

## 7 Sumario

El síndrome de Opitz BBB/G (OS) es un desorden congénito que se caracteriza por anomalías de la línea media ventral del cuerpo y que presenta como manifestaciones más prominentes hipertelorismo e hipospadias. OS es una enfermedad genéticamente heterogénea para la que existen dos loci, uno autosomal y otro ligado al cromosoma X. El gen causante de la herencia de carácter autosómico aún no ha sido identificado. Por otro lado, se ha demostrado que la herencia ligada al cromosoma X se debe a mutaciones en el gen *MID1*, que se presenta con mutaciones en aproximadamente un 68% de los pacientes con OS ligado al cromosoma X. La mayoría de las mutaciones identificadas en pacientes con OS, están situadas en el extremo 3' de la región codificante de *MID1* y por lo tanto afectan al extremo carboxilo de la proteína *MID1*.

La proteína *MID1* pertenece a la subfamilia RFP de la familia RBCC de proteínas. En la parte amino-terminal, *MID1* comprende un RING-Finger, dos Bboxes (Bbox1 y Bbox2) y un dominio "Coiled-coil" (dominio RBCC), seguidos de los dominios FNIII y B30.2 en el extremo carboxilo de la proteína. *MID1* tiene la capacidad de formar grandes complejos macromoleculares, cuyos componentes eran hasta ahora desconocidos. Como otras proteínas de la familia RBCC, *MID1* tiene varios dominios que participan en interacciones entre proteínas. Recientemente demostramos en nuestro laboratorio que *MID1*, asociada a través de su extremo carboxilo con los microtúbulos, interacciona con  $\alpha 4$  ( $\alpha 4$ ), una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), por medio de Bbox1. De este modo, *MID1* es capaz de ubiquitinar la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac), que en consecuencia, será degradada por el proteasoma. Las mutaciones en el extremo carboxilo de *MID1* hacen que ésta pierda su asociación con los microtúbulos y se formen agregados en el citoplasma de la célula. A pesar de seguir unida a  $\alpha 4$ , *MID1* ya no puede acercarse a PP2Ac y ubiquitinarla, por lo tanto PP2Ac se acumula en los microtúbulos, lo que provoca la hipofosforilación de proteínas que de ella dependen.

Durante esta tesis, la base experimental para el estudio de las funciones básicas de Bbox1 y Bbox2 en lo concerniente a la interacción de *MID1* con los microtúbulos y con  $\alpha 4$  fueron experimentos tales como inmunofluorescencias, inmunoprecipitaciones y "yeast two-hybrid system". De esta manera y por primera vez se pudo describir un nuevo mecanismo patológico para *MID1* con mutaciones en uno de los Bboxes en lugar de en el extremo carboxilo. Concretamente, los resultados de esta tesis demostraron que sólo Bbox1 interviene directamente en la interacción de *MID1* con  $\alpha 4$  y que Bbox2 tiene un papel regulador en la interacción entre *MID1* y  $\alpha 4$  y la de *MID1* con los microtúbulos

El principal objetivo de esta tesis fue identificar el complejo multiproteico formado por MID1 usando técnicas como cromatografía de afinidad y espectrometría de masas. Además de la ya demostrada interacción de MID1 con tubulina, en el complejo se identificaron varias proteínas pertenecientes a la subunidad pequeña del ribosoma (S3, S8 y p40) en conjunto con diversas proteínas multifuncionales, tales como NPM, RACK1 y ANXA2, que se han visto anteriormente asociadas con ARN y ribosomas. También fueron encontradas en el complejo varias proteínas de choque térmico, tales como Hsp60, Hsc70 y las chaperonas multifuncionales Hsp90 y p32, fueron encontradas en el complejo.

El complejo multiproteico formado por MID1 se estudió en detalle y se encontró que, junto con  $\alpha 4$  (una proteína diana de mTOR), MID1 forma un complejo ribonucleoproteico que se encuentra asociado con los microtúbulos y contiene polisomas y RNA y por lo tanto, sirve de vínculo entre la vía de mTOR (reguladora de la traducción de proteínas) y una nueva unidad de traducción situada en los microtúbulos. Probablemente, este complejo participa en el transporte de ARN mensajero (ARNm) a los polos de la célula y de ese modo proporciona la requerida asimetría en la distribución ARNm y en la producción de proteínas. Para que células de la cresta neural migren y células polarizadas entren en transición epitelial-mesenquimal, procesos esenciales durante el desarrollo de la línea ventral media, es necesario que la producción de proteínas se distribuya en compartimentos diferentes. Por consiguiente, los resultados de esta tesis sugieren una base molecular para el desarrollo de la línea media y para la patogénesis de OS.

Asimismo, se demostró que el complejo multiproteico de MID1/ $\alpha 4$  integra ARNm pertenecientes a efrinas y sus receptores a través de estructuras en forma de "G-quartets" que se ubican en sus 3'UTRs. Las efrinas y sus receptores participan en la regulación de procesos fundamentales durante el desarrollo de la línea ventral media, tales como adhesión y migración celular y desarrollo embrionario. Así pues, esta tesis plantea un papel central para el complejo multiproteico MID1/ $\alpha 4$  en la distribución de la traducción de efrinas y sus receptores en la célula a través del transporte de sus ARNm por los microtúbulos. Se debe hacer hincapié en la interacción que el complejo de MID1 presenta con la efrina-B1 (EFNB1), ya que mutaciones en este gen causan displasia craneofrontonasal, un desorden monogénico cuyos pacientes presentan un fenotipo altamente similar al de los pacientes con OS. Por lo tanto, el modelo que en esta tesis se propone, también proporciona una explicación muy atractiva para el llamativo solapamiento entre los fenotipos de pacientes con OS y displasia craneofrontonasal.