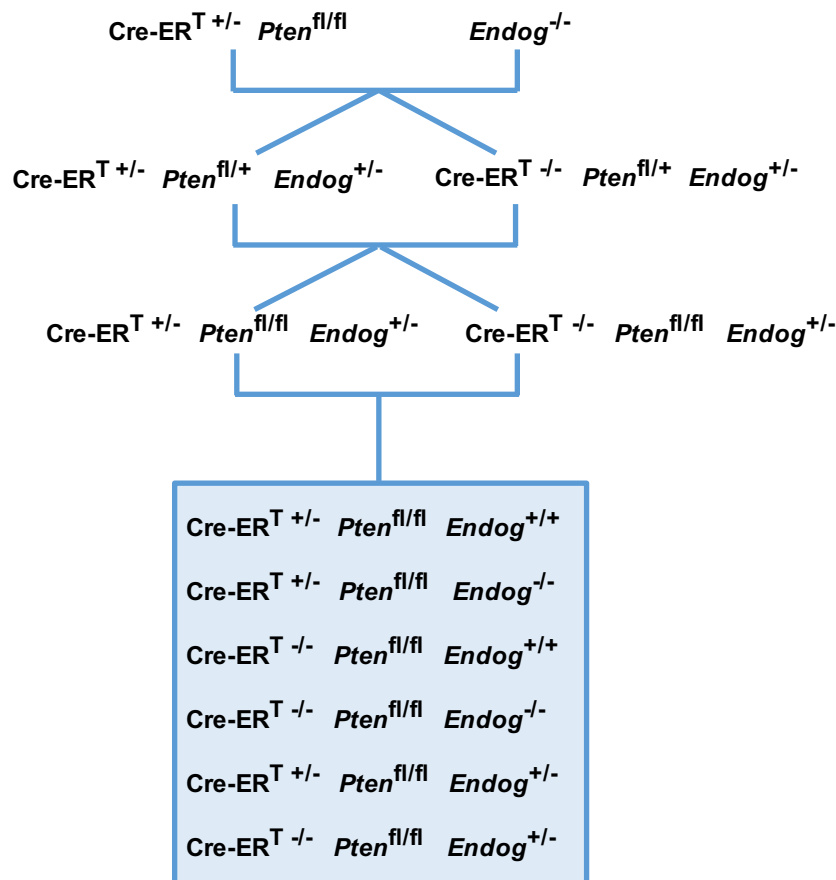


Figura 21. Estratègia utilitzada per la generació del model *Cre-ER*^{T +/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}.

7. Estudi de l'efecte en proliferació en el model *Cre-ER*^{T +/-} *Pten*^{fl/fl} *Endog*^{-/-}.

Una vegada obtingudes les femelles amb els genotips d'interès es van realitzar els cultius tridimensionals de les cèl·lules d'endometri. Tal com s'observa en les imatges de contrast de fases les glàndules d'endometri provinents de femelles *Pten*^{-/-} *Endog*^{-/-} tenen un menor tamany respecte a les glàndules *Pten*^{-/-} *Endog*^{+/+} (Figura 22A). A més a més, tot i no arribar a ser significatiu estadísticament, a través de la quantificació del perímetre glandular vam observar que les glàndules *Pten*^{+/+} *Endog*^{-/-} presenten un menor tamany que les glàndules *Pten*^{+/+} *Endog*^{+/+} (Figura 22B). La quantificació dels perímetres glandulars ens permeten

corroborar l'observat a les imatges de contrast de fases, un augment de mida en les glàndules $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$ i una disminució en les $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$.

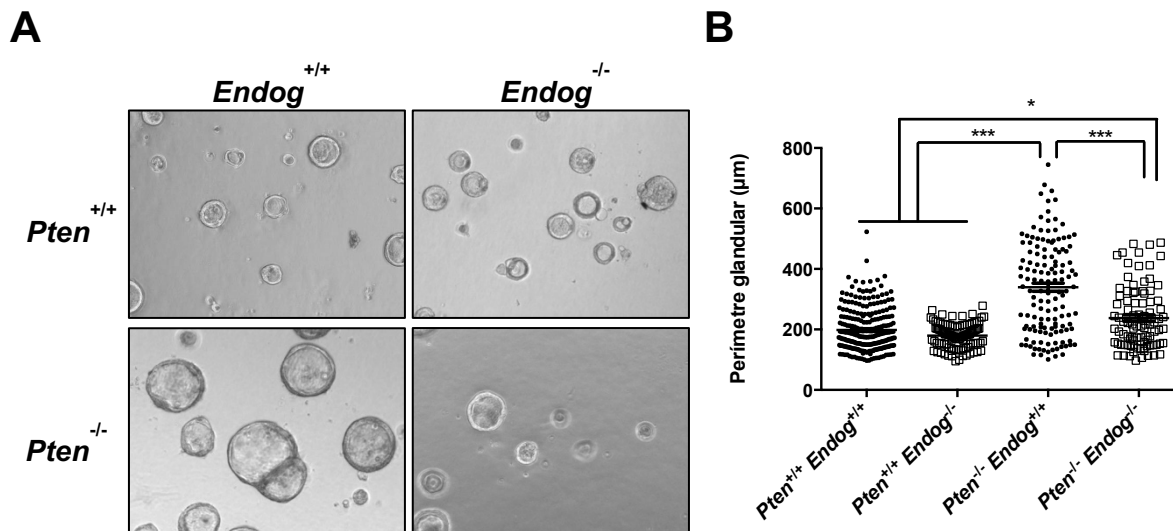


Figura 22. La deficiència d'Endog provoca una reducció del tamany de les glàndules deficientes en Pten. A) Imatges representatives de contrast de fases de cultius 3D de glàndules d'endometri de femelles $Pten^{+/+} Endog^{+/+}$, $Pten^{+/+} Endog^{-/-}$, $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$, $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$. **B)** Quantificació dels perímetres glandulars de cultius 3D de glàndules d'endometri de femelles $Pten^{+/+} Endog^{+/+}$, $Pten^{+/+} Endog^{-/-}$, $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$, $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$. *p-value < 0.05, ***p-value < 0.001 (1way ANOVA).

Per tal de confirmar els genotips de les 4 femelles utilitzades $Pten^{+/+} Endog^{+/+}$, $Pten^{+/+} Endog^{-/-}$, $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$ i $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$, es van analitzar mitjançant western blot els nivells de proteïna de PTEN i EndoG (Figura 23). Es produeix un increment en l'expressió d'EndoG en l'extracte de les glàndules $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$ respecte l'extracte de les glàndules $Pten^{+/+} Endog^{+/+}$. Degut a l'elevada proliferació de les glàndules $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$, la fosforilació de Akt i l'expressió de ciclina D1 estan augmentades. Aquest augment en ambdues proteïnes no es produeix en les glàndules $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$. També es va analitzar l'expressió de la lipoamida deshidrogenasa utilitzada com a marcador mitocondrial, essent més abundant en les glàndules $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$.

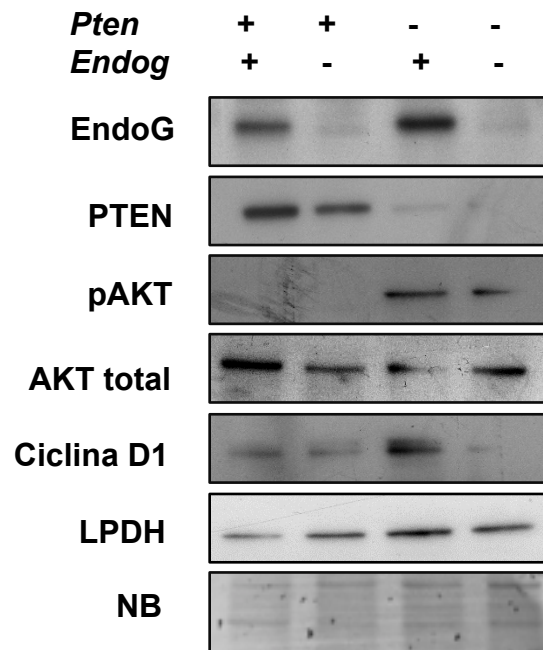


Figura 23. Els animals *Pten*^{-/-}*Endog*^{-/-} presenten una delecció eficient en ambdós gens. Detecció de la banda PTEN en els ratolins *Pten*^{+/+}*Endog*^{+/+} i *Pten*^{+/+}*Endog*^{-/-} i detecció de la banda EndoG en els ratolins *Pten*^{+/+}*Endog*^{+/+} i *Pten*^{-/-}*Endog*^{+/+}. La delecció de PTEN en l'animal *Pten*^{-/-}*Endog*^{+/+} correlaciona amb un augment en p-Akt i Ciclina D1. En contrast, en l'animal *Pten*^{-/-}*Endog*^{-/-} es produeix una disminució en ambdues proteïnes. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue.

Per tal de corroborar els resultats de creixement cel·lular amb una altra tècnica, es va utilitzar un assaig d'incorporació de BrdU. Els cultius tridimensionals de glàndules provinents de femelles *Pten*^{+/+} *Endog*^{+/+}, *Pten*^{+/+} *Endog*^{-/-}, *Pten*^{-/-} *Endog*^{+/+} i *Pten*^{-/-}*Endog*^{-/-} es van deixar créixer durant 8 dies. Com es pot observar en la Figura 24, es produeix una menor incorporació de la BrdU en la delecció simple d'*Endog* (*Pten*^{+/+}*Endog*^{-/-}). Com a conseqüència de l'increment en proliferació ocasionat per la delecció simple de *Pten* (*Pten*^{-/-}*Endog*^{+/+}), el percentatge de nuclis BrdU positius és major. En contrast, la delecció doble de *Pten* i *Endog* (*Pten*^{-/-}*Endog*^{-/-}) genera una reducció significativa del percentatge de nuclis BrdU positius respecte a la delecció simple de *Pten*. Així doncs, aquests resultats corroboren la disminució en proliferació deguda a la deficiència d'*Endog* tant en cèl·lules *wild-type* com en cèl·lules deficients en *Pten*.

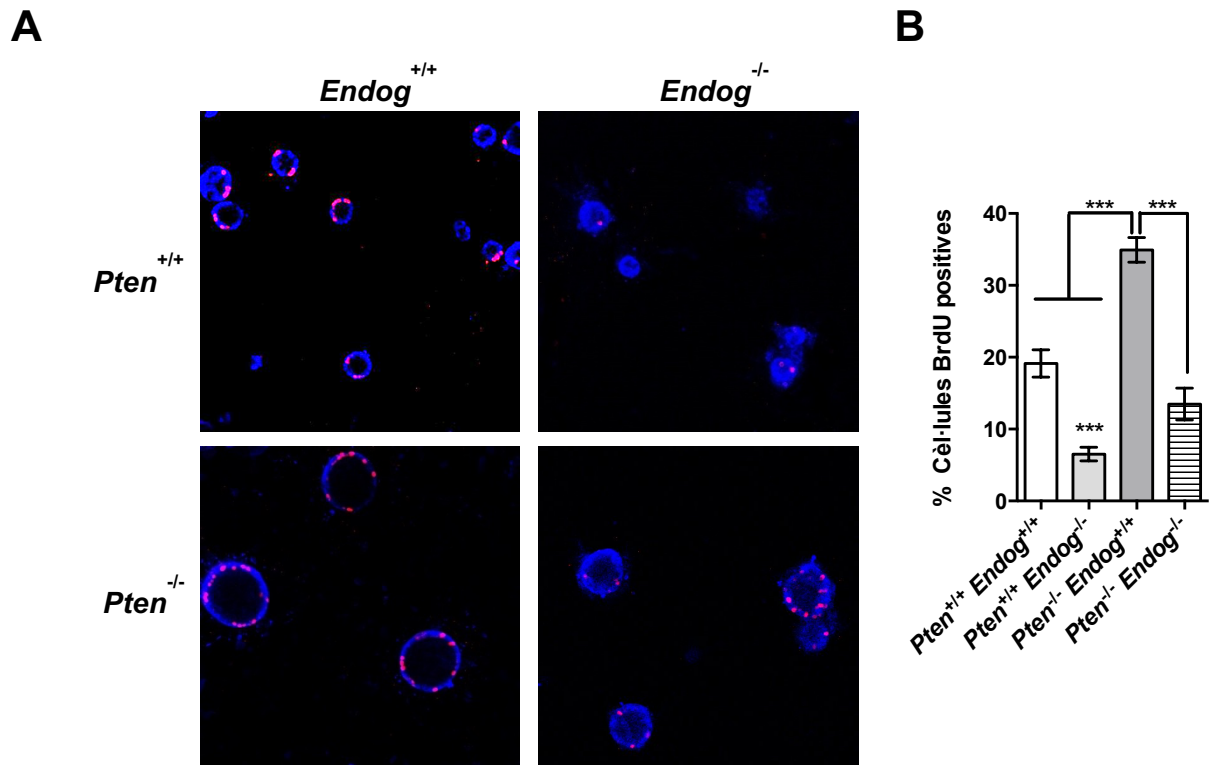


Figura 24. La tinció BrdU revela que la deleció d'*Endog* provoca una reducció de nuclis BrdU positius. **A)** Imatges representatives de microscopia confocal mostrant la incorporació de la BrdU de glàndules de femelles $Pten^{+/+} Endog^{+/+}$, $Pten^{+/+} Endog^{-/-}$, $Pten^{-/-} Endog^{+/+}$ i $Pten^{-/-} Endog^{-/-}$. **B)** Quantificació del percentatge de nuclis BrdU positius presents en les glàndules amb els diferents genotips descrits. ***p-value<0.001 (1way ANOVA).

Bloc Exog

1. Caracterització de l'expressió d'ExoG

1.1 ExoG en diferents teixits de rates neonatals i adultes.

L'anàlisi filogenètic d'EndoG (Figura 25A) revela que durant l'evolució s'ha produït una duplicació del gen endo/exonucleasa ancestral generant els paràlegs EndoG i ExoG en eucariotes superiors. L'endo/exonucleasa Nuc1p, anomenada també com a endonucleasa G del llevat, difereix dels seus homòlegs en mamífers per la presència de l'activitat 5'-3' exonucleasa a més de la seva activitat endonucleasa. Aquesta activitat 5'-3' exonucleasa que presenta el llevat, li permet generar talls monocatenaris en l'ADN de doble cadena durant processos de recombinació i reparació d'aquest. Contràriament a la nucleasa EndoG en mamífers, ExoG exerceix activitat endonucleasa i activitat 5'-3' exonucleasa. Degut al mateix origen comú i activitats enzimàtiques complementàries, vam voler saber si es troben expressades de manera similar en els mateixos teixits de mamífer. L'expressió d'EndoG va ser analitzada anteriorment pel nostre grup i es va determinar que es troba altament expressada en el cor i que la seva expressió incrementa durant el desenvolupament. Per tal de caracteritzar l'expressió d'ExoG, vam analitzar l'abundància del transcrit a diferents teixits de rata neonatal i adulta (11 mesos) mitjançant PCR en temps real. Concretament els teixits que vam analitzar són cor, fetge, melsa, ronyó, múscul i cervell. Els nostres resultats suggereixen que durant el desenvolupament l'expressió d'*Exog* disminueix, essent el cervell el teixit on és més abundant (Figura 25B). A continuació, vam analitzar l'expressió d'ExoG i EndoG a nivell de proteïna confirmant que ExoG es troba principalment en el cervell i que EndoG abunda en el cor (Figura 25C).

Degut a que ExoG i EndoG estan descrites com a nucleases mitocondrials vam analitzar l'expressió de la lipoamida deshidrogenasa i COX-IV per tal de veure si les nucleases correlacionen amb els nivells d'expressió d'aquests dos marcadors mitocondrials. L'expressió d' EndoG correlaciona amb la lipoamida deshidrogenasa i COX-IV. En canvi, ExoG no mostra un clar patró mitocondrial.

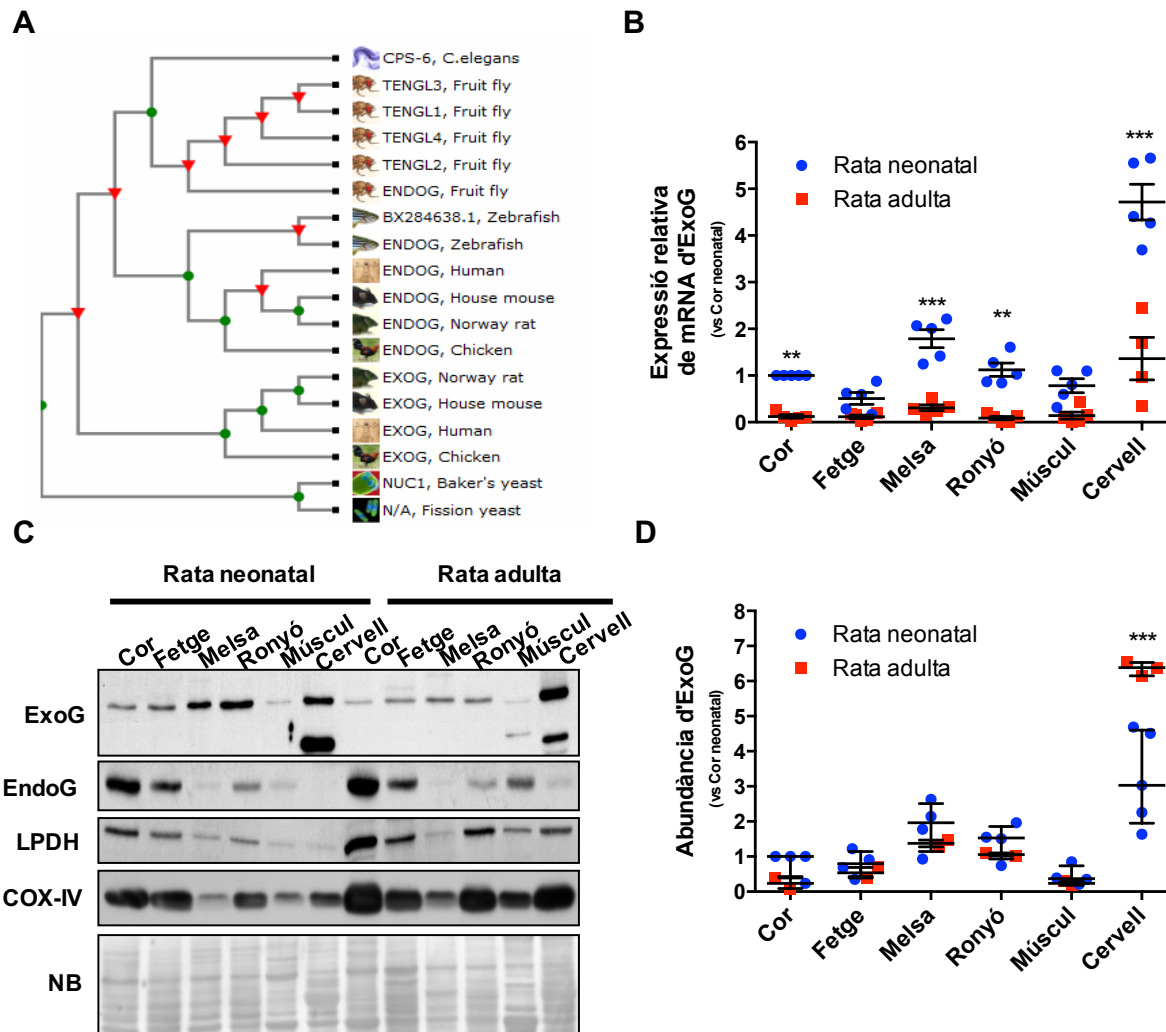


Figura 25. ExoG i EndoG no comparteixen el mateix patró d'expressió en teixits de rata neonatal i adulta tot i tenir un origen evolutiu comú. **A)** Arbre filogenètic d'EndoG i ExoG obtingut a partir de l'eina bioinformàtica TreeFam d'EMBL-EBI. **B)** Abundància de transcrit d' ExoG en cor, fetge, melsa, ronyó, múscul i cervell en rates neonatals i adultes. **C)** Anàlisi de l'expressió d'ExoG i EndoG mitjançant Western Blot dels mateixos teixits que es van analitzar en mRNA. Per comparar l'expressió d'ExoG i EndoG amb proteïnes mitocondrials es van utilitzar la LPDH: lipoamida deshidrogenasa i COX-IV: citocrom C oxidasa subunitat IV. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenir la membrana amb naphtol blue. **D)** Anàlisi densitomètric dels western blots d'ExoG. **p-value<0.01, ***p-value<0.001 (2way ANOVA).

1.2 ExoG en diferents àrees de cervell de rates adultes

Com que ExoG es troba altament expressada en el cervell de rates adultes, vam voler analitzar si la seva distribució és homogènia o està localitzada en determinades estructures del cervell. Vam extreure el bulb olfatori, el cerebel, el tronc de l'encèfal, l'hipocamp i el còrtex de tres rates adultes i no es van veure diferències a nivell de proteïna. En paral·lel

vam analitzar l'expressió d'EndoG, la qual també es troba expressada de manera ubiqua en les àrees del cervell analitzades (Figura 26A).

El sistema nerviós central està format majoritàriament per dos grans grups de cèl·lules: les neurones i les cèl·lules glials. Per aquest motiu vam analitzar l'expressió d'ExoG i EndoG en neurones i cèl·lules glials en cultiu. ExoG es troba principalment expressada en les neurones i EndoG és més abundant en les cèl·lules glials com el marcador mitocondrial COX-IV. Per tal de comprovar el grau d'enriquiment i contaminació en cadascun dels extractes cel·lulars vam utilitzar la β 3- tubulina com a marcador neuronal i la GFAP com a marcador de cèl·lules glials.

Com es pot veure en la Figura 25C i Figura 26A, quan s'analitza l'expressió d'ExoG en els extractes de cervell i en les neurones, apareix una banda de menor tamany a l'esperada (d'aproximadament 37 kDa). Per tal de saber si aquesta banda era específica, vam dissenyar dos shRNAs d'ExoG de rata i vam transduïr cèl·lules de la línia de fibroblasts Rat-2, i vam veure que ambdós shRNAs produeixen una disminució de la proteïna a la talla esperada (Figura 26B).

A continuació, vam transduïr cèl·lules de la línia PC-12 ja que són cèl·lules que responen a NGF mitjançant la inducció d'un fenotip neuronal. En els westerns blots realitzats amb aquesta línia cel·lular apareix la banda de menor mida que havíem observat en les diferents àrees de cervell i en les neurones. Tal hi com es mostra en la Figura 26C, la banda corresponent a ExoG disminueix en les cèl·lules tractades amb el shRNA1 respecte a cèl·lules no transduïdes o transduïdes amb el *scrambled*. En canvi, no es produeix una disminució de la banda de menor mida, indicant així que aquesta última és inespecífica.

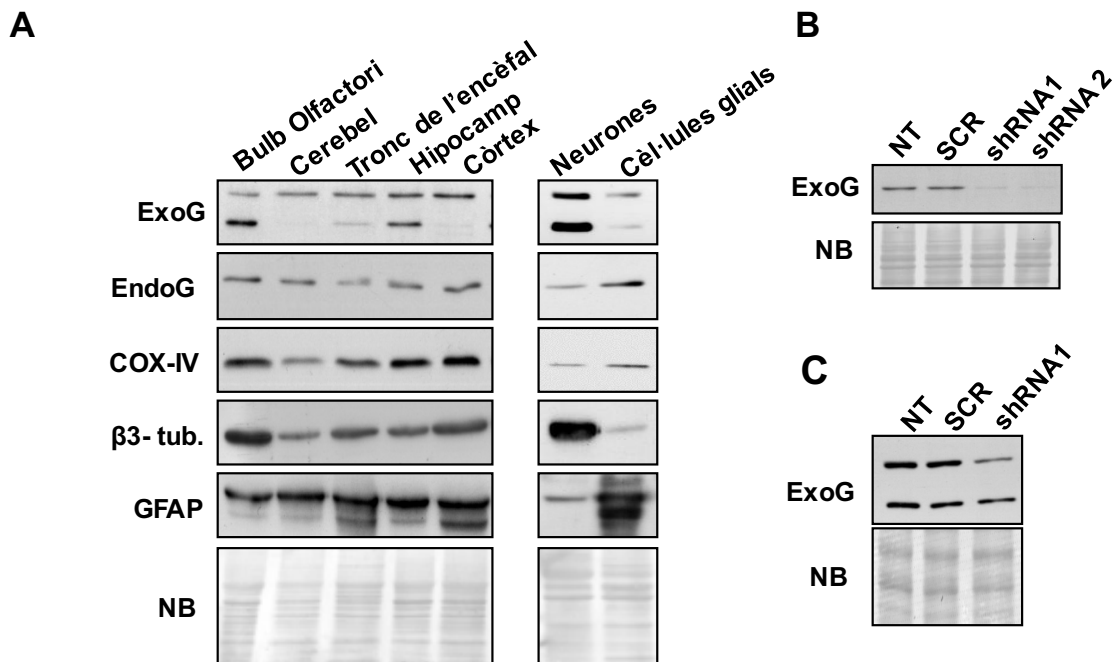


Figura 26. ExoG es troba principalment expressada en neurones. A) Anàlisi de l'expressió d'ExoG i EndoG en bulb olfactori, cerebel, tronc de l'encèfal, hipocamp, còrtex, neurones i cèl·lules glials. Es va utilitzar la β 3- tubulina com a marcador neuronal i la GFAP com a marcador de cèl·lules glials. **B)** Anàlisi de l'especificitat de l'anticòs d'ExoG mitjançant la transducció amb dos shRNAs d'ExoG en cèl·lules Rat-2. **C)** Anàlisi de l'especificitat de la banda de menor pes molecular que apareix en la línia cel·lular PC12. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es van tenyir les membranes amb naphthol blue.

1.3 ExoG en cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs

Donada l'elevada expressió d' EndoG en el teixit cardíac, el nostre grup va demostrar que aquesta és present de manera majoritària en els cardiomiòcits. Per tal de saber si ExoG es troba en els cardiomiòcits o en els fibroblasts cardíacs (principals tipus cel·lulars que componen el cor), es van realitzar cultius primaris d'ambdues poblacions aïllades de cors de rates neonatals. Contràriament a EndoG, ExoG es troba expressada de manera similar en els cardiomiòcits i en els fibroblasts cardíacs (Figura 27A). Tal i com s'ha mencionat anteriorment, s'ha utilitzat COX-IV com a marcador mitocondrial, i la seva expressió correlaciona amb l'expressió d'EndoG però no amb l'expressió d'ExoG. Per tal de comprovar el grau d'enriquiment i contaminació en cadascun dels extractes cel·lulars, vam utilitzar la α -actinina com a marcador de cardiomiòcits i la vimentina com a marcador de fibroblasts.

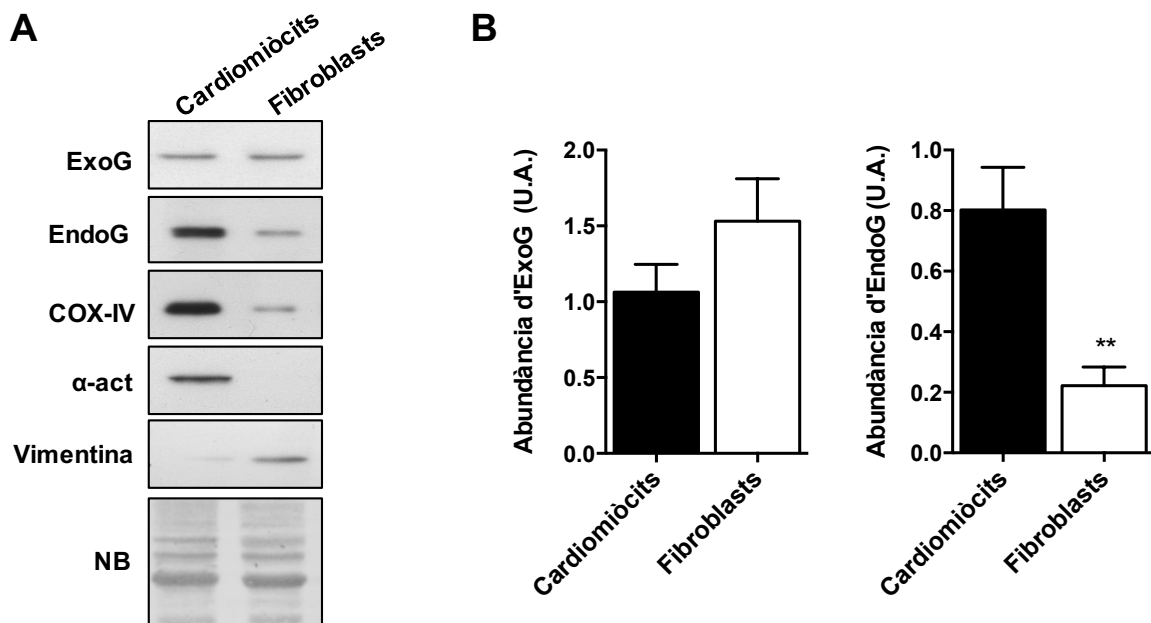


Figura 27. ExoG es troba expressada tant en cardiomiòcits com en fibroblasts. En canvi, EndoG és majoritària en els cardiomiòcits. A) Els extractes totals de proteïna procedents de cultius primaris de cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs van ser analitzats mitjançant western blot, utilitzant anticossos específics contra ExoG, EndoG, COX-IV, α -actinina i vimentina. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenir la membrana amb naphthol blue. **B)** Anàlisi densitomètric dels western blots d'ExoG i EndoG. **p-value<0.01 (Mann Whitney test).

2. Anàlisi de la translocació d'ExoG durant la isquèmia experimental

S'ha demostrat que EndoG es troba localitzada en l'espai intermembrana mitocondrial i es transloca al citosol sota condicions d'estrès. Degut a que ExoG no mostra un clar patró mitocondrial, vam decidir estudiar la seva localització subcel·lular tant en condicions normals com en condicions d'estrès. Es van cultivar cardiomiòcits en condicions control, 21% d'oxigen i 5% de CO₂, i en condicions d'estrès hipòxic durant 18 hores, 0.2% d'oxigen i 5% de CO₂, simulant una isquèmia. A continuació, es van extreure fraccions totals, mitocondrials i citosòliques d'ambdues condicions i es va analitzar l'expressió d'EndoG i ExoG mitjançant western blot.

Tal com s'ha mencionat anteriorment i com es pot veure en la Figura 28, EndoG en la condició control es troba localitzada en la mitocondria i sota condicions d'isquèmia és

alliberada al citosol. En canvi, ExoG, tant en la condició control com en la condició d'isquèmia, es troba localitzada a la fracció mitocondrial.

Per tal de saber si s'havien aïllat correctament les dues fraccions cel·lulars estudiades, es van analitzar els marcadors COX-IV per la fracció mitocondrial i la lactat deshidrogenasa i GAPDH per la fracció citosòlica. En condicions d'isquèmia, la presència de la lactat deshidrogenasa en la fracció citosòlica és menor que en les condicions control. Pel que fa a l'expressió de l'enzim GAPDH, en la situació control és detectat en la fracció total i citosòlica. En canvi, en la situació d'estrès també és detectat en la fracció mitocondrial.

A més a més, es va utilitzar la proteïna citocrom c com a control de l'eficàcia del tractament isquèmic, ja que és una de les proteïnes translocades de la mitocondria al citosol durant la inducció de mort cel·lular apoptòtica.

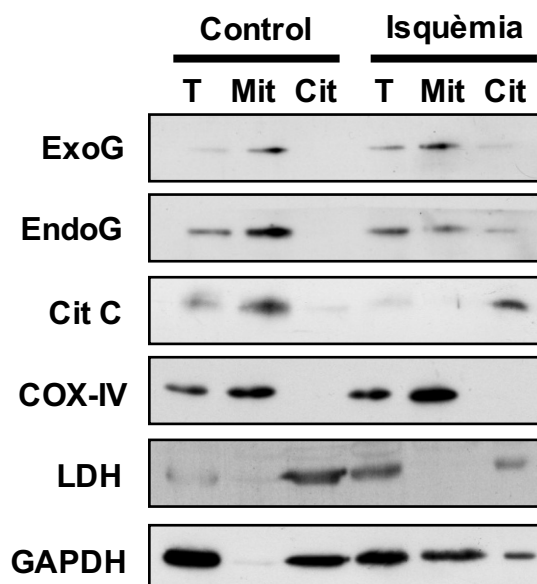


Figura 28. ExoG es localitza a la mitocondria tant en condicions control com en condicions d'estrès. Anàlisi de l'expressió d'EndoG i ExoG en extractes proteics totals, mitocondrials i citosòlics en cardiomiòcits control i isquèmics. Per tal de comprovar l'eficàcia del tractament al 0.2% d'oxigen es va analitzar la presència de citocrom C en les diferents fraccions. COX-IV és el marcador mitocondrial utilitzat i la LDH i GAPDH els marcadors citosòlics.

3. Estudi de l'efecte de la disminució d'Exog

3.1 ExoG i la integritat de l'ADN nuclear durant la mort cel·lular

EndoG és descrita com un important executor del processament de l'ADN en els cardiomiòcits durant el tractament amb isquèmia. Per tal d'analitzar si ExoG té un paper

important durant la fragmentació de l'ADN, es va utilitzar la tècnica del CHEF-ladder que permet visualitzar la fragmentació de l'ADN genòmic d'alt i baix pes molecular.

Els cardiomiòcits van ser transduïts amb el vector scrambled i amb un shRNA d'*Endog* i *Exog*. Passades 72 hores després de la transducció, els cardiomiòcits van ser exposats al tractament amb 0,2% d'oxigen durant 18 hores, simulant una isquèmia. Els resultats corresponents a la fragmentació d'alt pes molecular (*high molecular weight fragmentation*, HMWF), i de baix pes molecular (*low molecular weight fragmentation*, LMWF) es mostren a la Figura 29A.

El tractament amb isquèmia indueix la formació de fragments de 50 kbp en les 4 condicions testades: cardiomiòcits no transduïts, transduïts amb el vector scrambled, transduïts amb el shRNA d'*Endog* i amb el shRNA d'*Exog*. En canvi, la reducció de l'expressió d'*Endog* correlaciona amb una reducció important de la fragmentació de baix pes molecular. Efecte que no s'observa quan la proteïna que disminueix és *Exog*, indicant que ExoG no està implicada en la fragmentació de baix pes molecular de l'ADN en l'isquèmia.

En un model dependent de caspases, EndoG, no participa en el tall de l'ADN durant la mort cel·lular. Per tal de saber si ExoG en aquestes condicions podia participar en la degradació de l'ADN d'alt o de baix pes molecular es va realitzar l'experiment amb la línia cel·lular Rat-2. Primer de tot, es van transduïr les cèl·lules amb el vector scrambled, amb el shRNA d'*Exog* i *Endog*. Transcorregudes 72 hores, les cèl·lules es van sotmetre a dos tractaments. El primer, amb l'inductor de l'apoptosi estaurosporina (STS) i el segon amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor de caspases, Q-VD-OPh. En la Figura 29B, s'observa que el tractament amb l'estaurosporina provoca fragmentació tant d'alt com baix pes molecular en totes les condicions analitzades. Per últim, el tractament amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor Q-VD-OPh és capaç d'inhibir la degradació de baix pes molecular, però no la d'alt pes molecular.

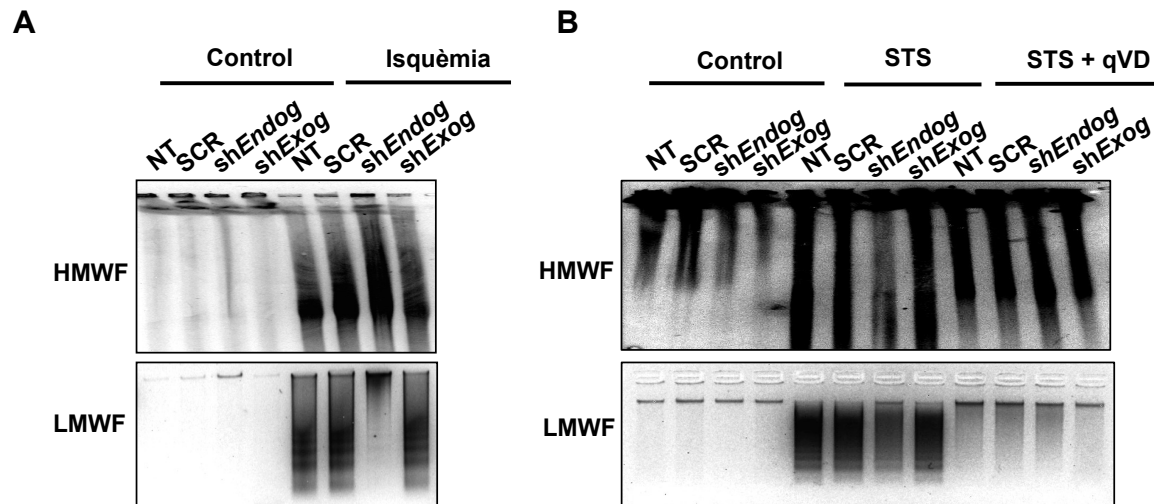


Figura 29. ExoG no participa en la degradació de l'ADN genòmic, ni en un model depenent ni independent de caspases. Es va utilitzar un vector scrambled, un shRNA específic contra *Endog* i un contra *Exog*. **A)** Anàlisi de la fragmentació de l'ADN en cardiomiòcits tractats durant 18 hores amb isquèmia. **B)** Anàlisi de la fragmentació de l'ADN en la línia cel·lular Rat-2 tractada amb 1 μ M d'estaurosporina amb o sense l'inhibidor de caspases, 5 μ M Q-VD-OPh durant 4 hores. En la part superior de les imatges es troba la fragmentació d'alt pes molecular (HMWF); i en la part inferior la fragmentació de baix pes molecular (LMWF).

3.2 ExoG i la hipertròfia dels cardiomiòcits

Resultats previs del nostre grup demostren que la deficiència d'*Endog* desencadena hipertròfia en els cardiomiòcits neonatals del ratolí *Endog*^{-/-}. També es va demostrar que a través de la disminució de l'expressió d'*Endog* mitjançant el shRNA, es produeix hipertròfia en cardiomiòcits neonatals de rata. Un grup independent, ja havia demostrat que la disminució de l'expressió d'*Exog* induïa un augment en la mida d'aquests¹⁷⁶. Per aquest motiu, vam decidir de comparar l'efecte hipertròfic de la disminució d'*Endog* i d'*Exog* per separat, a més d'analitzar si la reducció simultània d'*Endog* i *Exog* té un efecte additiu respecte a la simple reducció d'*Endog* o *Exog*.

Es van disseccionar i digerir cors neonatals de rata. A continuació, es van sembrar els cardiomiòcits i es van transduïr amb el vector scrambled, un shRNA d'*Endog*, un shRNA d'*Exog*, i per últim la doble transducció amb els dos shRNAs. Es va quantificar l'àrea dels cardiomiòcits mitjançant la tinció amb l'anticòs α -actinina (Figura 30A). Corroborant els resultats previs, es va obtenir un increment en la mida en els cardiomiòcits neonatals transduïts amb els shRNA d'*Endog* o *Exog*. La doble transducció no genera un augment significatiu en les àrees dels cardiomiòcits respecte a la simple transducció d'*Endog* o *Exog*.

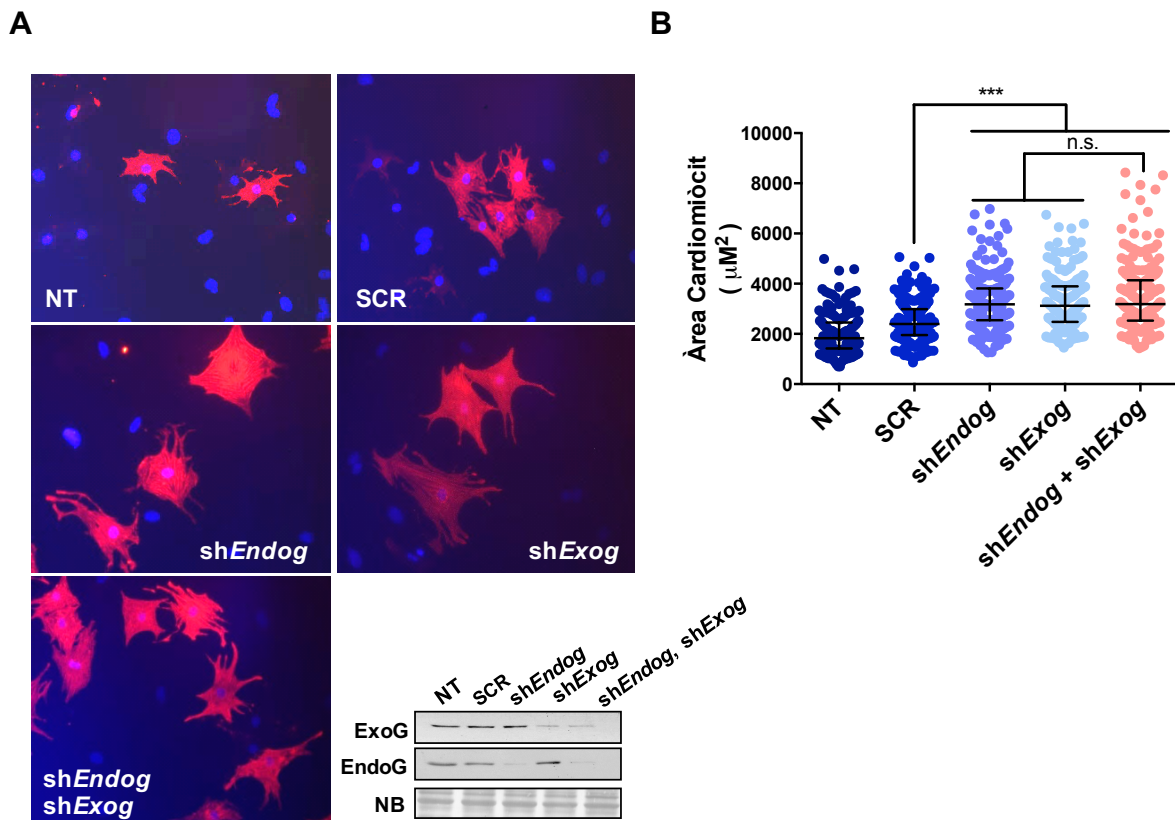


Figura 30. La reducció simultània d'Endog i Exog no genera un augment en la mida dels cardiomiòcits respecte a la reducció simple d'Endog i Exog. A) Imatges representatives de cardiomiòcits neonatals de rata no transduïts, transduïts amb el vector scrambled, amb el shRNA d'Endog, amb el shRNA d'Exog i amb ambdós shRNAs. Van ser fixats i tenyits amb la α -actinina (sarcòmer, vermell) i amb Hoescht 33342 (nuclis, blau). Comprovació mitjançant western blot de l'eficiència dels shRNAs contra Endog i Exog, tant en la reducció simple de cadascuna com en la reducció doble d'ambdues nucleases. **B)** Quantificació de l'àrea cel·lular amb el software ImageJ d'almenys 100 cardiomiòcits per condició. ***p-value<0.001 (1way ANOVA).

3.3 ExoG i la proliferació cel·lular

3.3.1 ExoG i proliferació de fibroblasts de rata Rat-2

La disminució d'Endog regula el creixement i la divisió cel·lular. Un dels primers models en els quals el nostre grup va estudiar l'efecte d'EndoG en proliferació va ser en el model murí *Endog*^{-/-}, on els fibroblasts de pell d'aquests completaven un menor nombre de cicles al llarg de les 72 hores que romanien en cultiu, disminuint el percentatge de cèl·lules presents en la fase S i augmentant el percentatge de cèl·lules presents en la fase G1 del cicle cel·lular. A més a més, en aquest treball s'han presentat els resultats en proliferació obtinguts en línies cel·lulars tumorals humanes i en el nou model murí *Pten*^{-/-}*Endog*^{-/-} generat.

Una vegada demostrat l'efecte d'EndoG, vam decidir estudiar si la deficiència d'ExoG en la línia cel·lular Rat-2 causava també un defecte en proliferació. Les cèl·lules es van tractar amb un vector scrambled, dos shRNAs contra *Endog* i dos shRNAs contra *Exog* durant 72 hores. Tal hi com ja es sabia, les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentiviralment amb el shRNA1 d'*Endog* completen un menor nombre de cicles respecte al seu control (Figura 31C). Com s'observa en la Figura 31A, també s'obté una reducció en la proliferació cel·lular en les cèl·lules transduïdes lentiviralment amb els shRNAs d'*Exog*.

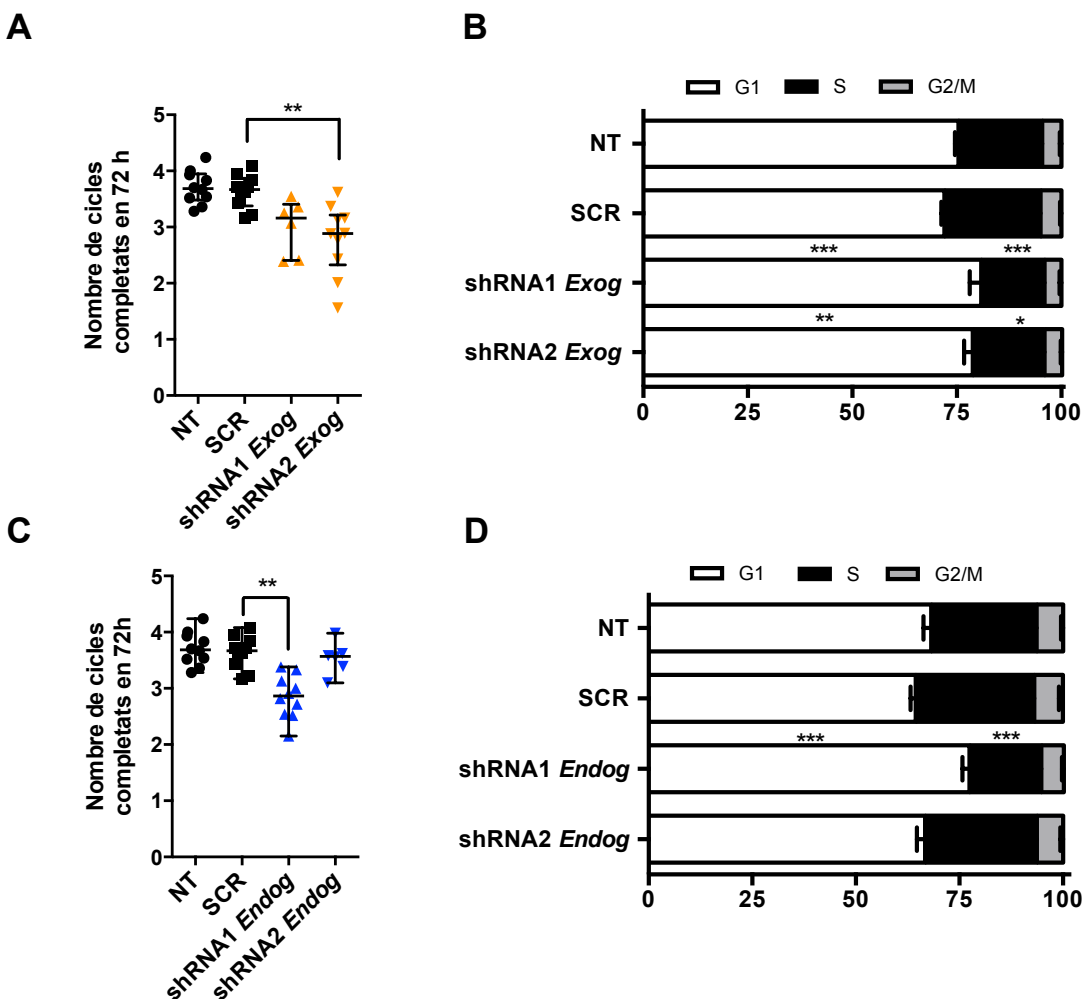


Figura 31. La reducció de l'expressió d'*Exog* disminueix la proliferació en la línia cel·lular Rat-2. **A)** Nombre de cicles que completen les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentiviralment amb el vector scrambled (SCR) i amb dos shRNAs d'*Exog*. **B)** Anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentiviralment amb el vector scrambled (SCR) i amb dos shRNAs d'*Exog*. **C)** Nombre de cicles que completen les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentiviralment amb el vector scrambled (SCR) i amb dos shRNAs d'*Endog*. **D)** Anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentiviralment amb el vector scrambled (SCR) i amb dos shRNAs d'*Endog*. **p-value<0.01, ***p-value<0.001 (Figura A i C: 1way ANOVA, figura B i D: 2way ANOVA).

En aquestes cèl·lules es va analitzar la progressió del cycle cel·lular mitjançant citometria de flux. Es van fixar i es van tenyir amb iodur de propidi obtenint com a resultat que tant la reducció d'*Endog* (Figura 31D) com la reducció d'*Exog* (Figura 31B) causa un augment en el percentatge de cèl·lules acumulades en la fase G1 del cycle cel·lular.

A continuació, es va analitzar l'eficiència dels shRNAs mitjançant l'anàlisi de proteïna per western blot. Tant els shRNAs d'*Exog* com els shRNAs d'*Endog*, produeixen una disminució de l'expressió d'ambdós proteïnes en les cèl·lules tractades amb aquests (Figura 32). En les cèl·lules tractades amb els shRNAs d'*Endog* (1 i 2) i amb els shRNAs d'*Exog* (1 i 2), hi ha una disminució de la fosforilació de Akt i alhora una menor expressió de la ciclina D1. Tot seguit, vam decidir estudiar la fosforilació de les ERK, ja que la via de les MAPK està també implicada en proliferació cel·lular. Els resultats revelen que la disminució de l'expressió d'*Exog*, però no la d'*Endog*, provoca una disminució en la fosforilació de ERK1 i ERK2.

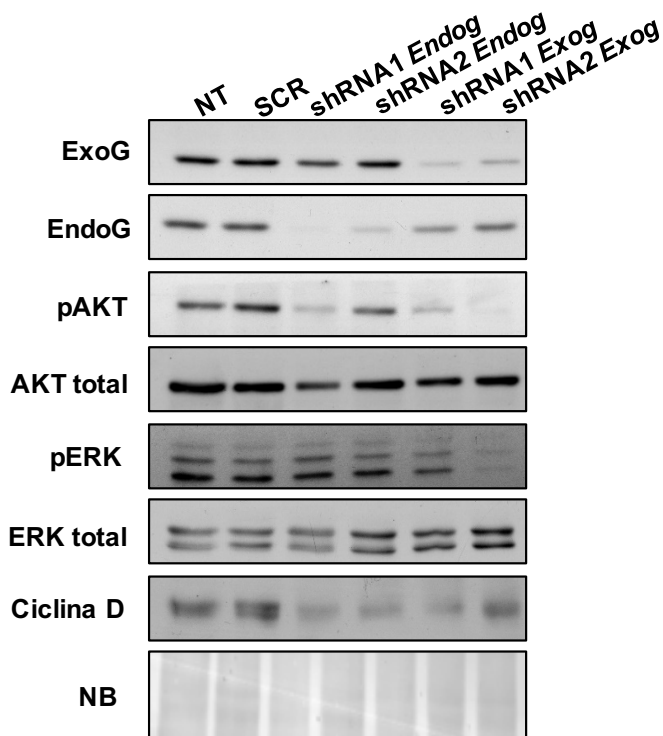


Figura 32. En la línia Rat-2, la disminució de l'expressió d'*Endog* causa una disminució en la fosforilació de Akt i en la quantitat de ciclina D1. A més d'aquests efectes, la disminució d'*Exog* també afecta la fosforilació de ERK. Western blot de cèl·lules Rat-2 no transduïdes (NT), transduïdes lentivirament amb el vector *scrambled* (SCR), amb dos shRNAs d'*Endog* i amb dos shRNA d'*Exog*. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue.

Una vegada comprovat l'efecte en proliferació que causa tant la disminució de l'expressió d'*Endog* com la disminució de l'expressió d'*Exog*, vam decidir realitzar l'estudi de la doble transducció en la línia Rat-2. Les cèl·lules es van tractar amb un vector scrambled, un shRNA contra *Endog*, un shRNA contra *Exog* i la doble transducció durant 72 hores. Com es pot veure en la Figura 33, les cèl·lules tractades amb el doble silenciament d'ambdues nucleases completen el mateix nombre de cicles en 72 hores que les transduïdes amb un sol shRNA.

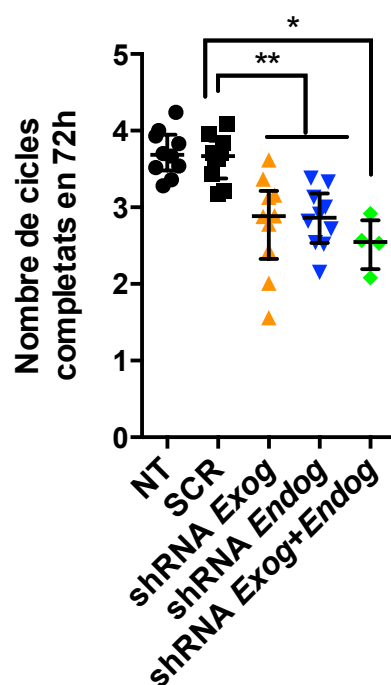


Figura 33. La disminució simultània d'*Endog* i *Exog* no genera un augment en el defecte en proliferació respecte a la disminució simple d'*Endog* i *Exog*. **A)** Nombre de cicles que completen les cèl·lules Rat-2 transduïdes lentivirament amb el vector scrambled (SCR), amb un shRNA d'*Endog*, amb un shRNA d'*Exog* i amb els dos shRNAs en un període de 72 hores. **p-value<0.01, *p-value<0.05 (1way ANOVA).

3.3.2 ExoG i la proliferació de cultius tridimensionals de cèl·lules epitelials d'endometri

En aquest treball s'ha demostrat que tant el silenciament gènic d'*Endog* com el d'*Exog* influencien el creixement cel·lular en la línia Rat-2 de fibroblasts de rata.

Degut als resultats en proliferació obtinguts en la línia cel·lular Rat-2 i els resultats descrits al primer bloc del treball, on la disminució de l'expressió d'*Endog* en cèl·lules d'endometri

deficients en *Pten* causava una reducció en la mida d'aquestes, vam decidir estudiar l'efecte de la disminució d'*Exog* en aquest model.

Es van transduir cèl·lules epitelials d'endometri wild type (*Pten*^{+/+}) i knock-out (*Pten*^{-/-}) per *Pten* amb un vector scrambled i un shRNA d'*Exog*. Passats 8-10 dies després de la transducció, vam veure que el shRNA d'*Exog* era capaç de disminuir l'increment de mida glandular que presenten les cèl·lules knock-out de *Pten* (Figura 34A). Les mesures del perímetre glandular van confirmar l'increment de mida generat per la pèrdua de *Pten* i la disminució de la mida glandular en les cèl·lules transduïdes amb el shRNA d'*Exog* deficients en *Pten* (Figura 34B)

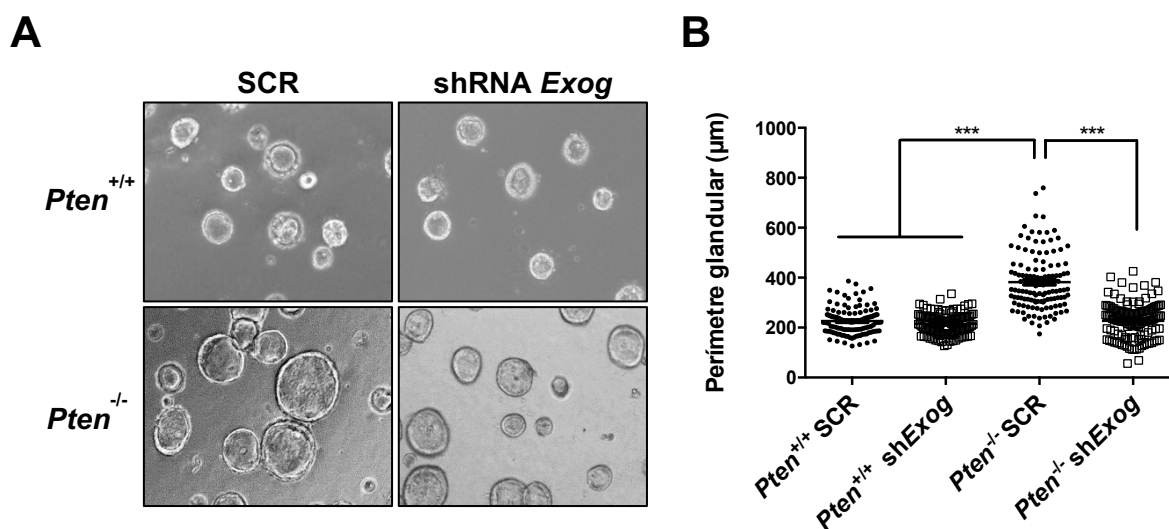


Figura 34. La reducció d'expressió d'*Exog* disminueix la proliferació cel·lular en cultius tridimensionals de cèl·lules d'endometri *Pten*^{-/-}. A) Imatges de contrast de fases de cultius 3D *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} infectats amb el vector scrambled i amb el shRNA d'*Exog*. **B)** Quantificació dels perímetres glandulars dels cultius 3D *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} transduïts amb el vector control i amb el shRNA d'*Exog*. ***p-value < 0.001 (1way ANOVA).

Es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna PTEN i ExoG per tal de confirmar els genotips *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-} i la disminució de l'expressió d'ExoG causada pel shRNA d'*Exog*. Com s'observa en la Figura 35, la deficiència de PTEN causa un increment en la fosforilació d'Akt i un increment de l'expressió de la Ciclina D1 en el *Pten*^{-/-} transduït amb el vector control. Ambdós increments són revertits quan les cèl·lules *Pten*^{-/-} són transduïdes amb el shRNA d'*Exog*.

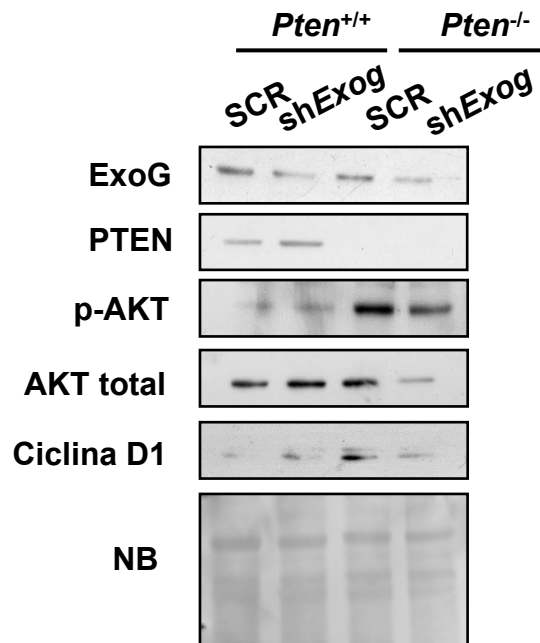


Figura 35. La reducció de l'expressió d'*Exog* causa una disminució de la fosforilació d'AKT i de l'expressió de ciclina D1 en el genotip *Pten*^{-/-}. Es van aïllar extractes proteics de glàndules d'endometri *Pten*^{+/+} i *Pten*^{-/-}, les quals van ser transduïdes amb el vector scrambled (SCR) i el shRNA d'*Exog* durant 8 dies. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue.

Bloc Tatd

1. Estudi de la seqüència, expressió i distribució subcel·lular de Tatd

1.1 Comparació de la seqüència d'aminoàcids de Tatd en diferents espècies

L'interès en *Tatd* va sorgir quan va ser identificada com a nucleasa implicada en la degradació de l'ADN en *C. elegans*, anomenada amb el nom de *crn-2* (*cell death related nuclease*)⁶².

Primer de tot vam analitzar la seqüència proteica en diferents espècies de mamífers: *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio Rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* i *Equus caballus* (Figura 36).

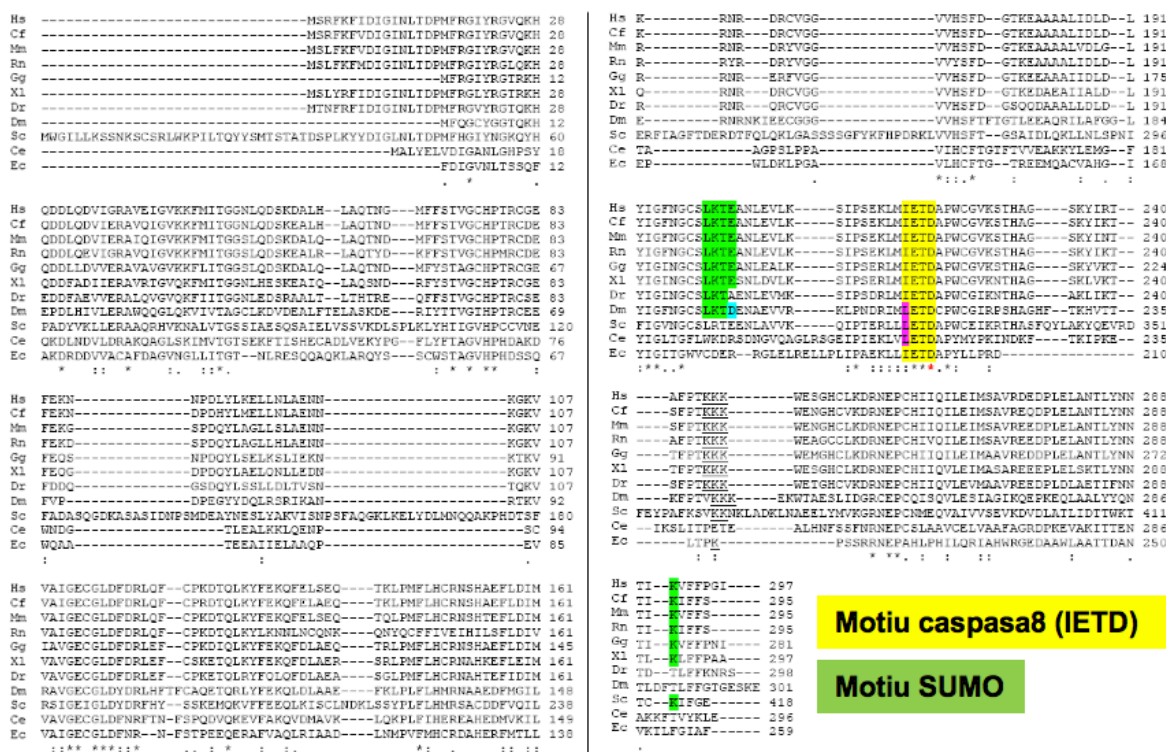


Figura 36. La seqüència de la proteïna TatD és altament conservada en diferents espècies. La comparació de la seqüència d'aminoàcids de TatD entre diferents espècies de mamífers es va realitzar amb la plataforma ClustalW2. La seqüència conservada de reconeixement de la caspasa 8 i la seqüència consens SUMO estan marcades amb color groc i verd, respectivament.

La comparació de la seqüència d'aminoàcids revela que TatD es troba conservada al llarg de l'evolució (Figura 36). A més a més, presenta seqüències IETD i LKTE (motiu caspasa 8 i SUMO) conservades entre diferents espècies.

1.2 Anàlisi de l'expressió de *Tatd* en teixits de ratolins neonatals i adults

Vam analitzar l'expressió de TatD en diferents teixits de ratolins neonatals i adults a nivell de transcrit i a nivell de proteïna. Concretament els teixits que vam analitzar són cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, cervell i cerebel. Tant a nivell de transcrit com a nivell de proteïna no s'observen diferències significatives en l'expressió de TatD entre els diferents teixits analitzats (Figura 37).

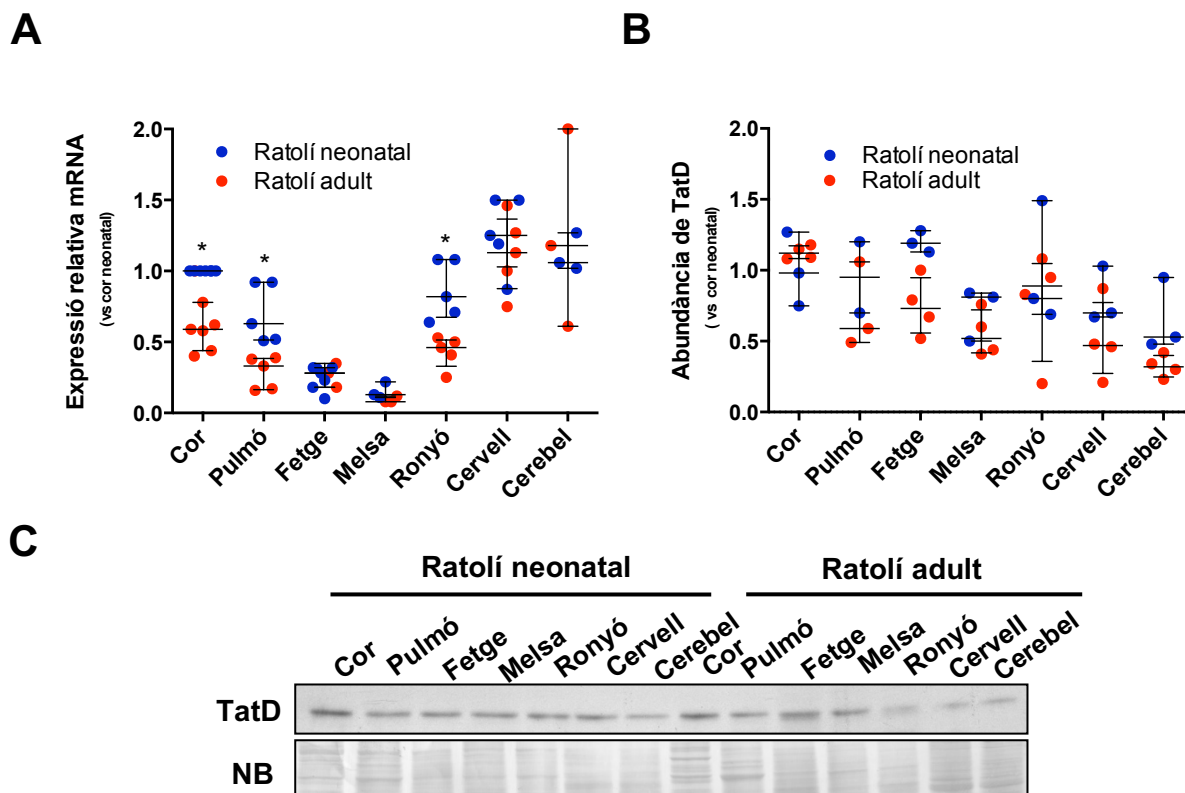


Figura 37. TatD és expressada a nivells similars en teixits de mamífer. A) Anàlisi del ARNm de *Tatd* mitjançant RT-PCR quantitativa. **B)** Quantificació de la intensitat de les bandes del western blot mostrat en l'apartat C. **C)** Determinació de l'expressió de TatD en diferents teixits de ratolins neonatals i adults mitjançant western blot. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue. Blot representatiu de 3 experiments independents. *p-value>0.05 (2way ANOVA).

1.3 Estudi de la localització cel·lular de *TatD*

TatD és descrita com una proteïna citoplasmàtica en *E. coli* i en diversos paràsits. La localització cel·lular de *TatD* en cèl·lules de mamífer encara és desconeguda. Per aquesta raó, vam voler estudiar la seva localització en la línia cel·lular humana HEK293. Per detectar TatD es va sobreexpressar la proteïna amb tres epítops FLAG en l'extrem N-terminal. Tal i com es mostra en la part dreta de la Figura 38A, es va detectar l'expressió de la proteïna FLAG en les cèl·lules transfectades amb el plasmidi de sobreexpressió. Una vegada comprovats els nivells de transfecció, es va analitzar mitjançant immunofluorescència la localització de TatD-FLAG. Es pot observar en la Figura 38A que la localització de TatD-FLAG és citosòlica.

Amb la finalitat de corroborar aquest resultat amb una altra tècnica, es va analitzar mitjançant western blot l'expressió de la proteïna FLAG en fraccions totals, mitocondrials, citosòliques i nuclears. Totes les fraccions van ser transfectades amb el vector de sobreexpressió TatD-FLAG. Es va detectar l'epítop FLAG en la fracció total, en la fracció mitocondrial (expressió minoritària) i en la fracció citosòlica on es troba altament enriquida (Figura 38B). Per tal de comprovar el grau d'enriquiment i contaminació en cadascun dels extractes cel·lulars, vam utilitzar el citocrom C com a marcador mitocondrial, l'enzim GAPDH com a marcador citosòlic i la histona H3 com a marcador nuclear. El citocrom C va ser detectat en la fracció mitocondrial, l'enzim GAPDH en la fracció citosòlica i en menor mesura en la fracció mitocondrial, i la histona H3 a més a més de ser detectada en la fracció nuclear va ser detectada en la fracció mitocondrial.

Tot i que les nostres troballes indiquen que TatD mitjançant la sobreexpressió marcada amb l'epítop FLAG és una proteïna citosòlica, diverses bases de dades com Genecards i Uniprot la descriuen principalment com a proteïna nuclear degut a la detecció d'un domini nucleasa (Figura 38C).

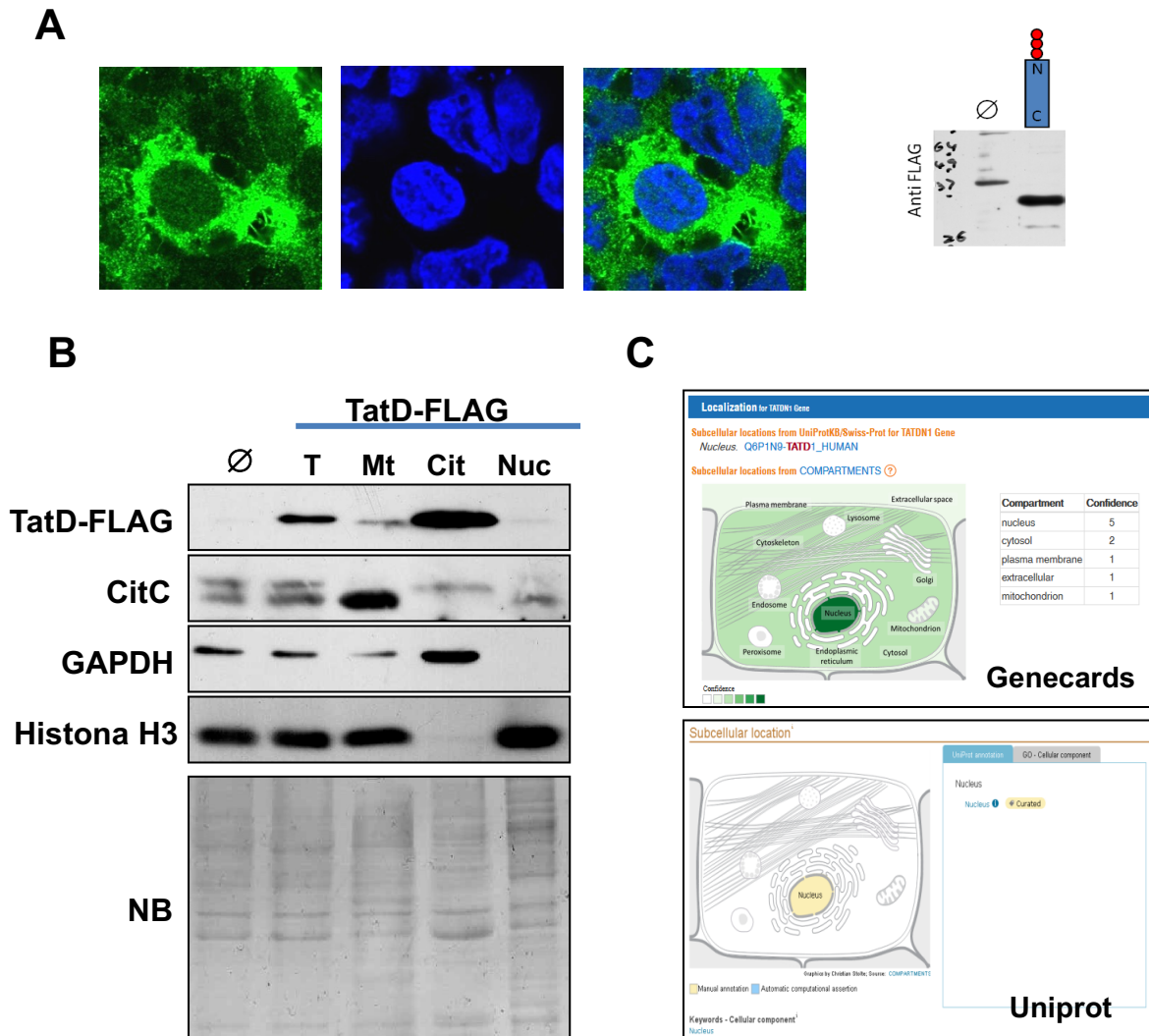


Figura 38. La sobreexpressió de TatD-FLAG permet la identificació de TatD com a proteïna citosòlica, malgrat ser descrita com a proteïna nuclear per diverses bases de dades. A) Immunofluorescència obtinguda a partir de la sobre-expressió de TatD-FLAG en la línia cel·lular HEK293T. Les cèl·lules van ser fixades i tenyides amb l'anticòs anti-FLAG (verd) i amb el Hoescht 33342 (nuclis, blau). A la part dreta de la figura, apareix la comprovació per Western blot de l'expressió de la proteïna FLAG-TatD, en condicions normals i sobreexpressada. **B)** Western blot de la sobre-expressió per TatD en diferents fraccions cel·lulars (T: extracte total, Mt: mitocondria, Cit: citosol, Nuc: nucli). Es va utilitzar el citocrom C (CitC) com a marcador mitocondrial, l'enzim GAPDH com a marcador citosòlic i la histona H3 com a marcador nuclear. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphtol blue (NB). **C)** Informació de la localització subcel·lular de TatD que apareix a les bases de dades Genecards i Uniprot.

A continuació, vam decidir estudiar la localització de la proteïna TatD endògena en dos cultius primaris diferents: cardiomiòcits de rata i fibroblasts de pell.

Per saber si en condicions control i en condicions d'estrès la localització de TatD variava, es van cultivar uns cardiomiòcits al 21% d'oxigen i els altres al 0.2%, simulant una isquèmia en aquests últims. Passades les 18 hores amb el tractament, es van extreure fraccions totals, citosòliques, nuclears i mitocondrials d'ambdues condicions i es va analitzar l'expressió de TatD mitjançant western blot. Com s'observa en la Figura 39A, TatD es troba localitzada a la fracció citosòlica, tant en la condició control com en la condició d'estrès.

En canvi, quan es va analitzar la localització de TatD en fibroblasts de pell es va veure que en condicions d'estrès (estaurosporina 1 μ M durant 14 h) es detectava TatD en el nucli (Figura 39B). En aquest tipus cel·lular també es va localitzar TatD en la fracció mitocondrial, tant en condicions control com en condicions d'estrès.

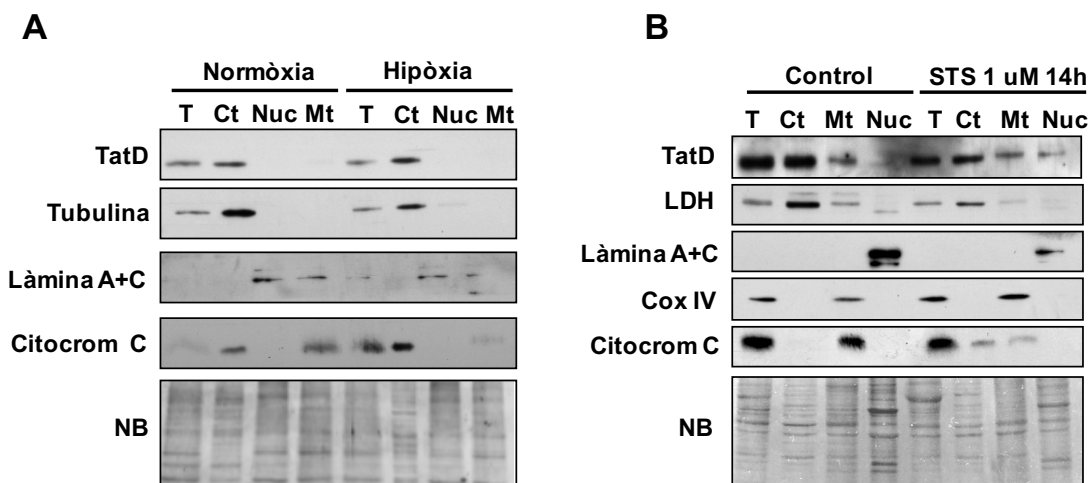


Figura 39. TatD es localitza al citosol tant en condicions control com en condicions d'estrès en cardiomiòcits de rata. En canvi, en els fibroblasts de pell de manera molt minoritària és detectada també en el nucli. Anàlisi de l'expressió de TatD en extractes proteics totals (T), citosòliques (Ct), nuclears (Nuc) i mitocondrials (Mt) en cardiomiòcits (**A**) i fibroblasts (**B**) control i sota situació d'estrès. Per tal de comprovar l'eficàcia del tractament al 0.2% d'oxigen i estaurosporina 1 μ M es va analitzar l'expressió de citocrom C. Es va utilitzar COX-IV i citocrom C com a marcadors mitocondrials, la tubulina i la lactat deshidrogenasa (LDH) com a marcadors citosòliques i les làmines A+C com a marcador nuclear. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue (NB).

Per tal de conèixer si s'havien aïllat correctament les fraccions cel·lulars mencionades en ambdós tipus cel·lulars, es van analitzar les proteïnes següents: la tubulina i la lactat deshidrogenasa per la fracció citosòlica, les làmines A+C per la fracció nuclear, COX-IV i Citocrom C per la fracció mitocondrial. La proteïna citocrom C també serveix com a control

de l'eficàcia del tractament isquèmic, ja que és una de les proteïnes translocades de la mitocòndria al citosol durant la mort cel·lular.

1.4 Estudi de l'efecte de la disminució de *Tatd* en la integritat de l'ADN nuclear durant la mort cel·lular

Donat que TatD està descrita com a nucleasa implicada en la mort cel·lular en *C. elegans*, vam voler analitzar el seu possible paper durant la fragmentació de l'ADN en un model caspasa dependent i en un model caspasa independent. Per tal d'analitzar-lo es va utilitzar la tècnica del CHEF-ladder.

Per tal d'estudiar el paper de TatD en un model caspasa independent, es va realitzar un cultiu primari de cardiomiòcits. Aquests van ser transduïts amb el vector scrambled i amb dos shRNAs de *Tatd*. Passades 72 hores després de la transducció, els cardiomiòcits van ser exposats al tractament amb isquèmia durant 18 hores. En la Figura 40 es mostren els resultats corresponents a la fragmentació d'alt pes molecular (*high molecular weight fragmentation*, HMWF), i de baix pes molecular (*low molecular weight fragmentation*, LMWF).

El tractament amb hipòxia indueix la formació de fragments de 50 kbp en els cardiomiòcits no transduïts, transduïts amb el vector scrambled i transduïts amb els dos shRNAs de *Tatd*. Com s'observa en la Figura 40A, també s'indueix degradació de baix pes molecular en totes les condicions descrites, indicant que la disminució de *Tatd* no altera el patró de degradació de l'ADN en isquèmia.

Per tal d'estudiar el paper de TatD en un model caspasa independent, es va realitzar l'experiment amb la línia cel·lular Rat-2. Primer de tot, es van transduïr les cèl·lules amb el vector scrambled i amb un shRNA de *Tatd*. Transcorregudes 72 hores, les cèl·lules es van sotmetre a dos tractaments. El primer, amb l'inductor de l'apoptosi estaurosporina (STS) i el segon amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor de caspases, Q-VD-OPh. En la Figura 40B, s'observa que el tractament amb l'estaurosporina provoca fragmentació tant d'alt com de baix pes molecular en les tres condicions analitzades: no transduït, transduït amb el vector control i transduït amb el shRNA de *Tatd*. Per últim, el tractament amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor Q-VD-OPh és capaç d'inhibir la degradació de baix pes molecular, però no la d'alt pes molecular.

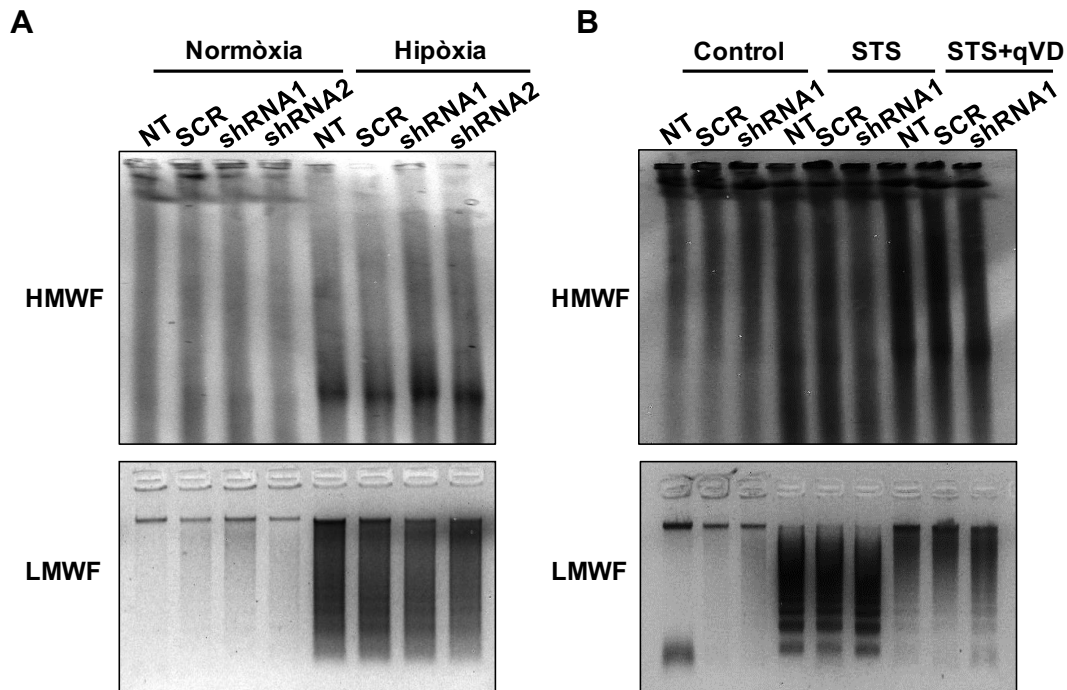


Figura 40. TatD no està implicada en la degradació de l'ADN ni en un model dependent ni independent de caspases. A) Anàlisi de la fragmentació de l'ADN en cardiomiòcits tractats durant 18 hores amb isquèmia. **B)** Anàlisi de la fragmentació de l'ADN en la línia cel·lular Rat-2 tractada amb 1 μ M d'estaurosporina amb o sense l'inhibidor de caspases, 5 μ M Q-VD-OPh durant 4 hores. En la part superior de les imatges es troba la fragmentació d'alt pes molecular (HMWF); i en la part inferior la fragmentació de baix pes molecular (LMWF).

2. Caracterització d'un nou model murí *Tatd*^{-/-}

2.1 Procediment utilitzat per l'obtenció del ratolí *Tatd*^{-/-}

Amb l'intenció d'estudiar la funció de TatD en mamífers, vam generar el model murí *Tatd*^{-/-}. Les tècniques explicades a continuació per a l'obtenció del ratolí transgènic van ser realitzades a la universitat de Monash, Austràlia. El primer pas que es va realitzar per generar el ratolí floxejat per l'exó 3 de *Tatd* amb el casset de la neomicina (*Tatd loxP*^{+/+} *neo*^{+/+}) va ser dissenyar el constructe diana. Una vegada dissenyat el constructe, es van electroporar cèl·lules mare embrionals per tal d'introduir la modificació genètica *loxP-Tatd-FRT-neo-FRT-loxP*.

Amb la finalitat de saber si els clons obtinguts eren positius per l'al·lel mutant es va dur a terme un Southern Blot. Aquesta tècnica revela que els diferents clons seleccionats són positius per l'al·lel mutant, ja que mitjançant sondes específiques apareixen les bandes a la

mida correcta (Figura 42A). A continuació, es van seqüenciar 3 clons que van donar com a resultat les seqüències esperades. Dos dels clons seqüenciats (marcats en vermell en la Figura 42A) van ser injectats als blastocists d'una mare adoptiva. De la injecció d'un dels clons, es van obtenir 8 mascles quimera amb el següent percentatge de quimerisme basat en el color de pell: 2 mascles al 90%, 4 mascles al 70%, 1 mascle al 50% i 1 mascle al 40%. De la injecció de l'altre clon es van obtenir 2 femelles i 2 mascles quimera amb el següent percentatge de quimerisme: 2 femelles al 50-70% i 2 mascles al 40%.

Es van creuar els mascles quimera amb femelles C57BL6 per comprovar si el transgen es trobava en cèl·lules de la línia germinal. Es va realitzar una PCR de comprovació dels genotips de la descendència d'aquest creuament. En la Figura 42B, 4 dels animals escollits són heterozigots per l'al·lel floxejat de *Tatd*, els quals es troben marcats en vermell (una banda a 270 bp corresponent a *Tatd loxP^{-/-}* i l'altra a 440 bp corresponent a *Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}*). Finalment es van creuar els animals heterozigots entre si per tal de generar la línia de ratolí homozigòtica (*Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}*).

Una vegada obtinguda la línia de ratolí homozigòtica *Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}* va ser enviada a Barcelona on el nostre grup va dur a terme els passos explicats a continuació.

Tal hi com s'ha explicat a l'apartat de materials i mètodes, el ratolí *Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}* es va creuar amb el ratolí transgènic *ROSA Flp*, ratolí que expressa una recombinasa que reconeix les seqüències que flanquegen el gen de la neomicina. Per tal d'obtenir el ratolí floxejat per *Tatd* però sense l'expressió de la neomicina (*Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-}*), es van haver de creuar entre si els ratolins resultants de la primera generació (Figura 41A). A continuació, el ratolí *Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-}* es va creuar amb el ratolí transgènic *CAGcre*, ratolí que expressa una recombinasa que reconeix les seqüències loxP que flanguejen l'exó 3 de *Tatd*. Per obtenir el ratolí desitjat *Tatd loxP^{+/+} CAGcre^{+/?}* es van haver de creuar entre si ratolins de la primera generació (Figura 41B).

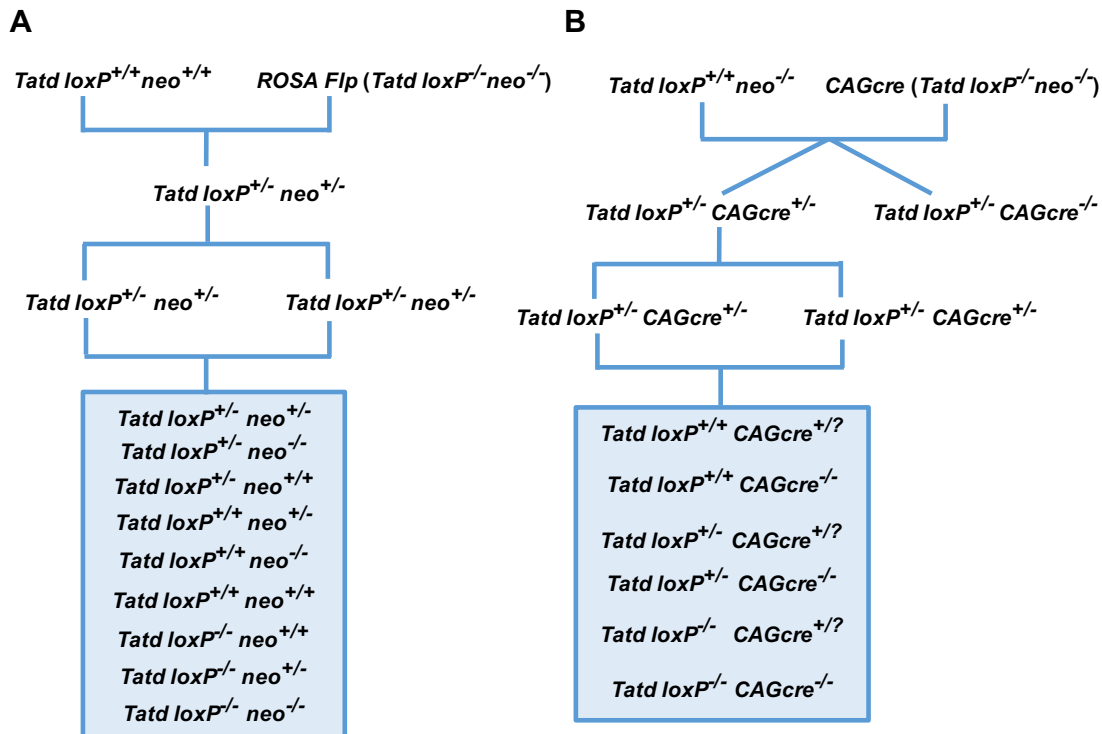


Figura 41. Estratègia utilitzada per la generació del model $Tatd^{-/-}$. A) Creuaments necessaris per l'obtenció del ratolí $Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-}$. B) Creuaments necessaris per l'obtenció del ratolí $Tatd loxP^{+/+} CAGcre^{+/?}$.

Per tal d'identificar el genotip dels animals durant els creuaments $Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}$ amb $ROSA Flp$ i $Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-}$ amb $CAGcre$, vam dissenyar seqüències de primers i programes de PCR específics.

En la Figura 42C, es troba representat el patró de bandes resultants a tres genotips diferents de $Tatd$. En el genotipatge de l'animal $ROSA Flp$ apareix una única banda a 270 bp corresponent al genotip *wild type* de $Tatd$, ja que aquest animal no presenta llocs loxP. L'animal $Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}$, homocigot per l'al·lel floxejat i positiu per la neomicina, dona una banda a 440 bp.

El creuament de $Tatd loxP^{+/+} neo^{+/+}$ amb $ROSA Flp$ dona lloc a la deleció de la neomicina ($Tatd loxP^{+/-} neo^{-/-}$), que resulta en l'aparició d'una banda a 400 bp (enlloc de 440 bp). Aquest animal també presenta una banda a 270 bp corresponent a la presència d'un al·lel no flanquejat pels llocs loxP.

Com s'observa en la Figura 42D, l'animal sense el casset neomicina i homozigot pels llocs loxP (*Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-} CAGcre^{-/-}*) presenta una única banda a 400 bp. L'eliminació dels llocs loxP gràcies al creuament amb el ratolí *CAGcre* ocasiona l'aparició d'una banda a 500 bp (animal *Tatd loxP^{+/+} CAGcre^{+/?}* i animal *Tatd loxP^{+/+} CAGcre^{+/?}*).

Una vegada genotipat l'animal *Tatd^{-/-}*, vam analitzar l'expressió en proteïna de diversos teixits per confirmar que la deleció de *Tatd* s'hagués produït en tot el cos de l'animal. Així doncs, es van extreure teixits de ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}*. Concretament es van extreure cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, úter, cervell, cerebel i ull d'ambdós genotips. L'estudi per western blot (Figura 42E) ens ha permès verificar que en cap dels teixits seleccionats hi ha expressió de TatD.

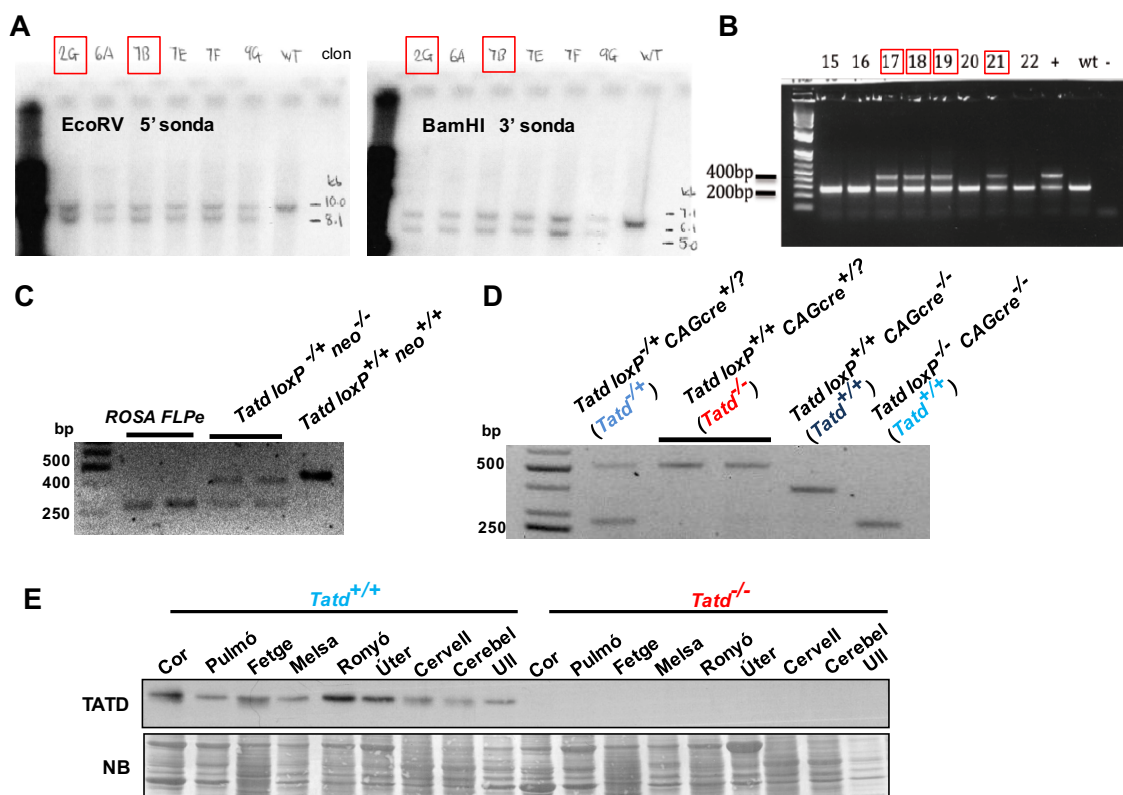


Figura 42. El model de ratolí generat no presenta expressió de TatD. **A)** Southern Blot de diferents clons seleccionats obtinguts a partir de l'electroporació de cèl·lules mare. Els dos clons marcats en vermell van ser injectats a una mare adoptiva. **B)** Genotipatge de la descendència provinent del creuament dels mascles quimera amb les femelles C57BL6. Els 4 ratolins marcats en vermell són heterozigots per l'al·lel mutant. Banda *wild type* WT: 270 bp; Banda de l'al·lel mutant: 440 bp. **C)** Genotipatge d'un ratolí que presenta el casset neomicina (*Tatd loxP^{+/+} neo^{+/?}*), i de dos ratolins on se'ls hi ha eliminat el casset neomicina (*Tatd loxP^{+/+} neo^{-/-}*) mitjançant el creuament amb *ROSA FLPe*. Banda *neo^{+/?}*: 440 bp; Banda *neo^{-/-}*: 400 bp. **D)** Genotipatge dels dos primers animals *Tatd^{-/-}* generats amb el creuament de *CAGcre*. Banda *wild type* (*Tatd^{+/+}*): 270 bp; Banda *knock-out* (*Tatd^{-/-}*): 500 bp. **E)** Anàlisi de l'expressió de TatD mitjançant Western Blot en cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, úter, cervell, cerebel i ull en un ratolí *Tatd^{+/+}* i un ratolí *Tatd^{-/-}*.

2.2 Caracterització del fenotip dels animals *Tatd*^{-/-}

Una vegada obtingut el ratolí *Tatd*^{-/-}, vam analitzar si la deleció d'aquest gen generava problemes en el desenvolupament del ratolí. Els ratolins *Tatd*^{-/-} viuen fins edat adulta sense problemes notables en el creixement. La proporció de ratolins *Tatd*^{-/-} que neixen és consistent amb les lleis de la herència mendeliana.

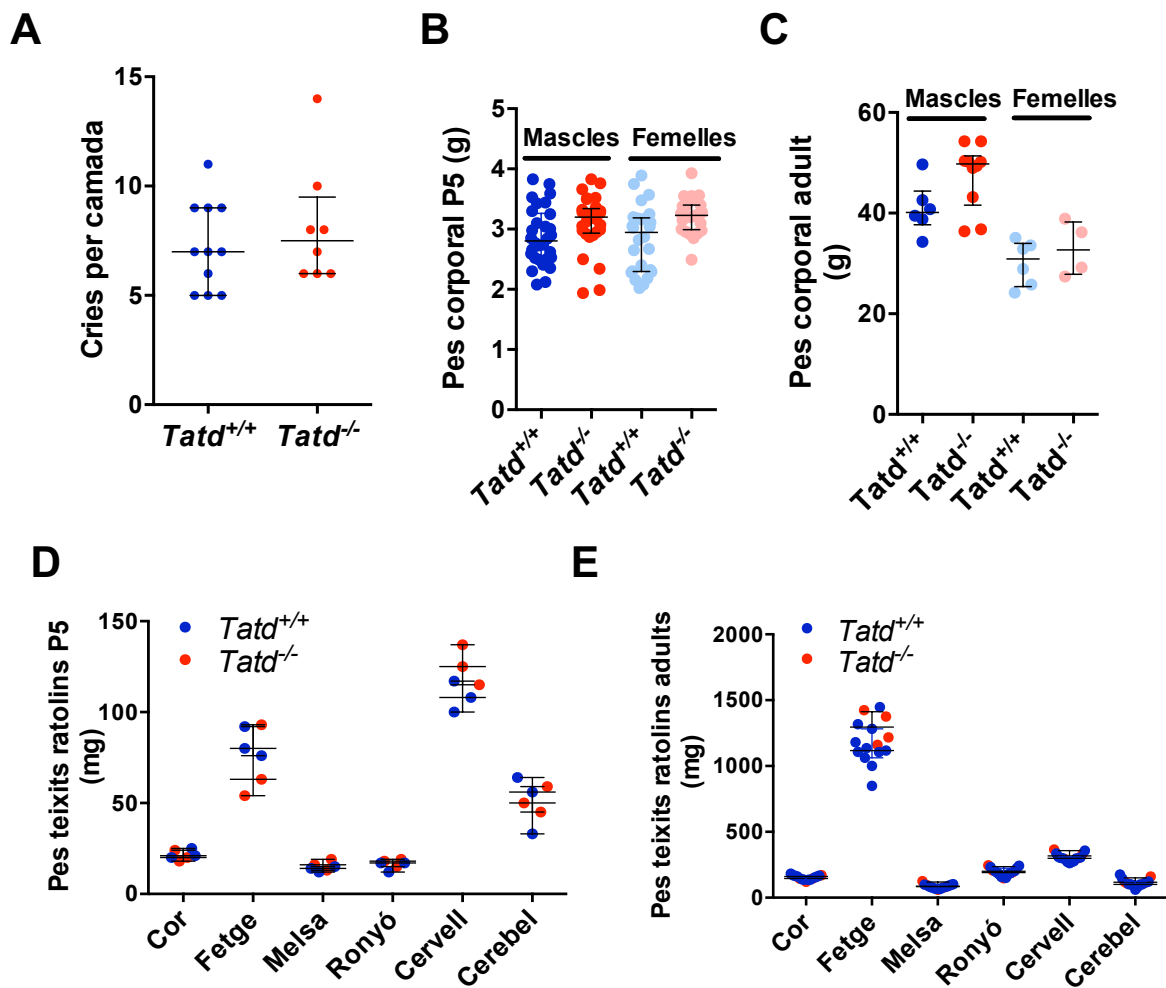


Figura 43. Els ratolins *Tatd*^{-/-} no presenten problemes en el desenvolupament ni en el creixement. **A)** Nombre de cries nascudes per ventrada de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. **B)** Pes corporal de ratolins neonatals *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} de 5 dies d'edat (mascles i femelles). **C)** Pes corporal de ratolins adults *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} d'un any d'edat (mascles i femelles). **D)** Pesos de teixits de ratolins neonatals *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} (cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, cervell i cerebel). **E)** Pesos de teixits de ratolins adults *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} (cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, cervell i cerebel). A: unpaired t-test; B, C, D, E: 2way ANOVA.

No s'han observat diferències en el nombre de cries obtingudes per camada entre ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} (Figura 43A). A continuació, es va analitzar el pes corporal en ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} neonatals de 5 dies d'edat i adults i no es van observar diferències entre genotips

(Figura 43B i C). També es van pesar teixits d'aquests ratolins neonatals i adults. Concretament els teixits que es van pesar són cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, cervell i cerebel. Com s'observa en la Figura 43D i E no hi ha diferències en el pes d'aquests teixits entre genotips.

2.3 Estudi del nombre i de la mida dels cardiomiòcits *Tatd*^{-/-}

Vam decidir estudiar el nombre i la mida dels cardiomiòcits *Tatd*^{-/-} amb la finalitat de saber si aquesta nucleasa està implicada en la regulació de processos de proliferació i hipertròfia.

Es va quantificar el nombre de cardiomiòcits que constitueixen els cors neonatals *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} mitjançant recomptes cel·lulars, obtenint que ambdós genotips presenten el mateix nombre de cèl·lules (Figura 44A). A continuació, es va quantificar l'àrea dels cardiomiòcits neonatals primaris aïllats de cors *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}, els quals van ser marcats amb l'anticòs α -actinina, una proteïna abundant en el sarcòmer dels cardiomiòcits. El resultat revela que no hi ha canvis en la mida dels cardiomiòcits *Tatd*^{-/-} (Figura 44B).

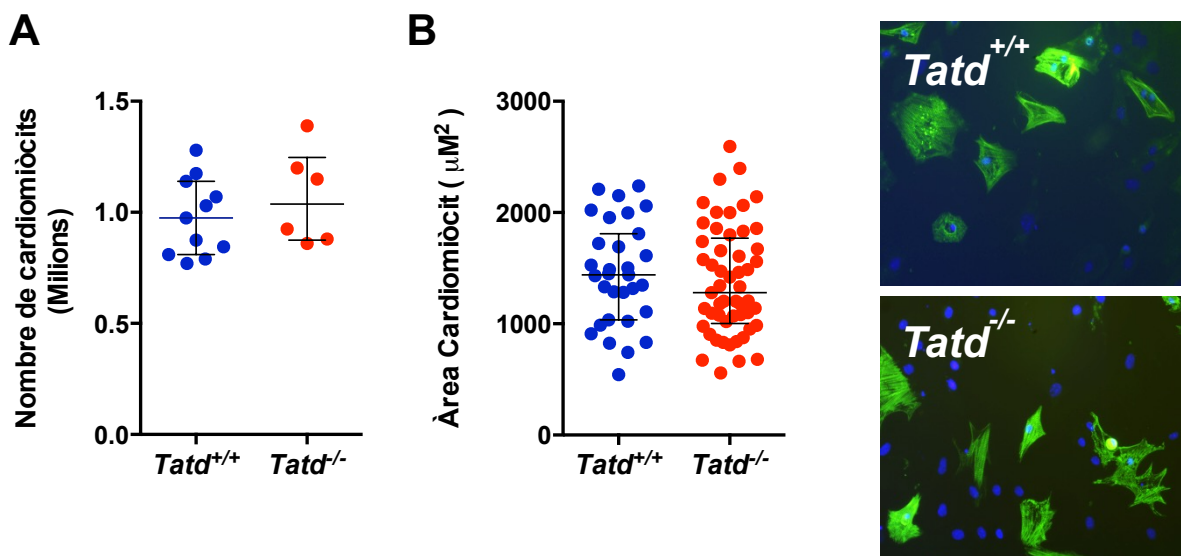


Figura 44 Els ratolins *Tatd*^{-/-} no presenten diferències ni en el nombre ni en la mida de cardiomiòcits respecte als ratolins *Tatd*^{+/+}. **A)** Recompte del nombre de cardiomiòcits presents en cors neonatals *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} mitjançant la càmera Neubauer. **B)** Quantificació de l'àrea cel·lular amb el software ImageJ de cardiomiòcits de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Imatges representatives de cardiomiòcits neonatals de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Van ser fixats i tenyits amb la α -actinina (sarcòmer, verd) i amb el Hoescht 33342 (nuclis, blau). (unpaired t-test).

2.4 Estudi dels nivells de proliferació en fibroblasts de pell *Tatd*^{-/-}

Tot i no observar diferències en el nombre de cardiomiòcits *Tatd*^{-/-} respecte als *Tatd*^{+/+}, vam decidir estudiar la capacitat de proliferació en un altre tipus cel·lular, concretament en fibroblasts de pell *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Es van utilitzar fibroblasts de pell amb la finalitat de descartar que l'efecte no observat en els cardiomiòcits fos degut a la poca capacitat de divisió que presenten aquests últims.

Vam extreure fibroblasts de pell de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} i els vam mantenir en cultiu durant 72 hores. Els fibroblasts *Tatd*^{-/-} completen el mateix nombre de cicles que els fibroblasts *Tatd*^{+/+} al llarg de les 72 hores que romanen en cultiu (Figura 45A). També es va analitzar la progressió del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux. Es van fixar i es van tenyir amb iodur de propidi obtenint com a resultat que el dèficit de *Tatd* no causa canvis en el percentatge de cèl·lules presents en cada fase del cicle cel·lular (Figura 45B).

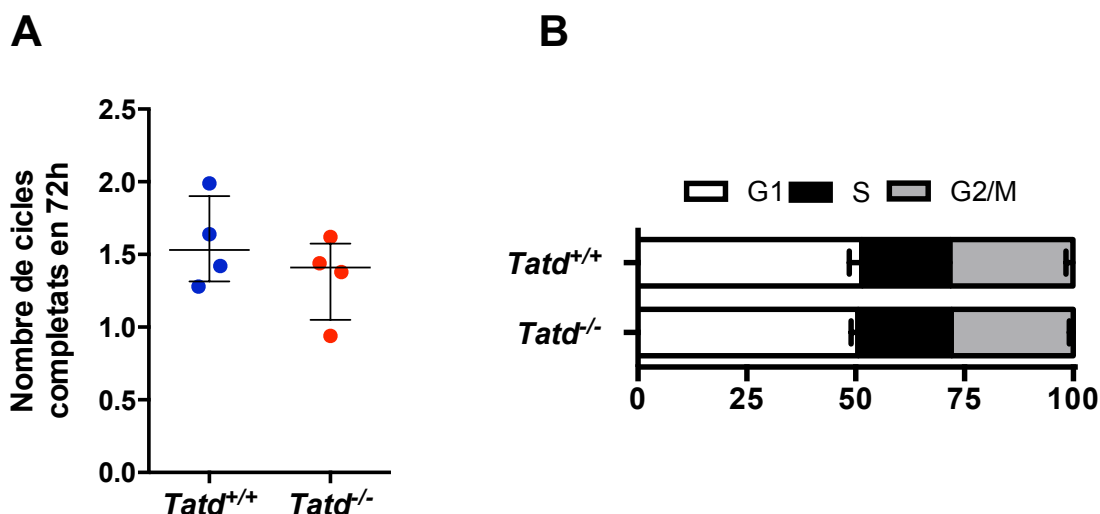


Figura 45. La manca de *Tatd* no causa canvis en proliferació en els fibroblasts de pell *Tatd*^{-/-}. A) Nombre de cicles que completen els fibroblasts de pell *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. B) Anàlisi per citometria de flux dels fibroblasts de pell *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. (Figura A: unpaired t-test, figura B: 2way ANOVA).

2.5 Estudi de la integritat de l'ADN nuclear en el ratolí *Tatd*^{-/-}

Per tal de corroborar els resultats obtinguts en la integritat de l'ADN amb els shRNAs de *Tatd*, es va analitzar l'efecte que es produeix degut al dèficit total de la proteïna TatD.

Es van extreure fibroblasts de pell de ratolins neonatals *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Tant els fibroblasts provinents dels ratolins *Tatd*^{+/+} com *Tatd*^{-/-} es van tractar amb l'estaurosporina i amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor Q-VD-OPh durant 4 hores. Transcorregudes les

4 hores de tractament, es van recollir els fibroblasts de pell i es va realitzar la tècnica CHEF-ladder. Tant els fibroblasts de ratolins *Tatd*^{+/+} com els fibroblasts *Tatd*^{-/-} presenten degradació d'alt pes molecular (HMWF) i de baix pes molecular (LMWF) quan són tractats amb estaurosporina (Figura 46). Aquest resultat consona amb el resultat obtingut amb la disminució de l'expressió de *Tatd* a través del shRNA. El tractament amb l'estaurosporina combinada amb l'inhibidor és capaç d'inhibir la degradació d'alt i de baix pes molecular.

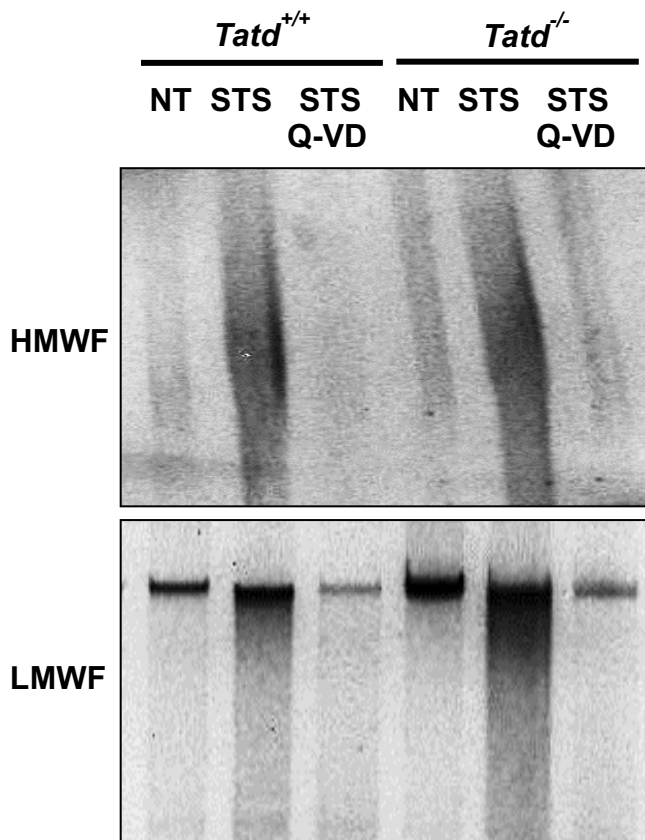


Figura 46. Els fibroblasts de pell *Tatd*^{-/-} no estan implicats en la degradació de l'ADN genòmic. Anàlisi de la fragmentació de l'ADN en fibroblasts de pell *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} tractats amb 1 μ M d'estaurosporina amb o sense l'inhibidor de caspases, 5 μ M Q-VD-OPh durant 4 hores. En la part superior de les imatges es troba la fragmentació d'alt pes molecular (HMWF); i en la part inferior la fragmentació de baix pes molecular (LMWF).

2.6 Anàlisi semi-quantitatiu de l'activitat nucleasa de *Tatd*

Tot i no haver vist canvis en la integritat de l'ADN genòmic en els fibroblasts de pell *Tatd*^{-/-}, vam voler complementar aquest estudi amb un anàlisi semi-quantitatiu d'activitat nucleasa. Aquest assaig es va realitzar a partir de llisats proteics de fibroblasts *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Els

fibroblasts *Tatd*^{-/-} van ser utilitzats com a control negatiu de l'activitat nucleasa degut a l'absència de la proteïna TatD.

Primer de tot, es van aïllar extractes citosòlics amb l'objectiu d'obtenir la proteïna TatD enriquida, ja que el citosol és el compartiment cel·lular on està localitzada.

En la Figura 47A, s'observa que en els fibroblasts *Tatd*^{+/+} s'aconsegueix un enriquiment de TatD en la fracció citosòlica. En el western blot també es va detectar la lactat deshidrogenasa com a marcador citosòlic, les làmines A+C com a marcador nuclear i COX-IV com a marcador mitocondrial. No es va detectar expressió ni de les làmines A+C ni COX-IV en la fracció citosòlica, indicant així que no hi ha contaminació de les dues fraccions no desitjades.

Una vegada comprovat que el procediment d'extracció es realitzava correctament, vam incubar 1 µg de plàsmid linealitzat (pcDNA3) amb 15, 20, 25 µg de proteïna procedent de fibroblasts *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}, a 37°C durant dos hores. El resultat revela que no hi ha presència d'activitat nucleasa ni en els extractes proteics de fibroblasts *Tatd*^{+/+} ni en els *Tatd*^{-/-} (Figura 47B).

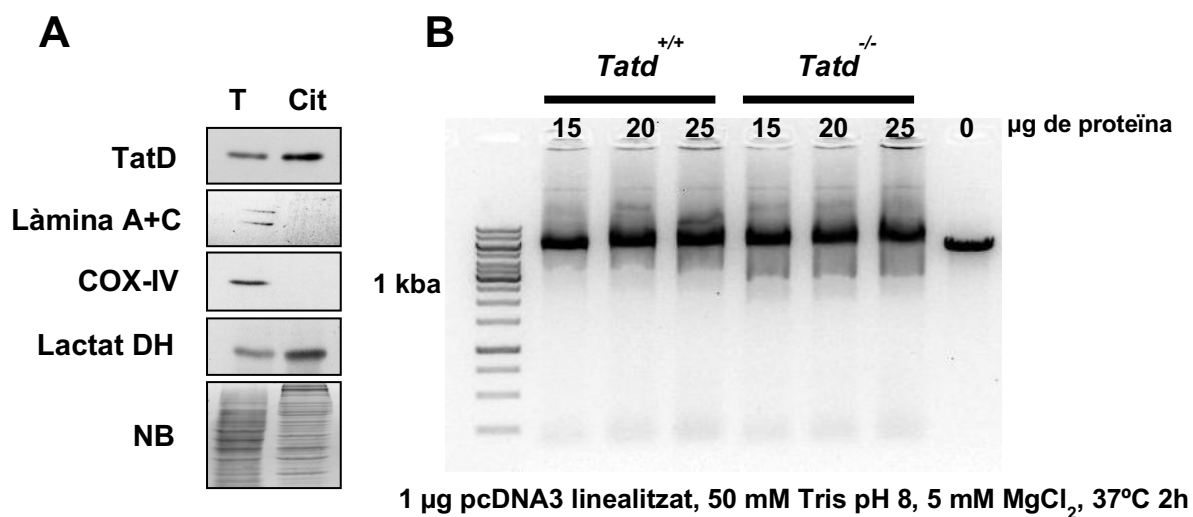


Figura 47. TatD no presenta activitat nucleasa quan es posa en contacte amb un plàsmid linealitzat. A) Anàlisi de l'enriquiment de TatD en la fracció citosòlica (Cit) comparada amb la fracció total (T) mitjançant western blot. Es va detectar la lactat deshidrogenasa com a marcador citosòlic, i les làmines A+C i COX-IV per saber el grau de contaminació de la fracció nuclear i mitocondrial. Per comprovar que en tots els carrils hi havia la mateixa quantitat de proteïna es va tenyir la membrana amb naphthol blue. **B)** Activitat nucleasa en extractes citosòlics de fibroblasts *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}. Es van incubar 15, 20, 25 µg d'extracte proteic amb 1 µg de pcDNA3 linealitzat durant 2 hores a 37°C.

2.7 Comparació transcriptòmica de ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}* en teixit cardíac i neuronal

El principal objectiu de l'estudi transcriptòmic era trobar gens expressats de manera diferencial entre ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}* que ens poguessin indicar possibles funcions de *Tatd*. Aquest anàlisi es va realitzar en col·laboració amb la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebron (VHIR). L'estudi es va basar en 24 mostres, entre les quals 12 corresponien a teixit cardíac i 12 a teixit neuronal. De les 12 mostres, 6 corresponien al genotip *Tatd^{+/+}* i 6 al genotip *Tatd^{-/-}* en ambdós tipus de teixit.

De tot el llistat de gens que estaven expressats de manera diferencial entre genotips, es van estudiar els 70 amb més diferències significatives. En general, en el teixit cardíac la majoria de gens es troben més expressats en els cors *Tatd^{-/-}* respecte als *Tatd^{+/+}*. En canvi, en el teixit neuronal la majoria de gens en els còrtexs *Tatd^{-/-}* es troben menys expressats respecte als *Tatd^{+/+}* (Figura 48 A i B). En la Figura 48 B i C, es mostren els Volcano plots de cor i cervell. En aquests, només es mostren els noms dels gens quan la p-value és inferior a 0.01 i la diferència en l'expressió és major a 1 en escala logarítmica (log2). Pel que fa a cor, s'observen 11 gens augmentats i 6 disminuïts en *Tatd^{-/-}* que compleixen aquest criteri. En cervell, s'observen 2 gens amb un increment d'expressió i 21 gens amb una disminució en *Tatd^{-/-}*.

Els resultats mostren que tant en el cor com en el còrtex, els gens que més varien estan implicats en la regulació de proteïnes del citoesquelet, regulant la dinàmica de l'actina i dels microtúbuls. A més a més, també s'han identificat molts gens implicats en el tràfic intracel·lular de vesícules en ambdós teixits.

Específicament, en el teixit cardíac es troben variacions (increments i disminucions) en gens implicats en el metabolisme. Els gens que destaquen per estar incrementats en els ratolins *Tatd^{-/-}* són els següents: *Afmid* (metabolisme del triptòfan), *Hacd3* (metabolisme de lípids) i *Maneal* (metabolisme de carbohidrats), entre d'altres. En canvi, els gens que destaquen per estar disminuïts en aquests ratolins són: *Slc2a5* (transportador de carbohidrats), *Gck* (glucoquinasa), *Aldob* (aldolasa). Tot i trobar variats gens relacionats amb el metabolisme, el grup més nombrós de gens incrementats en els cors *Tatd^{-/-}* són els que codifiquen per proteïnes de membrana (*Plcg2*, *Slc12a5*), proteïnes extracel·lulars (*col3a1*), transport de vesícules (*Rtn1*, *Nrsn2*) i del citoesquelet (*Arhgef17*, *Kalrn*, *Slain1*, *Map1b*).

Concretament, en el teixit neuronal es troben variacions en gens (la majoria disminuïts) que formen part de la via de senyalització sinàptica de tràfic de vesícules (Grp, Adcyap1, Cbln2, Cbln4).

La via de senyalització del fosfatidilinositol també està afectada en els còrtexs dels ratolins *Tatd^{-/-}*, ja que es troben expressats de manera diferencial gens que codifiquen per proteïnes que formen part de la via com: receptors acoblats a proteïnes G (Htr5b, Gucy2g, Adcyap1), en canals iònics (Abcc9 i Tmem38a selectius per K⁺, Trpc4 selectiu per Ca²⁺ i Gabra2 selectiu per Cl⁻) i en proteïnes del reticle endoplasmàtic (Lpin1, Tmtc3, Ptgs2, Itpkb).

Per tant, la majoria de gens identificats codifiquen per proteïnes que s'ubiquen a compartiments de membrana, senyalització citoplasmàtica i extracel·lular (Figura 48 E i F).

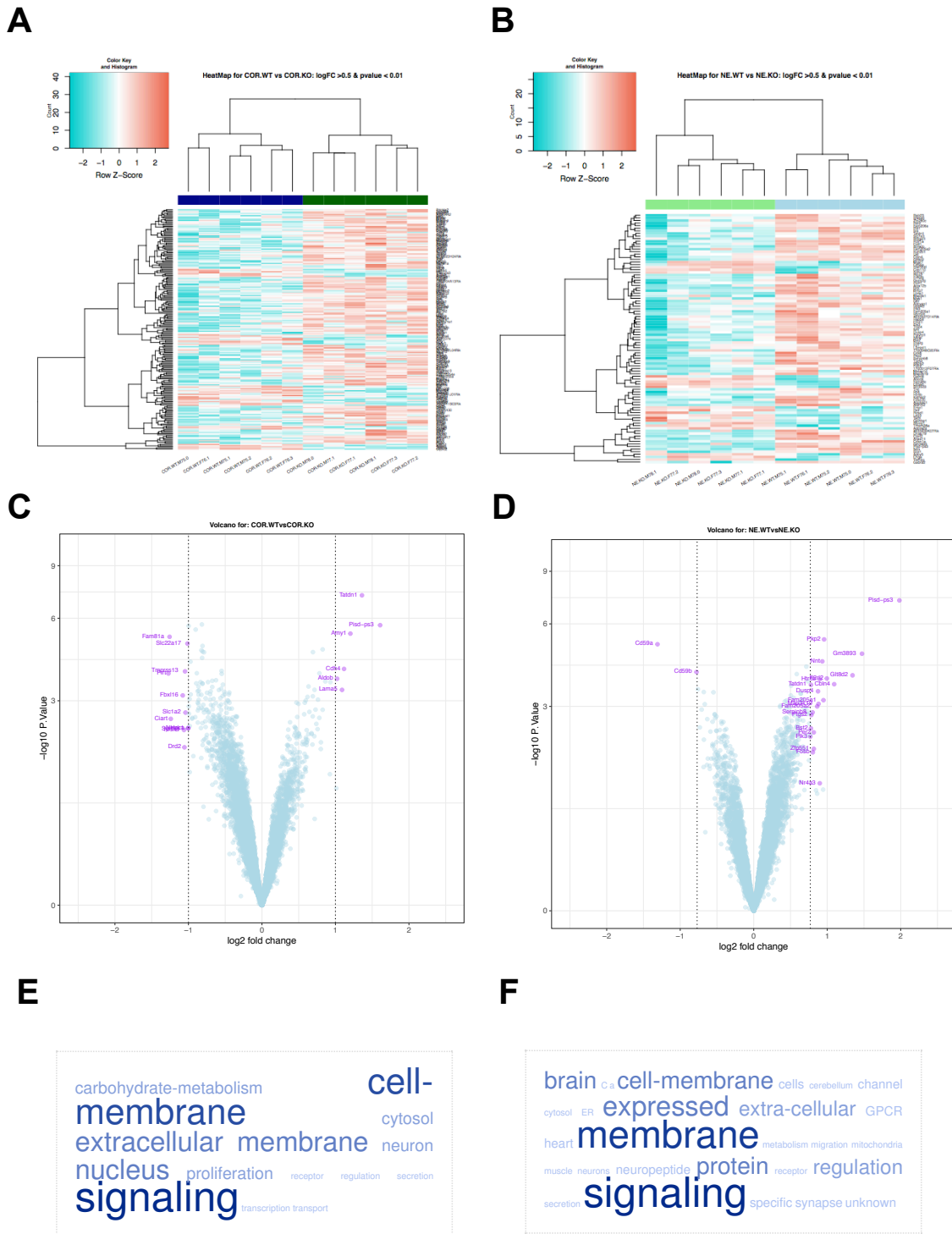
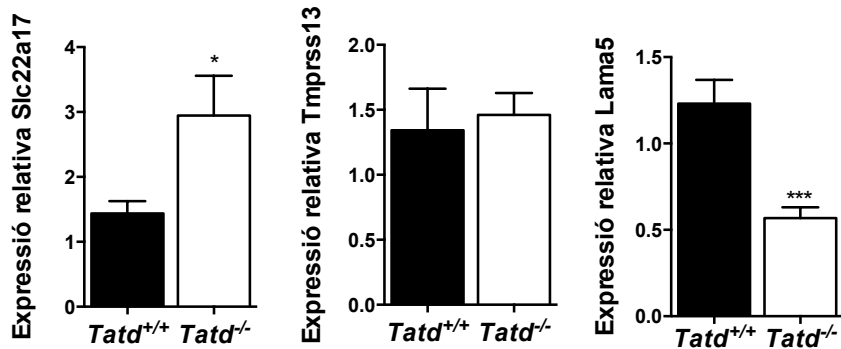


Figura 48. La deleció de *Tatd* provoca canvis transcriptòmics en cervell i cor. A i B) Heatmaps corresponents a la comparació entre el transcriptoma de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} en cor (A) i en cervell (B). C i D) Volcano plots de la comparació entre ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} en cor (C) i cervell (D). E i F) Word cloud de les funcions i localització dels gens expressats diferencialment entre els ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} en cor (E) i cervell (F).

Per tal de validar els resultats obtinguts en l'estudi vam analitzar mitjançant PCR en temps real l'expressió d'alguns gens significativament diferents en els dos teixits. Vam escollir 4 gens de cada teixit, on 2 d'ells es trobaven incrementats i 2 es trobaven disminuïts en l'array. Els resultats es mostren a la Figura 49.

COR



CERVELL

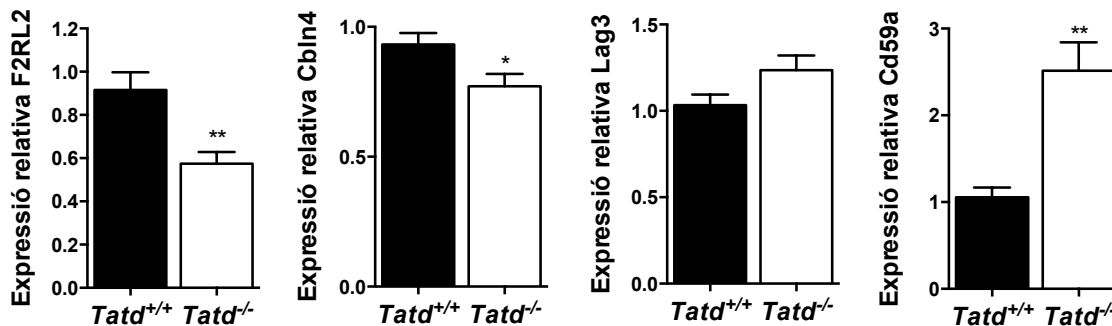


Figura 49. PCR en temps real de gens diferentment expressats en els cors i cervells dels ratolins *Tadt*^{-/-} en l'estudi transcriptòmic. Estudi de l'expressió en ARNm de Slc22a17 (*Solute carrier family 22 member 17*), Tmprss13 (*Transmembrane Serine Protease 13*), Lama5 (*Laminin Subunit Alpha 5*) i Amy1 (*amylase alpha 1A*, dada no mostrada) en cor. Estudi de l'expressió en mARN de F2RL2 (*Coagulation Factor II Thrombin Receptor Like 2*), Cbln4 (*Cerebellin 4*), Lag3 (*Lymphocyte Activating 3*) i Cd59a en cervell. *p-value<0.05, **p-value<0.01, ***p-value<0.001 unpaired t-test.

Pel que fa a cor, un dels gens escollits va ser el gen Slc22a17 (*Solute carrier family 22 member 17*), el qual codifica per un receptor de superfície cel·lular que juga un paper important en la homeòstasi i transport del ferro¹⁷⁷. Tant en excés com en dèficit, el ferro és tòxic en l'organisme. En els cors *Tadt*^{-/-}, l'expressió relativa de Slc22a17 es troba incrementada respecte els cors *Tadt*^{+/+} confirmant així el resultat obtingut en l'array.

Vam decidir estudiar l'expressió del gen *Tmprss13* (codifica per una serin proteasa transmembrana, *Transmembrane Serine Protease 13*) perquè un estudi de discordància en bessons homozigòtics va demostrar la presència de mutacions en aquest gen en pacients amb malalties congènites del cor¹⁷⁸. Tot i que en el microarray aquest gen es trobava incrementat en el ratolí *Tatd*^{-/-}, l'anàlisi per qPCR no va mostrar diferències significatives.

Respecte al gen *Lama5* (*Laminin Subunit Alpha 5*), que codifica per una proteïna extracel·lular que conforma la lamina basal, les dades del microarray indiquen una disminució d'aquest en el teixit cardíac. Vam escollir aquest gen perquè l'animal heterozigot per *Lama5* té el cor més engrandit i mostra una intolerància a la glucosa¹⁷⁹. Vam confirmar una disminució del transcrit del 50% aproximadament en els animals *Tatd*^{-/-} mitjançant qPCR.

L'últim gen que vam analitzar en el teixit cardíac va ser el gen *Amy1* (*Amylase alpha 1A*) que codifica per una amilasa relacionada amb el metabolisme dels carbohidrats. Els individus amb un baix nombre de còpies d'aquest gen tenen un major risc cardiometabòlic¹⁸⁰. Aquest gen en el microarray es troba disminuït en l'animal *Tatd*^{-/-}, però no vam aconseguir detectar l'expressió mitjançant qPCR (dada no mostrada).

Pel que fa a còrtex, el primer gen que vam analitzar per qPCR va ser el gen *F2RL2* (*Coagulation Factor II Thrombin Receptor Like 2*). Aquest gen codifica per un receptor acoblat a proteïna G activat pel tall de la trombina. Vam decidir estudiar-lo ja que en el microarray vam veure que un grup de gens que codifiquen per receptors acoblats a proteïna G estan disminuïts en els còrtexs *Tatd*^{-/-}. A més a més, específicament aquest gen s'ha vist relacionat en la iniciació de la inflamació post-isquèmica¹⁸¹. El resultat obtingut per qPCR va ser confirmatori.

El gen *Cbln4* codifica per la cerebel·lina 4, neuropèptid secretat que participa en la integritat i plasticitat sinàptica. Una deleció condicional d'aquest gen causa un increment en els nivells d'ansietat en un model animal, indicant que aquest gen pot contribuir en alteracions en el comportament¹⁸². El ratolí *Tatd*^{-/-} mostra una disminució en els nivells d'expressió en el microarray, que es valida a través de l'anàlisi del transcrit per PCR en temps real.

Donat que *Tatd* ha sigut descrita com a DNAsa que confereix capacitat d'evadir l'atac del sistema immune en patògens (paràsits i bacteries) vam decidir estudiar l'expressió del gen *Lag3* (*Lymphocyte Activating 3*). Aquest gen codifica per una proteïna implicada en el sistema immunitari, la qual impedeix l'activació de les cèl·lules T. Respecte al sistema

nerviós central, Lag3 participa en l'endocitosis de la α -sinucleïna per part de les neurones, iniciant així la transmissió d'aquesta¹⁸³. Tot i trobar-lo incrementat en el microarray dels còrtex *Tatd*^{-/-}, l'anàlisi del transcrit en PCR en temps real no va donar diferències significatives entre els còrtex de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-}.

Finalment, també es va estudiar el gen Cd59a. Aquest gen codifica per una glicoproteïna de membrana que regula la lisi cel·lular (inhibint la formació del complex d'atac de membrana, MAC). S'ha vist involucrat en la microglïosis en la retina del ratolí Cd59a^{-/-}. Aquest gen té un efecte protector després d'una isquèmia cerebral en el ratolí. Corroborant els resultats obtinguts en el microarray, l'expressió de Cd59a es troba incrementada en el ratolí *Tatd*^{-/-}.

2.8 Caracterització neurocomportamental del ratolí *Tatd*^{-/-}

Degut a l'expressió de TatD al sistema nerviós central i als resultats obtinguts a l'estudi d'expressió gènica comparativa entre ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} realitzat amb mostres de cor i cervell, es va decidir realitzar un estudi neuro-comportamental d'aquests ratolins.

Anàlisi del comportament locomotor i nivells d'ansietat

Per avaluar el comportament locomotor espontani dels ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} es va dur a terme la prova del camp obert durant 30 minuts. L'anàlisi estadístic va mostrar diferències significatives en l'activitat locomotora espontània entre genotips, mesurada a través del registre de la distància recorreguda (Figura 50A), essent menor en els ratolins *Tatd*^{-/-} i en el tipus de navegació usada (Figura 50C). Però, ambdós genotips romanen el mateix temps en el centre del camp obert (Figura 50D).

Per tal d'analitzar l'aprenentatge motor, es va utilitzar el rotarod acceleratiu durant 3 dies consecutius, on es realitzaven 4 assajos per dia. Els resultats en el rotarod indiquen que els animals *Tatd*^{-/-} presenten un dèficit en l'aprenentatge motor ja que triguen menys temps a caure de la plataforma que els ratolins *Tatd*^{+/+} (Figura 50B).

També vam voler avaluar els nivells d'ansietat dels ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} amb la prova del plus maze (Figura 50E i F), laberint compost per dos braços oberts i dos braços tancats. Vam observar que els ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} romanen el mateix temps en els braços oberts del laberint, indicant que ambdós presenten els mateixos nivells d'ansietat. A més a més, un dels paràmetres calculats en aquest test va ser la distància recorreguda pels ratolins i, tot i no arribar a ser significatiu, els ratolins *Tatd*^{-/-} recorren menys distància que els ratolins

Tatd^{+/+}. Aquest resultat mostra consonància amb el resultat obtingut en la distància recorreguda en el camp obert (Figura 50A).

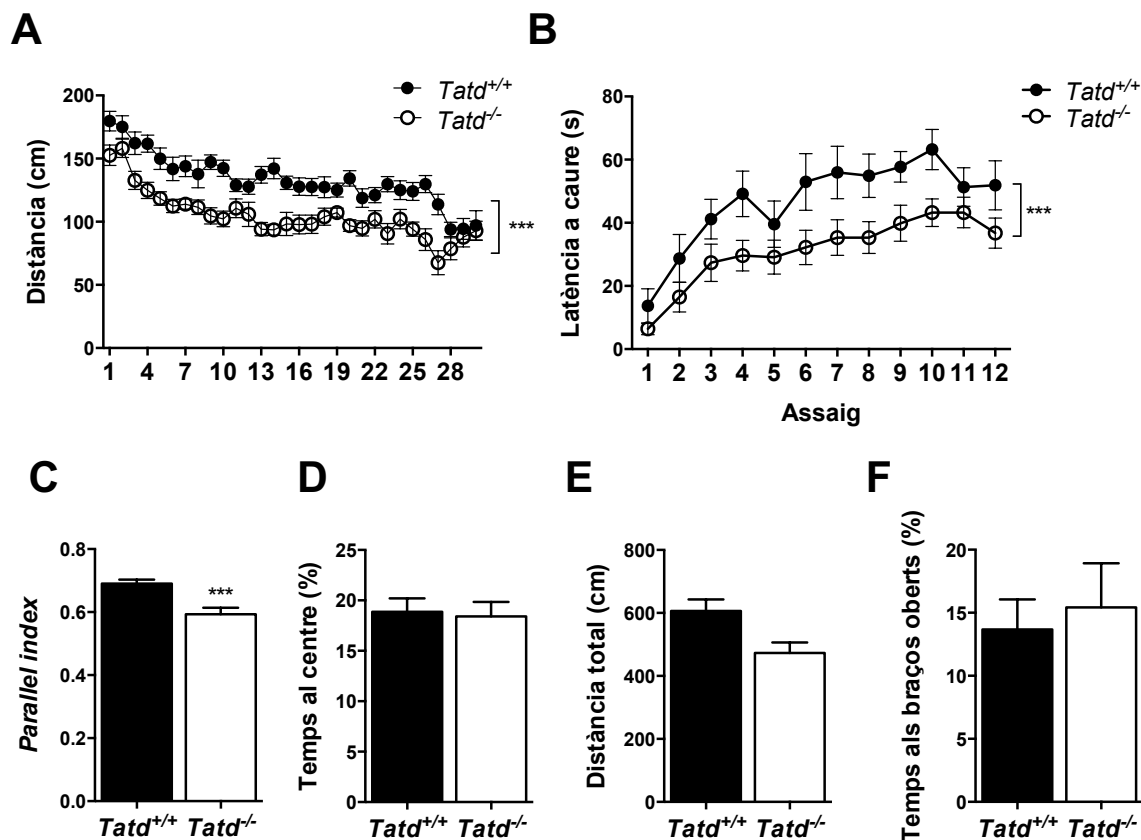


Figura 50. El ratolí *Tatd*^{-/-} presenta alteracions en coordinació i aprenentatge motor però, no mostra alteracions en els nivells d'ansietat. A, C i D) La prova del camp obert es va realitzar per comprovar l'activitat locomotora espontània durant 30 minuts mitjançant el registre de la distància recorreguda (A), el tipus de navegació utilitzada (C) i el temps en el centre (D). B) L'aprenentatge motor va ser analitzat mitjançant el rotarod acceleratiu al llarg de 5 min incrementant la velocitat de 4 a 40 rpm. Es van realitzar 4 assajos al dia durant 3 dies consecutius. E i F) La prova del plus maze es va emprar per estudiar els nivells d'ansietat dels ratolins. Es va monitoritzar la distància total recorreguda (E) i el temps dedicat als braços oberts (F). *p-value<0.001 (A i B: 2way ANOVA); (C, D, E, F: unpaired t-test).**

Anàlisi dels nivells de memòria de reconeixement, espacial i associativa

Per tal d'estudiar si la supressió del gen *Tatd* podria modular l'aprenentatge i la memòria, es van dur a terme el test de reconeixement de nou objecte (NORT), el test d'evitació passiva i el test d'alternació espontània en el laberint en forma de T.

En el NORT, durant el primer dia es van habituar tots els animals en el camp obert. Després del dia d'habitució, els animals van ser sotmesos a una sessió d'entrenament en presència de dos objectes similars (objectes A). Al cap de 24 hores, un dels objectes va ser substituït per un de nou (objecte B) i es va avaluar si els ratolins mostraven més preferència a explorar el nou objecte introduït. Vam observar que tant els ratolins *Tatd^{+/+}* com els *Tatd^{-/-}* exploren més l'objecte B (nou) respecte a l'objecte A (vell) sense diferències entre genotips (Figura 51A).

En el test d'alternació espontània en el laberint en forma de T, durant l'entrenament tant els ratolins *Tatd^{+/+}* com *Tatd^{-/-}* només poden explorar un dels braços del laberint ja que l'altre braç està tancat. Al cap d'una hora de l'entrenament, es calcula el temps d'exploració d'ambdós braços, del braç conegut i del braç nou. Els ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}* mostren major preferència pel braç nou respecte al braç conegut, sense diferències degudes al genotip (Figura 51B).

Pel que fa al test d'evitació passiva, durant el primer dia els ratolins *Tatd^{+/+}* i *Tatd^{-/-}* es van col·locar a la cambra de llum i es va calcular el temps que tardaven en travessar a la cambra fosca, essent aquest temps similar en ambdós genotips. Al cap de 24 hores d'haver rebut el xoc elèctric en la cambra fosca, es van posar de nou els ratolins a la cambra il·luminada. Com s'observa en la Figura 51C, el temps que tarden a travessar a la cambra fosca incrementa en ambdós genotips sense haver-hi diferències significatives entre ells.

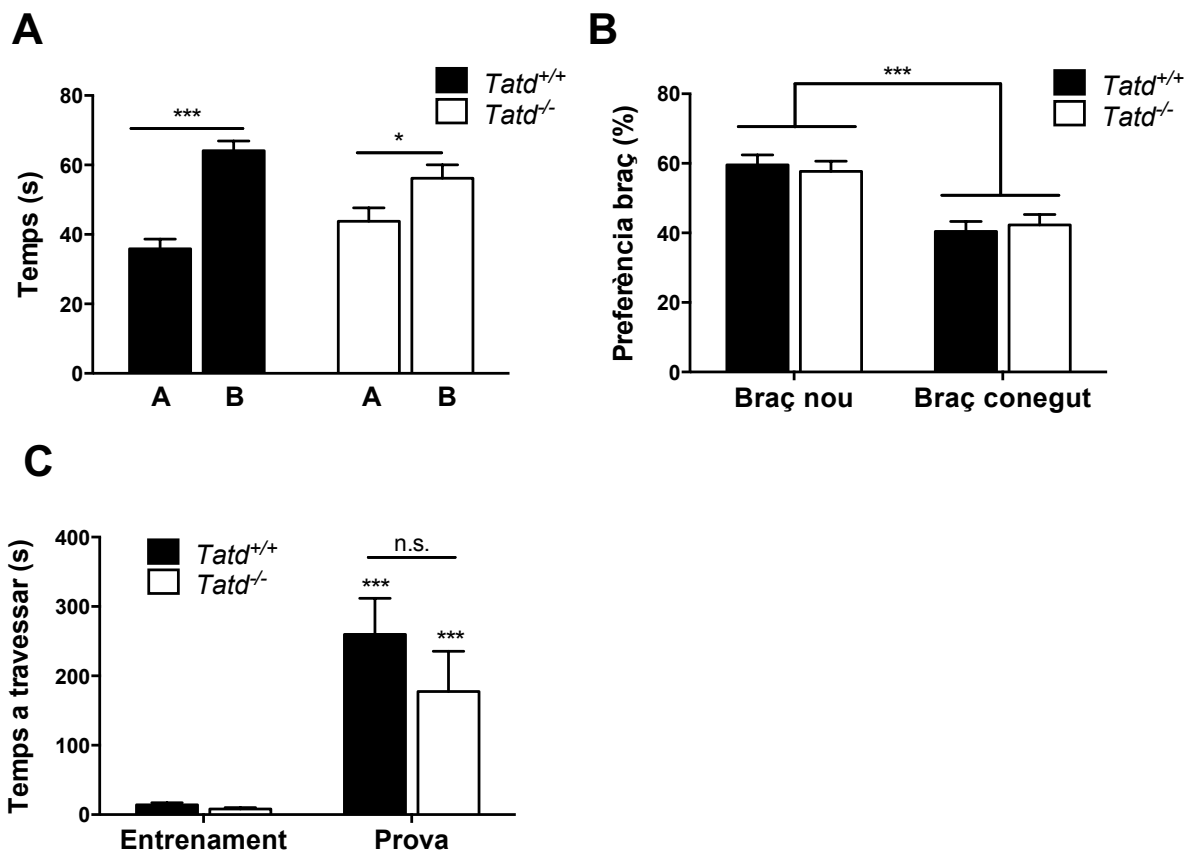


Figura 51. El ratolí *Tatd*^{-/-} no presenta alteracions en aprenentatge i memòria. A) Per tal d'avaluar la memòria de reconeixement els ratolins van ser sotmesos al test de reconeixement de nou objecte (NORT). Es va quantificar la preferència a explorar un objecte ja conegut (objecte A) i un objecte nou (B). **B)** Per tal d'avaluar la memòria espacial els ratolins van ser sotmesos al test d'alternació espontània en el laberint en forma de T. Es va calcular la preferència d'explorar el braç conegut i el braç nou del laberint. **C)** Per tal d'avaluar la memòria associativa els ratolins van ser sotmesos al test d'evitació passiva. En la sessió d'entrenament van rebre un xoc elèctric. Transcorregudes 24 hores es va mesurar el temps que tardaven a travessar a la zona on havien rebut el xoc elèctric com un índex de memòria. *p-value<0.01, ***p-value<0.001 (1way ANOVA).

Anàlisi dels nivells de desesperació conductual i força muscular

Es va utilitzar el test de natació forçada per analitzar la desesperació conductual dels ratolins. Es va calcular el temps que romanen els ratolins nedant. Com s'observa en la Figura 52A, durant els dos primers minuts de l'assaig els ratolins *Tatd*^{+/+} tenen més mobilitat que els ratolins *Tatd*^{-/-}. En canvi, durant els 4 minuts restants no s'observen diferències en ambdós genotips.

Vam decidir analitzar la força muscular dels ratolins amb la finalitat de descartar que els resultats obtinguts en el rotarod acceleratiu i en la natació forçada fossin deguts a una menor força dels ratolins *Tatd*^{-/-}. Durant un minut es mesura la latència que té el ratolí a caure d'una quadrícula on prèviament va ser col·locat. El resultat revela que no hi ha diferències en la força muscular entre ambdós genotips (Figura 52B).

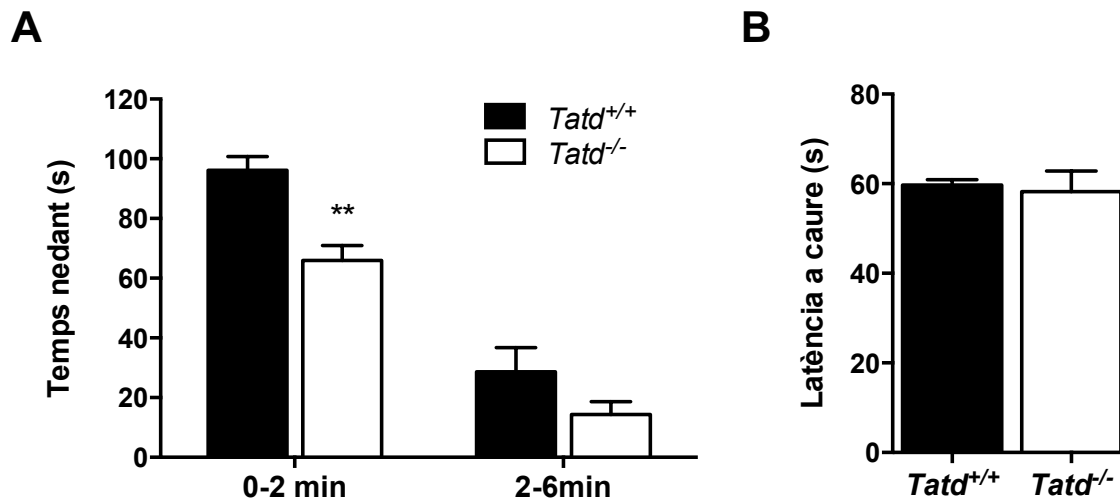


Figura 52. El ratolí *Tatd*^{-/-} presenta menys mobilitat que el ratolí *Tatd*^{+/+} en el test de natació forçada. **A)** Els nivells de desesperació conductual van ser avaluats a través del test de natació forçada. La gràfica mostra el temps que els ratolins naden. **B)** Es va calcular la latència a caure d'una quadrícula per tal d'analitzar la força muscular del ratolí. **p-value < 0.01 (A: 2way ANOVA; B: unpaired t-test)

DISCUSSIÓ

1. L'expressió i la funció en proliferació d'ENDOG és heterogènia entre línies tumorals

L'endonucleasa G (EndoG) és una proteïna mitocondrial amb activitat DNasa/RNasa¹⁸⁴, coneguda principalment pel seu paper en la degradació de l'ADN durant l'apoptosi de manera caspasa independent^{72,185}. Tot i així, al llarg dels anys s'han descrit noves funcions d'aquesta proteïna que no estan relacionades amb la fragmentació de l'ADN i la mort cel·lular, entre les quals està la proliferació^{69,79}. Resultats recentment publicats del nostre grup corroboren la implicació d'EndoG en proliferació en cèl·lules de ratolí (fibroblasts de pell i cardiomiòcits *Endog*^{-/-}), en la línia cel·lular humana HEK293 *ENDOG*^{-/-}, generada mitjançant el sistema CRISPR/Cas9 i en la línia de fibroblasts de rata Rat-2, on es troba silenciada el gen *Endog* mitjançant l'ús del sistema amb interferència d'ARN⁸⁰.

La desregulació de l'apoptosi i la proliferació són dos components importants en moltes patologies com el càncer. Donat que EndoG juga papers importants en ambdós processos, en aquest treball hem volgut estudiar la possible funció d'EndoG en diverses línies tumorals humanes. Concretament, les línies tumorals analitzades són de càncer d'endometri, de tiroides, de còlon i leucèmia limfocítica crònica. Les nostres dades demostren que l'expressió d'EndoG varia en un ampli rang entre les diferents línies. En el cas del carcinoma d'endometri, no s'observen diferències significatives en els nivells d'ENDOG entre les línies IK, HEC i MFE. En el carcinoma de tiroides, les cèl·lules Cal-62 procedents d'un tumor més agressiu que les cèl·lules FTC-133 expressen més ENDOG. Pel que fa a les línies d'adenocarcinoma de colon, la línia que presenta més expressió d'ENDOG és la línia HT-29 que correspon a un adenocarcinoma de grau I respecte a la línia Caco-2 de grau III. Finalment, la línia de leucèmia limfocítica crònica MEC-1 també presenta una elevada expressió d'ENDOG. Basnakian et al. descriuen l'expressió d'ENDOG en càncer de mama, on l'expressió correlaciona inversament amb la invasivitat de les cèl·lules canceroses suggerint que la pèrdua d'ENDOG podria contribuir a la progressió del càncer de mama¹⁸⁶. En contrast, en carcinomes gàstrics i colorectals l'expressió d'ENDOG es troba incrementada respecte a mucoses epitelials normals suggerint que ENDOG pot tenir un paper tant en la tumorigènesi colorectal com en la gàstrica. Però, no troben diferències ni en diferenciació ni en invasivitat, indicant un possible paper d'ENDOG en el desenvolupament del càncer però no en la progressió d'aquest¹⁸⁷. Per tant, en conjunt aquests resultats ens indiquen que l'expressió d'ENDOG depèn del tipus tumoral i no

sembla que hi hagi correlació amb l'agressivitat.

Els estudis en proliferació ens revelen que ENDOG és important en la línia d'endometri IK. Aquesta línia es caracteritza per la inactivació de la fosfatasa PTEN, fosfatasa implicada en la inhibició de la via PI3K/Akt/mTOR. En consonància amb aquests resultats, els nostres resultats previs mostren que la falta d'expressió d'EndoG indueix canvis en la via de senyalització AKT en cardiomiòcits neonatals, disminuint la fosforilació de Akt i GSK3 β ⁸¹. Resultats recents no publicats pel nostre grup demostren que la deficiència d'EndoG en fibroblasts de pell *Endog*^{-/-}, en la línia cel·lular humana HEK293 *Endog*^{-/-} i la disminució de l'expressió d'EndoG en la línia de fibroblasts de rata Rat-2, indueix una reducció de la fosforilació de Akt associada a la proliferació cel·lular.

En la línia de carcinoma anaplàstic de tiroides Cal-62, tot i la reducció significativa d'EndoG la proliferació no es veu afectada. De fet, els nostres resultats indiquen que en aquest tipus cel·lular, Akt es troba molt poc fosforilada i PTEN s'expressa normalment. A més, el carcinoma anaplàstic de tiroides presenta mutacions en l'oncogen n-RAS¹⁸⁸, gen que participa en l'activació de la via clàssica MAPK¹⁸⁹. Possiblement degut a la hiperactivació de la via de senyalització MAPK no s'observen canvis en proliferació, ja que hem vist que la reducció de l'expressió d'EndoG afecta només a la via PI3K/Akt. Tot i aquest fet, la reducció farmacològica amb un inhibidor de la via PI3K indueix una disminució en la proliferació en aquest tipus cel·lular¹⁹⁰. Sorprenentment, la disminució de l'expressió d'EndoG en la línia FTC-133 de carcinoma fol·licular de tiroides no produeix un defecte en proliferació significatiu. El resultat obtingut és contrari a l'esperat ja que aquesta línia presenta una elevada fosforilació d'Akt. Una possibilitat de la no observació del defecte en proliferació és que aquestes cèl·lules ja presenten nivells d'expressió d'EndoG molt baixos, similars als obtinguts per silenciament en la línia IK. Una altra possibilitat addicional és que en aquestes cèl·lules l'eficiència de la transducció va ser menor que en la resta de línies transduïdes. De totes les línies analitzades, la línia d'adenocarcinoma de colon HT-29 és la que expressa més EndoG i en aquesta tampoc s'observen canvis en proliferació. Una possible explicació és que aquesta línia presenta nivells extraordinàriament baixos de pAkt/Akt, ja que les cèl·lules que responen al silenciament d'Endog presenten nivells alts de fosforilació d'aquesta kinasa.

Seria interessant realitzar més experiments per tal de determinar si en les línies on no hem vist un efecte clar en proliferació, EndoG pogués jugar una altra funció, com per exemple en l'apoptosi. Durant el desenvolupament i progressió del càncer, les cèl·lules canceroses

adquireixen la capacitat d'evadir l'apoptosi, protegint-se front als estímuls de mort cel·lular¹⁹¹. EndoG podria contribuir a la progressió de l'apoptosi induint així la mort de la majoria de cèl·lules, en canvi, en cèl·lules tumorals resistents als mecanismes de mort apoptòtica podria permetre la supervivència de les cèl·lules. Per exemple, en el càncer colorrectal sovint s'observa la sobreexpressió de Bcl-2 i la baixa expressió i/o mutació de Bak, Bax o altres membres proapoptòtics de la família de Bcl-2¹⁹².

Donat que l'activitat de la proteïna Akt és sovint elevada en cèl·lules de glioblastoma deguda a la mutació del supressor tumoral PTEN¹⁹³, vam voler estudiar si ENDOG podria influenciar en la proliferació de les línies U87 i U251, dues línies cel·lulars molt utilitzades com a model de glioblastoma. Tot i que ambdues línies no presenten expressió de PTEN, la línia U251 presenta nivells més elevats de Akt fosforilada i en conseqüència la seva proliferació es veu influenciada quan es redueix l'expressió d'EndoG.

En conjunt aquests resultats suggereixen que en les línies tumorals analitzades, ENDOG té un rol en proliferació quan aquestes presenten nivells elevats de fosforilació de Akt a més elevada expressió d'ENDOG.

2. EndoG participa en la proliferació de les glàndules de càncer d'endometri en el model de ratolí *Pten*^{-/-}

El carcinoma d'endometri és el càncer genital més freqüent i representa la quarta neoplàsia més comú entre dones de països desenvolupats¹⁴¹. En el carcinoma d'endometri s'han documentat alteracions freqüents en la via de senyalització PI3K/Akt/mTOR, via hiperactivada en un 30-50% de tumors humans, essent la pèrdua de PTEN una de les causes de la hiperactivació de la via^{133,138,152,194}. La senyalització de la via PI3K/Akt és essencial pel creixement *in vitro* de glàndules d'endometri¹⁹⁵.

La funció d'EndoG en la proliferació en el carcinoma d'endometri és desconeguda. Els nostres resultats indiquen que la disminució d'EndoG pot generar alteracions en la divisió cel·lular en algunes línies tumorals. Una d'aquestes línies on hem vist canvis en proliferació és la línia d'endometri Ishikawa. El model *in vitro* més similar a la situació real del carcinoma d'endometri és el model de cultiu tridimensional derivat de cèl·lules epitelials d'endometri aïllades dels ratolins *Pten*^{-/-}¹⁹⁶. Un dels principals efectes de la deleció de *Pten* és l'increment en mida de les glàndules que es formen *in vitro*. Aquest increment és

acompanyat d'una hiperactivació de la via PI3K/Akt i un increment en els nivells d'expressió de la ciclina D1, proteïna important en la progressió de G1 a S del cicle cel·lular. Paral·lelament, les glàndules *Pten*^{-/-} augmenten els nivells d'expressió d'EndoG. Aquest fet sembla paradoxal pel paper pro-apoptòtic d'EndoG. No obstant això, Yoo et al. també observa elevat nivell d'expressió d'*ENDOG* en el carcinoma colorectal, suggerint un paper dual en apoptosi i en supervivència¹⁸⁷. Un dels factors rellevants que explicaria l'increment d'EndoG en les glàndules *Pten*^{-/-} és l'augment en el nombre de mitocondries que suggereix l'increment en l'expressió de la lipoamida deshidrogenasa. Aquest resultat aniria amb consonància amb un increment dels requeriments energètics per dur a terme la divisió cel·lular^{197,198}.

Per primera vegada, en aquest treball mostrem que EndoG participa en la proliferació de les glàndules d'endometri *Pten*^{-/-}. La seva disminució mitjançant interferència d'ARN reverteix l'efecte d'increment de mida degut a la deleció de *Pten*. El silenciament d'EndoG impedeix parcialment l'activació PI3K/Akt, ja que es disminueixen els nivells de la fosforilació activadora d'Akt i, com a conseqüència una menor expressió de Ciclina D1 indicant una menor entrada en la fase S del cicle cel·lular.

La generació en aquest treball d'un model murí basat en la deleció simultània d'EndoG i *Pten* ens permet poder validar els resultats discutits anteriorment. Tal com havíem observat amb l'ús de la tècnica amb RNA d'interferència, EndoG és important pel creixement de les glàndules tumorals. Aquest resultat es confirma per un nombre menor de cèl·lules en divisió (cèl·lules BrdU positives) provinents d'animals *Pten*^{-/-} *Endog*^{-/-}. Els resultats obtinguts en les glàndules dels animals *Pten*^{+/+} *Endog*^{-/-}, on també s'observa una disminució de la proliferació respecte a les glàndules *Pten*^{+/+} *Endog*^{+/+}, reforcen la idea de que *Endog* és important també en la divisió de les cèl·lules normals (no canceroses).

En conjunt, les nostres dades permeten la identificació de la proteïna EndoG com una nova diana terapèutica en el càncer, en particular d'endometri, que presentin mutacions inactivadores en *PTEN* i/o amb nivells elevats de fosforilació de la kinasa Akt. No obstant això, en línia amb altres treballs, constatem que l'expressió d'EndoG és variable en funció del tipus de càncer. Per tant, alhora de desenvolupar una teràpia s'hauria d'estudiar el paper d'EndoG de manera individualitzada. Una de les limitacions en aquest estudi és que només hem estudiat un dels processos de la tumorigènesi que és la proliferació. Així doncs, el seu impacte en la transició epiteli-mesènquima, invasió i metàstasi és desconegut i queda obert a futures investigacions.

3. ExoG és important en teixits en desenvolupament

ExoG, és una endo/exonucleasa localitzada a la membrana mitocondrial interna. L'interès en estudiar aquesta nucleasa va sorgir degut a que Cymerman et al. van realitzar una recerca d'enzims similars a EndoG en eucariotes superiors, i va descobrir que EndoG i ExoG resulten de la duplicació d'un gen endo/exonucleasa ancestral⁶³. Curiosament, l'estudi d'ExoG va revelar que aquesta, presenta una activitat 5'-3' exonucleasa que no es troba en els membres de la família d'EndoG en mamífers, que són endonucleases pures^{199,200}. La rellevància d'aquesta activitat es va fer evident quan Tann i col·laboradors van publicar les seves troballes confirmant que ExoG és una nucleasa important en el sistema LP-BER mitocondrial⁷³, sistema responsable de la reparació de bases oxidades, alquilades i desaminades, així com aparellaments erronis de bases²⁰¹.

Tot i la recerca i l'interès en ExoG en els últims anys, no s'havia descrit ni la seva expressió en diferents teixits ni els canvis que es produeixen durant el desenvolupament. Per primera vegada, en aquest estudi mostrem que ExoG és més abundant en els teixits neonatals respecte els teixits adults. El fet que ExoG s'expressi més en el teixit neonatal que en l'adult suggereix que és més important en el desenvolupament inicial, on la proliferació cel·lular és més elevada. En consonància amb aquests resultats, Szczesny et al. va revelar que quan es sobreexpressava ExoG, els mioblasts proliferatius eren més resistents al dany induït per ROS que els miotubs no proliferatius⁹⁵. Tanmateix, en cèl·lules Hela la depleció d'ExoG causa grans danys en l'ADN mitocondrial⁷³, contràriament al que succeeix en cardiomiòcits neonatals ja que en els cardiomiòcits, l'ADN mitocondrial no es veu afectat⁹⁶, suggerint que ExoG podria ser important en el manteniment de la integritat de l'ADN mitocondrial en cèl·lules proliferatives.

Com ja he mencionat, ExoG és descrita com un component essencial de la ruta BER en la mitocòndria degut a la seva activitat 5'-exonucleasa. Aquesta via és la via central en la reparació de lesions endògenes, incloent les que es produeixen com un subproducte inevitable de la respiració²⁰¹. Tann et al. van observar que la depleció d'aquesta nucleasa causa una acumulació de trencaments de cadena simple (SSBs *single strand breaks*) en el genoma mitocondrial, desencadenant la via intrínseca de l'apoptosi. Específicament, informaven que la depleció d'ExoG induïx un increment significatiu de la població cel·lular en la fase sub-G1 del cicle, fet que encara dóna més suport a que el dèficit d'ExoG activa la mort cel·lular⁷³. No obstant això, en el curs del nostre estudi, resultats *in vitro* amb una línia d'elevada capacitat proliferativa, la línia cel·lular Rat-1, indiquen que l'absència d'ExoG no

desencadena mort cel·lular ni produeix una acumulació de les cèl·lules en la fase sub-G1, però aquestes mostren una menor capacitat de divisió, proliferant més lentament. Aquests resultats *in vitro* indiquen que ExoG exerceix un paper important en la proliferació normal en la línia cel·lular Rat-1.

4. L'expressió d'ExoG i EndoG divergeix en la distribució tissular

ExoG i EndoG presenten diferents patrons d'expressió, essent melsa i ronyó neonatals i cervell adult els teixits que posseeixen més ExoG. Per contra, EndoG es troba principalment en cor i fetge, on manté la seva expressió sense variacions relacionades amb l'edat, suggerint que les funcions d'ExoG i EndoG divergeixen. En consonància amb aquests resultats, Kieper et al. ja havia mencionat la possible divergència en les funcions deguda a les diferències en l'especificitat de substrat²⁰². A més, resultats del nostre grup indiquen que la manca d'EndoG disminueix l'activitat de la cadena respiratòria, almenys en experiments *in vitro*¹⁷², contràriament al que s'observa en absència d'ExoG ja que resulta en un increment en la respiració cel·lular dels miòcits⁹⁶.

Tot i que ambdues proteïnes són descrites com a nucleases mitocondrials, només l'expressió d' EndoG correlaciona amb els nivells de marcadors mitocondrials utilitzats, els marcadors COX-IV i la lipoamida deshidrogenasa. Aquest fet suggereix que els nivells d'EndoG estan associats amb el nombre de mitòcondries, probablement per la seva funció en la replicació de l'ADN mitocondrial⁸¹. En canvi, els nivells d' expressió d'ExoG depenen de factors desconeguts fins al moment.

Els nivells d'ExoG són especialment alts en el cervell. Aquesta proteïna no es troba associada de manera diferencial en cap regió analitzada del cervell. Aquest resultat apunta a una funció d'ExoG rellevant al cervell que és, pel moment, desconeguda. L'elevada expressió d'ExoG en cervell i particularment en neurones podria ser explicat per l'alta vulnerabilitat als danys ocasionats per l'estrès oxidatiu en aquestes cèl·lules. Per una banda, el cervell és un teixit ric en àcids grassos poliinsaturats fàcilment peroxidables. D'altra banda, aquest és un gran consumidor d'oxigen motiu pel qual és més probable la formació d'espècies reactives d'oxigen²⁰³. En conjunt, les neurones han de requerir sistemes i proteïnes de reparació de bases mitocondrials, com és ExoG. Reforçant aquesta hipòtesi la disminució d'*Exog* causa un increment en les espècies reactives de l'oxigen en un model d'interferència en cardiomiòcits⁹⁶.

D'altra banda, EndoG és altament expressada en el teixit cardíac. Aquest, es troba conformat principalment per cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs. En contrast a EndoG, on principalment la seva expressió és en els cardiomiòcits, ExoG té la mateixa expressió en els cardiomiòcits i en els fibroblasts cardíacs. El fet de que ExoG no estigui incrementada en les cèl·lules que tenen més mitocondries (cardiomiòcits), és una evidència més que ExoG no sembla relacionada amb la biogènesi mitocondrial.

5. Les nucleases ExoG i EndoG responen diferent sota estímuls d'estrés.

L'infart de miocardi és una de les principals causes de mort a nivell mundial. Durant l'infart es produeix una baixada en els nivells d'oxigen i nutrients que provoca la mort dels cardiomiòcits. El coneixement dels mecanismes de la mort cel·lular dels cardiomiòcits poden influir en el desenvolupament de teràpies que millorin l'impacte de l'infart. Sota una isquèmia experimental, el nostre grup va demostrar que la nucleasa EndoG es transloca de la mitocondria al nucli i és essencial en la degradació de l'ADN de manera caspasa independent⁵⁶. Contràriament a EndoG, la nucleasa ExoG no canvia la seva localització cel·lular, mantenint-se dins de la mitocondria i, probablement com a conseqüència d'això, no participa en la degradació de l'ADN genòmic. Per tant, ExoG i EndoG tot i ser paràlogues evolutives tenen diferències funcionals en el procés de mort dels cardiomiòcits. El paper d'ExoG en la mort en un paradigma dependent de caspases encara és desconegut. En aquest treball mostrem que ExoG, al igual que EndoG⁵⁶, no participa en la degradació de l'ADN genòmic durant el procés de mort dependent de caspases, ni en la degradació d'alt ni baix pes molecular.

Un dels processos que pot desencadenar en una malaltia cardiovascular és un augment en la massa del ventricle esquerre²⁰⁴. El nostre grup va ser el primer en identificar a EndoG com una proteïna determinant en la hipertròfia maladaptativa¹⁷². Tigchelaar et al. va demostrar que ExoG també participa en la hipertròfia en cardiomiòcits neonatals²⁰⁵. En aquest treball, per una banda corroborem els resultats obtinguts prèviament pel nostre grup i pel grup de Tigchelaar et al. ja que la disminució d'EndoG o ExoG causa hipertròfia en els cardiomiòcits. D'altra banda, mostrem per primer cop que la disminució simultània d'EndoG i ExoG no té un efecte additiu en la hipertròfia, suggerint un mecanisme d'acció comú, probablement degut a la generació d'espècies reactives de l'oxigen, com hem observat pel cas d'EndoG⁸¹.

En conclusió, ExoG i EndoG tenen activitats complementàries en el procés d'hipertròfia però no en la degradació de l'ADN genòmic que té lloc tant en situacions de mort cel·lular depenents com independents de caspases.

6. ExoG i EndoG participen en la divisió cel·lular en diferents models *in vitro*

Els nostres resultats mostren que la falta d'ExoG té un efecte similar en la velocitat de proliferació cel·lular com la falta d'EndoG. Degut a aquest fet, vam voler comparar en el nostre model *in vitro* els seus perfils de cicle cel·lular. Els perfils de cicle cel·lular indiquen que tant l'absència d'ExoG com l'absència d'EndoG produeixen una acumulació de cèl·lules en la fase G1 del cicle. Per tant, proposem que l'absència d'ExoG o EndoG activa el punt de control present en la fase G1, anomenat punt de control G1-S, amb la finalitat de reparar el dany ocasionat en l'ADN abans d'entrar a la fase S. En discordança amb aquests resultats, ja s'havia demostrat *in vitro* que la reducció d'EndoG causa un defecte en proliferació, produint un patró característic d'aturament en la fase G2 del cicle cel·lular⁷⁹. Aquesta diferència en el patró d'aturada es podria explicar per l'ús de línies cel·lulars diferents.

A continuació, per tal de testar si ambdues nucleases juguen un paper en la mateixa via o en vies paral·leles pel que fa a proliferació, vam transduir la línia cel·lular Rat-2 amb un vector scrambled, un shRNA contra *Endog*, un shRNA contra *Exog* i la doble transducció durant 72 hores. Els nostres resultats mostren que el silenciament de les dues nucleases mitocondrials no produeix un fenotip més sever pel que fa a la reducció de la velocitat de proliferació, suggerint que participen en la mateixa via. Possiblement aquesta via estigui relacionada amb el manteniment de l'ADN mitocondrial. Concretament, ExoG descrita en la via de reparació LP-BER⁷³ i EndoG en la replicació de l'ADN mitocondrial⁸¹.

A diferència d'EndoG, la disminució d'ExoG no només afecta a l'activació de la via PI3K/Akt sinó que també sembla afectar a la via de les ERK. Així doncs, ExoG podria ser important en la homeòstasi en els teixits que requereixen una major activació de la via ERK. Per tant la inhibició d'ExoG podria tenir efectes diferents als de la inhibició d'EndoG en línies tumorals.

El silenciament per RNA d'interferència d'ExoG demostra el seu efecte antiproliferatiu en el model de glàndules de ratolins *Pten*^{-/-}. Coincidint amb els resultats obtinguts amb les

glàndules transduïdes amb el shRNA d'EndoG o el dèficit d'EndoG en el model doble knock-out, la reducció de la mida de les glàndules amb el shRNA d'ExoG es correlaciona amb una menor fosforilació d'Akt i una disminució de ciclina D1. En conclusió, ExoG és una diana terapèutica potencialment interessant per al tractament del carcinoma d'endometri.

7. TatD no participa en la degradació de l'ADN en cèl·lules de mamífer

TatD és una proteïna conservada evolutivament en diferents espècies, incloent bacteries, fongs, plantes i animals. TatD d'*Escherichia coli* presenta una identitat de seqüència del 26, 37 i 32% amb la de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* i *Homo sapiens*, respectivament, suggerint que TatD pot tenir una estructura i una funció conservada²⁰⁶. L'anàlisi d'homologia de seqüència entre diferents eucariotes revela una alta conservació del motiu IETD, seqüència consens de tall per la caspasa 8, i motiu LKTE de sumoilització. Aquests motius conservats indiquen que és susceptible a ser processada durant la via extrínseca de l'apoptosi i una regulació post-traducciona important per SUMO que seran investigades en un futur i que suggereixen canvis post-traduccionals de *Tatd* que podrien regular la seva abundància, localització i/o activitat.

En relació a l'apoptosi, TatD va ser descrita en *C. elegans* com una nucleasa relacionada en mort cel·lular (CRN-2, *cell death related nuclease*), involucrada en la fragmentació de l'ADN en una via independent a CPS-6 (homòleg d'EndoG)⁶². Estudis posteriors proposen la participació de TatD en apoptosi en *Saccharomyces cerevisiae*⁷⁴, en *Trypanosoma Brucei*⁷⁵, i en *Leishmania*⁷⁶. En aquests organismes, la nucleasa TatD es localitza en el citoplasma i sota un estímul apoptòtic, es transloca al nucli on durà a terme la degradació de l'ADN. El seu paper en apoptosi en cèl·lules de mamífer era desconegut. En contrast amb aquests resultats, nosaltres mostrem que TatD s'expressa a citosol, contràriament a les prediccions *in silico* publicades on s'indica localització nuclear, no participa en la fragmentació de l'ADN ni en un model dependent de caspases ni en un model independent d'aquestes proteases. Addicionalment, la seva localització citosòlica no es veu alterada en un model de mort caspasa independent. Pel que fa al model caspasa dependent, detectem una mínima translocació nuclear de TatD sota un estímul apoptòtic, probablement insuficient perquè pugui ser rellevant ja que no observem efectes en la integritat de l'ADN.

En conclusió, tot i compartir una alta homologia de seqüència, existeixen discrepàncies en el paper apoptòtic de TatD entre les espècies descrites anteriorment i les analitzades en el present treball.

L'activitat DNasa i les propietats bioquímiques de TatD s'han descrit en diverses espècies. Concretament en *E. coli* i diversos paràsits com *Plasmodium Knowlesi*, *Trypanosoma Brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus Anthracis*. Aquesta activitat DNasa pot ser activada o inhibida pel Mg^{2+} . En *E. Coli* s'ha descrit que TatD és una exonucleasa 3'-5' dependent de Mg^{2+} que prefereix la digestió d'ADN i ARN de cadena simple²⁰⁶. Wexler et al. també demostra que la proteïna de TatD presenta activitat DNasa en presència de Mg^{2+} , però no en Ca^{2+} o Zn^{2+101} . En *Plasmodium Knowlesi* l'activitat hidrolítica de TatD també és Mg^{2+} dependent²⁰⁷. Tot i aquest resultat, un altre grup independent, Chang et al. afirmen que en el plasmodi TatD és inhibida en presència de magnesi¹⁰⁴. En l'organisme *Trypanosoma Brucei*, TatD és capaç de degradar eficientment un plasmidi d'ADN indicant que la nucleasa té activitat DNasa⁷⁵. La nucleasa TatD de *Plasmodium falciparum* és capaç d'hidrolitzar ADN de doble cadena. Contràriament a *E. Coli*, en aquest paràsit TatD és inhibida pels metalls Mg^{2+} i Ni^{2+105} . L'activitat DNasa de TatD en *Streptococcus pneumoniae* també es veu inhibida amb l'addició de Zn^{2+} i Mg^{2+} i incrementada de manera significativa per la presència de Ca^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+106} .

Els nostres resultats suggereixen que el citosol de cèl·lules de mamífer no té activitat DNasa en experiments *in vitro*, independentment de la presència de TatD. No obstant això, no podem descartar que el Mg^{2+} en el tampó de reacció tingui un efecte inhibitori en aquesta activitat. A més a més, una de les limitacions del nostre assaig és la utilització d'extractes citosòlics que, tot i estar enriquits en TatD, no assoleixen la quantitat que es va utilitzar en experiments realitzats amb proteïna recombinant. Per contra, l'extracte citosòlic s'ajusta més a la situació real de la cèl·lula. D'altra banda, la diferència en quant als efectes del magnesi en l'activitat sobre l'ADN observada en els diferents models pot suggerir que aquestes diferències i, inclús, l'activitat DNasa detectada puguin ser degudes a artefactes pel fet d'utilitzar proteïna recombinant generada en bacteris.

Així doncs, falten futurs experiments que ajudin a concretar o descartar de manera més específica els factors determinants per l'activitat DNasa de TatD en cèl·lules de mamífer.

8. TatD és prescindible per l'embriogènesi i proliferació cel·lular en el ratolí

TatD és una proteïna ubiqua amb una expressió homogènia entre els teixits analitzats, sense variacions degudes a l'edat. Per tant, no sembla que tingui una funció específica d'òrgan i de desenvolupament post-natal. L'expressió homogènia entre teixits i la seva localització citosòlica són dos trets diferencials amb les nucleases mitocondrials EndoG i ExoG.

Per tal d'investigar la funció de TatD en models de mamífer, hem generat i caracteritzat el primer ratolí nul per *Tatd*. La deleció de l'exó 3 de *Tatd* impedeix la correcta traducció de la proteïna.

La pèrdua de funció de *Tatd in vivo* en el ratolí no genera letalitat embrionària, indicant que TatD no és essencial per l'embriogènesi i viabilitat del ratolí ja sigui perquè la seva funció és prescindible en aquest estadi o per què pugui ser compensada amb l'activitat d'altres gens. La descendència obtinguda dels ratolins *Tatd*^{-/-} no presenta problemes de fertilitat, indicant que aquesta proteïna no participa en la gametogènesi. Però, en els paràsits *Plasmodium falciparum* i *Plasmodium berghei* s'ha associat TatD a la reproducció sexual d'aquests¹⁰⁵.

TatD no participa en el creixement del ratolí segons indica la manca de diferències entre el pes dels diferents òrgans analitzats. Curiosament, en un model de peix zebra, a diferència dels nostres resultats TatD, és important en el correcte desenvolupament dels ulls degut a la seva participació en la progressió del cicle cel·lular¹¹⁰.

No es coneix fins al moment si la nucleasa TatD està involucrada en el desenvolupament del cor. En el present treball, hem demostrat que la deficiència de TatD no afecta ni a la cel·lularitat ni al tamany dels cardiomiòcits, suggerint que aquesta proteïna no està relacionada en proliferació i hipertròfia. En un model *in vitro* a partir de fibroblasts de pell provinents de ratolins *Tatd*^{-/-}, amb més capacitat proliferativa que els cardiomiòcits, tampoc s'altera la seva proliferació. En consonància amb els nostres resultats, la deleció del gen de *TATD* en *S. cerevisiae* té un efecte insignificant en el creixement cel·lular⁷⁴. A més a més, Gannavaram et al. demostra que ni la depleció ni la sobreexpressió de TatD resulta en una reducció en el creixement del paràsit *Trypanosoma Brucei*⁷⁵.

9. Caracterització dels canvis transcriptòmics deguts a l'eliminació del gen *Tatd* al ratolí

L'estudi transcriptòmic de teixit cardíac de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} ens ha permès la identificació de canvis a nivell transcripcional d'una sèrie de gens. La deleció d'aquest gen produeix canvis transcripcionals relacionats amb múltiples funcions cel·lulars, entre les quals la més destacada és la senyalització i el transport de membrana. També s'han trobat variacions en gens implicats en metabolisme. Alguns gens identificats, com per exemple el gen *Lama5*, *Amy1* i *Tmprss13* estan relacionats en diferents malalties del cor i indicant així una major susceptibilitat a que pateixin malalties cardíaques sota situacions d'estrès, ja que en condicions normals aquests ratolins no presenten alteracions en el cor.

L'estudi transcriptòmic d'escorça cerebral de ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} ens ha permès la identificació diferents vies de senyalització alterades, entre les quals estan implicades en: transport de vesícules, dinàmica de microtubuls i actina i senyalització del fosfatidilinositol. Dins d'aquests grups hem trobat variacions en receptors acoblats a proteïnes G, GPCR, receptors ampliament distribuïts en el sistema nerviós central on regulen la neurotransmissió en les sinapsis, en zones pre-sinàptiques i post-sinàptiques^{208,209}. Les anormalitats en l'expressió i en l'activitat d'aquests receptors estan implicades en diversos processos neuropatològics com dolor, ansietat, depressió, neurodegeneració, neuroinflamació, etc. i poden provocar múltiples condicions neurològiques i psiquiàtriques. El gen *F2RL2* o *PAR-3* (*Coagulation Factor II Thrombin Receptor Like 2*), que codifica per un receptor acoblat a proteïna G activat pel tall de la trombina, es troba disminuït en l'array i en la qPCR. La trombina influencia el procés neurodegeneratiu després d'una isquèmia mitjançant els receptors activats per proteasa (*PAR1-4*).

També hem trobat variacions en expressió de gens que codifiquen per canals iònics, proteïnes de membrana que permeten el pas d'ions específics, modulant el potencial de membrana i la transmissió d'informació en el sistema nerviós²¹⁰. Mutacions en canals iònics s'han trobat associades a múltiples patologies com l'epilèpsia, migranya, Alzheimer, etc²¹¹. Diverses evidències sustenten la hipòtesi que una activitat anòmala de canals iònics en les membranes cel·lulars causen la síndrome de fatiga crònica²¹². Aquest fet podria estar relacionat amb el símptoma de fatiga que observem en els ratolins *Tatd*^{-/-} que discutim posteriorment.

10. Els ratolins *Tatd*^{-/-} presenten dèficits locomotors

En el present treball, en col·laboració amb el grup de Fisiopatologia i Tractament de les Malalties Neurodegeneratives dirigit pel Dr. Albert Giralt, hem dut a terme una àmplia caracterització comportamental del ratolí *Tatd*^{-/-}, amb la finalitat de detectar qualsevol efecte fenotípic causat per la deleció de *Tatd*. Hem observat que el ratolí *Tatd*^{-/-} mostra nivells normals d'ansietat, d'aprenentatge i memòria. Però l'anàlisi de l'activitat espontània i aprenentatge motor en el camp obert i en el rotarod acceleratiu, mostren que els animals *Tatd*^{-/-} es comporten de manera anormal. Els ratolins *Tatd*^{-/-} recorren menys distància en el camp obert i triguen menys temps a caure de la plataforma rotarod que els ratolins *Tatd*^{+/+}. També hem observat diferències en els ratolins *Tatd*^{+/+} i *Tatd*^{-/-} en el test de natació forçada, test que analitza la desesperació conductual. Concretament, els ratolins *Tatd*^{-/-} presenten menys mobilitat que els ratolins *Tatd*^{+/+}. Les dades suggereixen que els efectes observats no són atribuïbles a possibles conductes depressives dels ratolins, sinó que serien deguts a una major fatiga dels ratolins *Tatd*^{-/-}.

El conjunt de proves que requereixen moviment; el camp obert, rotarod acceleratiu i la natació forçada sustenten la idea que els ratolins *Tatd*^{-/-} es fatiguen més ràpidament. Aquesta fatiga no es veu acompanyada per una disminució en la força muscular en els ratolins *Tatd*^{-/-}, descartant la possibilitat que la força muscular estigués afectant l'activitat locomotora. Per tant, els nostres resultats mostren alteracions conductuals associades en la manca de TatD en un model murí. Específicament, aquesta proteïna l'hem trobat implicada en una conducta compatible amb la fatiga. Aquest símptoma es caracteritza per una baixa activitat física i té un impacte en la qualitat de vida de pacients de càncer²¹³, ictus²¹⁴, Parkinson²¹⁵, insomni i depressió²¹⁶. Malgrat estar associat a múltiples patologies freqüents, el fet de coexistir amb altres símptomes fa que sigui difícil estudiar la fatiga de manera individualitzada. Així doncs, la fatiga és l'única funció neurològica afectada en els ratolins *Tatd*^{-/-} que hem detectat fins al moment, suggerint que TatD pot ser una nova proteïna implicada en la modulació de la fatiga.

CONCLUSIONS

Primera. L'expressió d'EndoG és variable en diverses línies tumorals humanes.

Segona. La disminució d'*Endog* indueix un defecte en proliferació en les línies tumorals Ishikawa d'endometri i la línia U251 de glioblastoma.

Tercera. La disminució i deleció d'*Endog* causa una disminució en la proliferació i en el tamany de les glàndules i en el model de càncer d'endometri *Pten*^{-/-}, associada a una menor activació de la via Akt.

Quarta. L'expressió d'ExoG disminueix durant el desenvolupament en rates en tots els teixits analitzats (exceptuant el cervell), essent abundant en melsa, ronyó i cervell en el període neonatal. En canvi, l'expressió d'EndoG es manté, essent abundant en cor i fetge en el període neonatal i adult.

Cinquena. En cèl·lules del sistema nerviós, ExoG s'expressa preferencialment en neurones respecte a astroglià. En canvi, en cèl·lules del teixit cardíac té una expressió similar en cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs.

Sisena. ExoG no surt de la mitocòndria en una situació d'isquèmia experimental i en conseqüència no contribueix a la degradació de l'ADN nuclear en cardiomiòcits

Setena. El silenciament de l'expressió d'*Exog* en la línia de fibroblasts de rata Rat-2 i en glàndules d'endometri *Pten*^{-/-}, resulta en un defecte en proliferació.

Vuitena. El doble silenciament d'*Exog* i *Endog* no produeix un fenotip més sever respecte al silenciament simple d'*Exog* o *Endog* en proliferació i hipertròfia en la línia de fibroblasts de rata Rat-2 i cardiomiòcits de rata, respectivament.

Novena. TatD és una proteïna citosòlica amb una distribució homogènia entre els teixits analitzats, de la que no hem detectat activitat DNAsa i que no canvia de localització sota una isquèmia experimental.

Desena. La deleció de *Tatd* no produeix alteracions en els processos de proliferació, hipertròfia i degradació de l'ADN nuclear en cardiomiòcits.

Onzena. El ratolí *Tatd*^{-/-} és viable, però presenta alteracions motores compatibles amb fatiga.

BIBLIOGRAFIA

1. Xin, M., Olson, E. N. & Bassel-Duby, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 529–41 (2013).
2. Severs, N. J. The cardiac muscle cell. *Bioessays* **22**, 188–99 (2000).
3. Walker, C. A. & Spinale, F. G. The structure and function of the cardiac myocyte: A review of fundamental concepts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **118**, 375–382 (1999).
4. Gregorio, C. C. & Antin, P. B. To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* **10**, 355–362 (2000).
5. Golob, M., Moss, R. L. & Chesler, N. C. Cardiac Tissue Structure, Properties, and Performance: A Materials Science Perspective. *Ann. Biomed. Eng.* **42**, 2003–2013 (2014).
6. Brilla, C. G., Janicki, J. S. & Weber, K. T. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ. Res.* **69**, 107–115 (1991).
7. Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J. C. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat. Embryol. (Berl)*. **204**, 217–24 (2001).
8. Li, F. Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 1737–1746 (1996).
9. Lips, D. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur. Heart J.* **24**, 883–896 (2003).
10. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkentin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 38–48 (2013).
11. McKinsey, T. A. & Olson, E. N. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J. Clin. Invest.* **115**, 538–46 (2005).
12. TAEGTMEYER, H., GOLFMAN, L., SHARMA, S., RAZEGHI, P. & ARSDALL, M. Linking Gene Expression to Function: Metabolic Flexibility in the Normal and Diseased Heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1015**, 202–213 (2004).
13. Abel, E. D. & Doenst, T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **90**, 234–242 (2011).
14. Gertz, E. W., Wisneski, J. A., Stanley, W. C. & Neese, R. A. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J. Clin. Invest.* **82**, 2017–25 (1988).
15. Neely, J. R., Rovetto, M. J. & Oram, J. F. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **15**, 289–329 (1972).
16. SELVETELLA, G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc. Res.* **63**, 373–380 (2004).
17. Heineke, J. & Molkentin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 589–600 (2006).
18. Matsui, T. *et al.* Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 22896–22901 (2002).
19. Shioi, T. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537–2548 (2000).
20. Haq, S. *et al.* Glycogen Synthase Kinase-3 β Is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy. *J. Cell Biol.* **151**, 117–130 (2000).
21. Shiojima, I. & Walsh, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* **20**, 3347–3365 (2006).
22. Michael, A. *et al.* Glycogen Synthase Kinase-3 β Regulates Growth, Calcium Homeostasis,

- and Diastolic Function in the Heart. *J. Biol. Chem.* **279**, 21383–21393 (2004).
23. Crackower, M. A. *et al.* Regulation of Myocardial Contractility and Cell Size by Distinct PI3K-PTEN Signaling Pathways. *Cell* **110**, 737–749 (2002).
 24. Bueno, O. F. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 6341–6350 (2000).
 25. Purcell, N. H. *et al.* Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14074–9 (2007).
 26. Kehat, I. *et al.* Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ. Res.* **108**, 176–83 (2011).
 27. Kehat, I. & Molkenin, J. D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1188**, 96–102 (2010).
 28. Shai, S.-Y. *et al.* Cardiac Myocyte-Specific Excision of the β 1 Integrin Gene Results in Myocardial Fibrosis and Cardiac Failure. *Circ. Res.* **90**, 458–464 (2002).
 29. Johnston, R. K. *et al.* β 3 Integrin-mediated ubiquitination activates survival signaling during myocardial hypertrophy. *FASEB J.* **23**, 2759–2771 (2009).
 30. Sakata, Y., Hoit, B. D., Liggett, S. B., Walsh, R. A. & Dorn, G. W. Decompensation of Pressure-Overload Hypertrophy in Gq-Overexpressing Mice. *Circulation* **97**, 1488–1495 (1998).
 31. Rockman, H. A., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206–212 (2002).
 32. Wilkins, B. J. & Molkenin, J. D. Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1178–1191 (2004).
 33. Crabtree, G. R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611–4 (1999).
 34. Molkenin, J. D. *et al.* A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228 (1998).
 35. Garrington, T. P. & Johnson, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 211–8 (1999).
 36. Minamino, T. *et al.* MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3866–71 (2002).
 37. Zhang, D. *et al.* TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat. Med.* **6**, 556–63 (2000).
 38. Behr, T. M. *et al.* Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation* **104**, 1292–8 (2001).
 39. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).
 40. Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. Cell Death in Development. *Cell* **96**, 245–254 (1999).
 41. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–8 (1998).
 42. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549–56 (1999).
 43. Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179–3184 (1999).
 44. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776 (2000).

45. Eisenberg, L. M. & Markwald, R. R. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* **77**, 1–6 (1995).
46. HUANG, J.-X., POTTS, J. D., VINCENT, E. B., WEEKS, D. L. & RUNYAN, R. B. Mechanisms of Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **752**, 317–330 (1995).
47. Watanabe, M. *et al.* Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* **125**, 3809–20 (1998).
48. Watanabe, M., Jafri, A. & Fisher, S. A. Apoptosis Is Required for the Proper Formation of the Ventriculo-Arterial Connections. *Dev. Biol.* **240**, 274–288 (2001).
49. Foo, R. S. Y., Mani, K. & Kitsis, R. N. Death begets failure in the heart. *J. Clin. Invest.* **115**, 565–571 (2005).
50. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 19–44 (2010).
51. Chiong, M. *et al.* Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis.* **2**, e244 (2011).
52. Kung, G., Konstantinidis, K. & Kitsis, R. N. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circ. Res.* **108**, 1017–36 (2011).
53. Takemura, G., Kanoh, M., Minatoguchi, S. & Fujiwara, H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart - A critical review from definition and classification of cell death. *Int. J. Cardiol.* **167**, 2373–2386 (2013).
54. Okamura, T. *et al.* Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc. Res.* **45**, 642–650 (2000).
55. Zhang, J. *et al.* Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues. *FEBS Lett.* **581**, 5781–5786 (2007).
56. Bahi, N. *et al.* Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: Essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 22943–22952 (2006).
57. Walker, P. R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S. & Sikorska, M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods* **17**, 329–38 (1999).
58. Filipiski, J., Leblanc, J., Youdale, T., Sikorska, M. & Walker, P. R. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* **9**, 1319–27 (1990).
59. Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43–50 (1998).
60. Zhang, J. *et al.* Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12480–5 (1998).
61. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–9 (2001).
62. Parrish, J. Z. & Xue, D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol Cell* **11**, 987–996 (2003).
63. Cymerman, I. A., Chung, I., Beckmann, B. M., Bujnicki, J. M. & Meiss, G. EXOG, a novel paralog of Endonuclease G in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1369–79 (2008).
64. David, K. K., Sasaki, M., Yu, S.-W., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 1147–55 (2006).
65. Côté, J. & Ruiz-Carrillo, A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**, 765–9 (1993).
66. Dake, E., Hofmann, T. J., McIntire, S., Hudson, A. & Zassenhaus, H. P. Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 7691–702 (1988).

67. Vincent, R. D., Hofmann, T. J. & Zassenhaus, H. P. Sequence and expression of NUC1, the gene encoding the mitochondrial nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3297–312 (1988).
68. Cummings, O. W., King, T. C., Holden, J. A. & Low, R. L. Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 2005–15 (1987).
69. Parrish, J. *et al.* Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**, 90–4 (2001).
70. Arnoult, D. *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* **22**, 4385–99 (2003).
71. Irvine, R. A. *et al.* Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 294–302 (2005).
72. Zhang, J. *et al.* EndoG Links Bnip3-Induced Mitochondrial Damage and Caspase-Independent DNA Fragmentation in Ischemic Cardiomyocytes. *PLoS One* **6**, e17998 (2011).
73. Tann, A. W. *et al.* Apoptosis Induced by Persistent Single-strand Breaks in Mitochondrial Genome. *J. Biol. Chem.* **286**, 31975–31983 (2011).
74. Qiu, J., Yoon, J.-H. & Shen, B. Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J. Biol. Chem.* **280**, 15370–9 (2005).
75. Gannavaram, S. & Debrabant, A. Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **83**, 926–35 (2012).
76. BoseDasgupta, S. *et al.* The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA ‘degradesome’. *Cell Death Differ.* **15**, 1629–40 (2008).
77. Büttner, S. *et al.* Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell* **25**, 233–46 (2007).
78. Diener, T., Neuhaus, M., Koziel, R., Micutkova, L. & Jansen-Dürr, P. Role of endonuclease G in senescence-associated cell death of human endothelial cells. *Exp. Gerontol.* **45**, 638–644 (2010).
79. Huang, K.-J., Ku, C.-C. & Lehman, I. R. Endonuclease G: A role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8995–9000 (2006).
80. Blasco, N. *et al.* Involvement of the mitochondrial nuclease EndoG in the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species. *Redox Biol.* **37**, 101736 (2020).
81. Blasco, N. *et al.* Cardiomyocyte hypertrophy induced by Endonuclease G deficiency requires reactive oxygen radicals accumulation and is inhibitable by the micropeptide humanin. *Redox Biol.* **16**, 146–156 (2018).
82. Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L. & Olson, E. N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4070–4075 (2000).
83. Ikeda, S. & Ozaki, K. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 291–4 (1997).
84. Houmiel, K. L., Gerschenson, M. & Low, R. L. Mitochondrial endonuclease activity in the rat varies markedly among tissues in relation to the rate of tissue metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1079**, 197–202 (1991).
85. Sakaguchi, K., Harris, P. V., van Kuyk, R., Singson, A. & Boyd, J. B. A mitochondrial nuclease is modified in *Drosophila* mutants (*mus308*) that are hypersensitive to DNA crosslinking agents. *Mol. Gen. Genet. MGG* **224**, 333–340 (1990).
86. Parrish, J. Z., Yang, C., Shen, B. & Xue, D. CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1

- homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *EMBO J.* **22**, 3451–60 (2003).
87. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W. T. & Widlak, P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* **10**, 821–30 (2005).
 88. Robertson, A. B., Robertson, J., Fusser, M. & Klungland, A. Endonuclease G preferentially cleaves 5-hydroxymethylcytosine-modified DNA creating a substrate for recombination. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13280–93 (2014).
 89. Huang, K.-J., Zemelman, B. V & Lehman, I. R. Endonuclease G, a candidate human enzyme for the initiation of genomic inversion in herpes simplex type 1 virus. *J. Biol. Chem.* **277**, 21071–9 (2002).
 90. Zan, H. *et al.* Endonuclease G plays a role in immunoglobulin class switch DNA recombination by introducing double-strand breaks in switch regions. *Mol. Immunol.* **48**, 610–22 (2011).
 91. Gole, B., Baumann, C., Mian, E., Ireno, C. I. & Wiesmüller, L. Endonuclease G initiates DNA rearrangements at the MLL breakpoint cluster upon replication stress. *Oncogene* **34**, 3391–3401 (2015).
 92. Zhdanov, D. D. *et al.* Induction of Alternative Splicing and Inhibition of Activity of Telomerase Catalytic Subunit by Apoptotic Endonuclease EndoG in Human T, B, and NK Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* **164**, 478–482 (2018).
 93. Zhdanov, D. D. *et al.* Endonuclease G modulates the alternative splicing of deoxyribonuclease 1 mRNA in human CD4+ T lymphocytes and prevents the progression of apoptosis. *Biochimie* **157**, 158–176 (2019).
 94. Giralt, A. *et al.* Neurobehavioral characterization of Endonuclease G knockout mice reveals a new putative molecular player in the regulation of anxiety. *Exp. Neurol.* **247**, 122–9 (2013).
 95. Szczesny, B. *et al.* Deficiency in repair of the mitochondrial genome sensitizes proliferating myoblasts to oxidative damage. *PLoS One* **8**, e75201 (2013).
 96. Tigchelaar, W. *et al.* Loss of mitochondrial exo/endonuclease EXOG affects mitochondrial respiration and induces ROS-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **308**, C155–C163 (2015).
 97. Tigchelaar, W., De Jong, A. M., van Gilst, W. H., De Boer, R. A. & Silljé, H. H. W. In EXOG-depleted cardiomyocytes cell death is marked by a decreased mitochondrial reserve capacity of the electron transport chain. *Insid. Cell* **1**, 134–143 (2016).
 98. Wu, C.-C., Lin, J. L. J., Yang-Yen, H.-F. & Yuan, H. S. A unique exonuclease ExoG cleaves between RNA and DNA in mitochondrial DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **47**, 5405–5419 (2019).
 99. Peeva, V. *et al.* Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nat. Commun.* **9**, 1727 (2018).
 100. Duguay, B. A. & Smiley, J. R. Mitochondrial nucleases ENDOG and EXOG participate in mitochondrial DNA depletion initiated by herpes simplex virus 1 UL12.5. *J. Virol.* **87**, 11787–97 (2013).
 101. Wexler, M. *et al.* TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J. Biol. Chem.* **275**, 16717–22 (2000).
 102. Matos, C. F. R. O., Di Cola, A. & Robinson, C. TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in Escherichia coli. *EMBO Rep.* **10**, 474–9 (2009).
 103. Chen, Y.-C., Li, C.-L., Hsiao, Y.-Y., Duh, Y. & Yuan, H. S. Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10776–85 (2014).
 104. Chang, Z. *et al.* The TatD-like DNase of Plasmodium is a virulence factor and a potential

- malaria vaccine candidate. *Nat. Commun.* **7**, 11537 (2016).
105. Wang, W. *et al.* Plasmodium TatD-Like DNase Antibodies Blocked Parasite Development in the Mosquito Gut. *Front. Microbiol.* **9**, 1023 (2018).
 106. Jhelum, H., Sori, H. & Sehgal, D. A novel extracellular vesicle-associated endodeoxyribonuclease helps *Streptococcus pneumoniae* evade neutrophil extracellular traps and is required for full virulence. *Sci. Rep.* **8**, 7985 (2018).
 107. Zequn, N. *et al.* The role and potential mechanisms of LncRNA-TATDN1 on metastasis and invasion of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 18219–28 (2016).
 108. Shen, C. *et al.* LncRNA TATDN1 induces the progression of hepatocellular carcinoma via targeting miRNA-6089. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 6459–6466 (2019).
 109. Yu, X.-Y., Tian, J.-R., Yang, D. & Tan, H.-R. TATDN1 promotes the development and progression of breast cancer by targeting microRNA-140-3p. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 5293–5300 (2019).
 110. Yang, H. *et al.* The DNase domain-containing protein TATDN1 plays an important role in chromosomal segregation and cell cycle progression during zebrafish eye development. *Cell Cycle* **11**, 4626–4632 (2012).
 111. Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* **23**, 345–356 (2013).
 112. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131–134 (1995).
 113. Sherr, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551–5 (1994).
 114. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. & Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2612–24 (1995).
 115. Walker, D. H. & Maller, J. L. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* **354**, 314–7 (1991).
 116. King, R. W., Jackson, P. K. & Kirschner, M. W. Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563–571 (1994).
 117. Arellano, M. & Moreno, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 559–73 (1997).
 118. Hannon, G. J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257–61 (1994).
 119. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–7 (1993).
 120. Guan, K. L. *et al.* Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* **8**, 2939–52 (1994).
 121. Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N. & Winoto, A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2682–2688 (1995).
 122. Gu, Y., Turck, C. W. & Morgan, D. O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* **366**, 707–10 (1993).
 123. Polyak, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9–22 (1994).
 124. Lee, M. H., Reynisdóttir, I. & Massagué, J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**, 639–49 (1995).
 125. Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A. & Murray, D. New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 1–16 (2012).

126. Sebastian, B., Kakizuka, A. & Hunter, T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3521–4 (1993).
127. Rhind, N. & Russell, P. Roles of the Mitotic Inhibitors Wee1 and Mik1 in the G2 DNA Damage and Replication Checkpoints. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1499–1508 (2001).
128. Peters, J.-M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 644–656 (2006).
129. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
130. Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943–7 (1997).
131. Liaw, D. *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* **16**, 64–7 (1997).
132. Boström, J. *et al.* Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res.* **58**, 29–33 (1998).
133. Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 283–296 (2012).
134. Guillermet-Guibert, J. *et al.* The p110 isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 8292–8297 (2008).
135. Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* **370**, 527–532 (1994).
136. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489–501 (2002).
137. Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13375–8 (1998).
138. Stambolic, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29–39 (1998).
139. Sun, H. *et al.* PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6199–204 (1999).
140. Shi, X. *et al.* Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* (2019). doi:10.3892/mmr.2019.10121
141. Murali, R., Soslow, R. A. & Weigelt, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol.* **15**, e268–e278 (2014).
142. Rose, P. G. Endometrial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **335**, 640–649 (1996).
143. Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **15**, 10–17 (1983).
144. Matias-Guiu, X. & Prat, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* **62**, 111–123 (2013).
145. Salvesen, H. B., Haldorsen, I. S. & Trovik, J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol.* **13**, e353–e361 (2012).
146. Paez, J. & Sellers, W. R. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat. Res.* **115**, 145–67 (2003).
147. Hayes, M. P. *et al.* PIK3CA and PTEN Mutations in Uterine Endometrioid Carcinoma and

- Complex Atypical Hyperplasia. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5932–5935 (2006).
148. Mutter, G. L. *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 924–30 (2000).
 149. Podsypanina, K. *et al.* Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1563–8 (1999).
 150. Stambolic, V. *et al.* High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice. *Cancer Res.* **60**, 3605–11 (2000).
 151. Cheung, L. W. T. *et al.* High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov.* **1**, 170–85 (2011).
 152. Samuels, Y. *et al.* High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science (80-.)*. **304**, 554–554 (2004).
 153. Urick, M. E. *et al.* PIK3R1 (p85 α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res.* **71**, 4061–7 (2011).
 154. Lax, S. F., Kendall, B., Tashiro, H., Slebos, R. J. & Hedrick, L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* **88**, 814–24 (2000).
 155. Cristofano, A. D., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* **19**, 348–355 (1998).
 156. Suzuki, A. *et al.* High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.* **8**, 1169–1178 (1998).
 157. Lesche, R. *et al.* Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* **32**, 148–9 (2002).
 158. Knobbe, C. B., Lapin, V., Suzuki, A. & Mak, T. W. The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene* **27**, 5398–415 (2008).
 159. Suzuki, A., Nakano, T., Mak, T. W. & Sasaki, T. Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci.* **99**, 209–13 (2008).
 160. Korpershoek, E. *et al.* Conditional *Pten* knock-out mice: a model for metastatic pheochromocytoma. *J. Pathol.* **217**, 597–604 (2009).
 161. Li, G. *et al.* Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development* **129**, 4159–70 (2002).
 162. Yeager, N., Klein-Szanto, A., Kimura, S. & Di Cristofano, A. Pten loss in the mouse thyroid causes goiter and follicular adenomas: insights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis. *Cancer Res.* **67**, 959–66 (2007).
 163. Wang, S. *et al.* Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* **4**, 209–21 (2003).
 164. Ma, X. *et al.* Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res.* **65**, 5730–9 (2005).
 165. Fraser, M. M. *et al.* Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res.* **64**, 7773–9 (2004).
 166. Horie, Y. *et al.* Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest.* **113**, 1774–1783 (2004).
 167. Feil, R. *et al.* Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10887–10890 (1996).
 168. Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. & Chambon, P. Conditional site-specific recombination in

- mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6991–5 (1995).
169. Lu, T.-L., Chang, J.-L., Liang, C.-C., You, L.-R. & Chen, C.-M. Tumor spectrum, tumor latency and tumor incidence of the Pten-deficient mice. *PLoS One* **2**, e1237 (2007).
 170. Daikoku, T. *et al.* Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res.* **68**, 5619–27 (2008).
 171. Mirantes, C. *et al.* An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Dis. Model. Mech.* **6**, 710–720 (2013).
 172. McDermott-Roe, C. *et al.* Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* **478**, 114–118 (2011).
 173. Parrish, J. Z. & Xue, D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol. Cell* **11**, 987–96 (2003).
 174. Shin, C. H. *et al.* Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell* **110**, 725–35 (2002).
 175. Tamura, T., Onodera, T., Said, S. & Gerdes, A. M. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2175–81 (1998).
 176. Tigchelaar, W. *et al.* Loss of mitochondrial exo/endonuclease EXOG affects mitochondrial respiration and induces ROS-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **308**, C155–C163 (2015).
 177. Devireddy, L. R., Gazin, C., Zhu, X. & Green, M. R. A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell* **123**, 1293–1305 (2005).
 178. Zhang, R. *et al.* Whole-Exome Sequencing in Nine Monozygotic Discordant Twins. *Twin Res. Hum. Genet.* **19**, 2015 (2020).
 179. Lama5 - laminin, alpha 5 | International Mouse Phenotyping Consortium. Available at: <https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:105382>. (Accessed: 4th October 2020)
 180. Marquina, C. *et al.* Increased Inflammation and Cardiometabolic Risk in Individuals with Low AMY1 Copy Numbers. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
 181. Henrich-Noack, P., Riek-Burchardt, M., Baldauf, K., Reiser, G. & Reymann, K. G. Focal ischemia induces expression of protease-activated receptor1 (PAR1) and PAR3 on microglia and enhances PAR4 labeling in the penumbra. *Brain Res.* **1070**, 232–241 (2006).
 182. Seigneur, E., Polepalli, J. S. & Südhof, T. C. Cbln2 and Cbln4 are expressed in distinct medial habenula-interpeduncular projections and contribute to different behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E10235–E10244 (2018).
 183. Mao, X. *et al.* Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* **353**, (2016).
 184. Gerschenson, M., Houmiel, K. L. & Low, R. L. Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **23**, 88–97 (1995).
 185. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
 186. Basnakian, A. G. *et al.* Endonuclease G promotes cell death of non-invasive human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 4139–4149 (2006).
 187. Yoo, N. J. *et al.* Increased Expression of Endonuclease G in Gastric and Colorectal Carcinomas. *Tumori J.* **94**, 351–355 (2008).
 188. ROSEN, I. Anaplastic Carcinoma of the Thyroid Gland. in *Textbook of Endocrine Surgery* 159–167 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/B978-0-7216-0139-7.50022-3
 189. Nikiforov, Y. E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod. Pathol.*

- 21, S37–S43 (2008).
190. GLASSMANN, A., WINTER, J., KRAUS, D., VEIT, N. & PROBSTMEIER, R. Pharmacological suppression of the Ras/MAPK pathway in thyroid carcinoma cells can provoke opposite effects on cell migration and proliferation: The appearance of yin-yang effects and the need of combinatorial treatments. *Int. J. Oncol.* **45**, 2587–2595 (2014).
 191. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 192. O'CONNELL, J. *et al.* Altered Mechanisms of Apoptosis in Colon Cancer: Fas Resistance and Counterattack in the Tumor-Immune Conflict. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **910**, 178–195 (2006).
 193. Haas-Kogan, D. *et al.* Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr. Biol.* **8**, 1195–S1 (1998).
 194. Levine, D. A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**, 67–73 (2013).
 195. Eritja, N. *et al.* A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* **176**, 2722–31 (2010).
 196. Eritja, N., Dolcet, X. & Matias-Guiu, X. Three-dimensional epithelial cultures: a tool to model cancer development and progression. *Histol. Histopathol.* **28**, 1245–56 (2013).
 197. Mishra, P. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 634–46 (2014).
 198. Skog, S., Tribukait, B. & Sundius, G. Energy metabolism and ATP turnover time during the cell cycle of Ehrlich ascites tumour cells. *Exp. Cell Res.* **141**, 23–29 (1982).
 199. Côté, J., Renaud, J. & Ruiz-Carrillo, A. Recognition of (dG)n.(dC)n sequences by endonuclease G. Characterization of the calf thymus nuclease. *J. Biol. Chem.* **264**, 3301–10 (1989).
 200. Ruiz-Carrillo, A. & Renaud, J. Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.* **6**, 401–7 (1987).
 201. Svilar, D., Goellner, E. M., Almeida, K. H. & Sobol, R. W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 2491–507 (2011).
 202. Kieper, J. *et al.* Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. *Protein Expr. Purif.* **73**, 99–106 (2010).
 203. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
 204. Lorell, B. H. & Carabello, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* **102**, 470–9 (2000).
 205. Tigchelaar, W. *et al.* Loss of mitochondrial exo/endonuclease EXOG affects mitochondrial respiration and induces ROS-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **308**, C155–C163 (2015).
 206. Chen, Y.-C., Li, C.-L., Hsiao, Y.-Y., Duh, Y. & Yuan, H. S. Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10776–85 (2014).
 207. Zhou, Y. *et al.* Expression and functional analysis of the TatD-like DNase of *Plasmodium knowlesi*. *Parasit. Vectors* **11**, 629 (2018).
 208. Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. DESENSITIZATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS AND NEURONAL FUNCTIONS. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 107–144 (2004).
 209. Huang, Y. & Thathiah, A. Regulation of neuronal communication by G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **589**, 1607–1619 (2015).

210. Moreau, C. J., Dupuis, J. P., Revilloud, J., Arumugam, K. & Vivaudou, M. Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 620–625 (2008).
211. Dworakowska, B. & Dołowy, K. Ion channels-related diseases. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 685–703 (2000).
212. Chaudhuri, A., Watson, W. S., Pearn, J. & Behan, P. O. The symptoms of chronic fatigue syndrome are related to abnormal ion channel function. *Med. Hypotheses* **54**, 59–63 (2000).
213. Saligan, L. N. *et al.* The biology of cancer-related fatigue: a review of the literature. *Support. Care Cancer* **23**, 2461–2478 (2015).
214. De Doncker, W., Dantzer, R., Ormstad, H. & Kuppuswamy, A. Mechanisms of poststroke fatigue. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **89**, 287–293 (2018).
215. Stocchi, F. *et al.* Prevalence of fatigue in Parkinson disease and its clinical correlates. *Neurology* **83**, 215–220 (2014).
216. Donovan, K. A. & Jacobsen, P. B. Fatigue, Depression, and Insomnia: Evidence for a Symptom Cluster in Cancer. *Semin. Oncol. Nurs.* **23**, 127–135 (2007).