



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

# **Rol de DISC1 en la Homeostasis de la Síntesis de Proteínas Durante el Estrés Celular**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**FRANCISCO FABIÁN FUENTES VILLALOBOS**

**CONCEPCIÓN - CHILE**

**2018**

Profesor Guía: Dr. Ariel Fernando Castro Alma

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Ariel Castro Alma  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Leonardo Gutiérrez Contreras  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr. Jorge Fuentealba Arcos  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Marcelo López-Lastra  
Profesor Evaluador Externo  
Pontificia Universidad Católica de Chile

---

Dr. Francisco Nualart Santander.  
Director (S)  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas.  
Área Biología Celular y Molecular

## RESUMEN

Diversos contextos adversos inducen una respuesta celular muy conservada para “refinar” el subconjunto particular de proteínas que se sintetizan y la concentración de cada una de ellas en particular. Akt-mTORC1 es una vía conservada en eucariotas que estimula el metabolismo anabólico, incluyendo a la traducción. Diferentes proteínas inhiben su activación según el contexto nutricional. Se han descubierto nuevos mecanismos para controlar esta vía. DISC1, una proteína que ha sido estudiada como factor de riesgo para adquirir esquizofrenia, inhibe la activación de Akt-mTORC1 durante la diferenciación de neuronas hipocampales.

En este trabajo, describimos un nuevo rol para DISC1, participando en la regulación de la traducción durante condiciones estresantes. A través del marcaje de proteínas durante su elongación con puromicina, hemos descubierto que DISC1 participa en la mantención de los niveles de traducción durante el estrés oxidativo. Encontramos también que DISC1 participa en la protección de las células durante el estrés oxidativo y también durante la sobre-estimulación de la formación de gránulos de estrés (SGs). Usando microscopía confocal y de súper-resolución, encontramos que DISC1 tiene un efecto en la formación de SGs y que además reside fuera de estas estructuras. Siendo eIF3 un marcador estándar de SGs y un componente crítico de la maquinaria de inicio de la traducción, su interacción con DISC1 durante condiciones de estrés oxidativo podría ser una consecuencia de un mecanismo regulatorio de la traducción en que DISC1 tome parte. La función de DISC1 en la regulación de los niveles de traducción podría corresponder a uno de los mecanismos alterados en pacientes esquizofrénicos y su estudio ayudaría a conocer las causas de esta compleja enfermedad y los mecanismos que podrían ayudar a superar las alteraciones presentes en algunas enfermedades neurodegenerativas. Nuestros experimentos sugieren que los mecanismos en que DISC1 interviene permitiendo mantener ciertos niveles de traducción durante el estrés podrían ser relevantes para mediar la viabilidad de células altamente proliferativas, como aquellas con una hiper-activación de mTORC1.

## SUMMARY

Diverse adverse contexts induce a very conserved cell response to “fine-tune” the particular protein sub-set being synthesized and the concentration of each protein in particular. Akt-mTORC1 is a conserved pathway in eukaryotes which triggers anabolic metabolism, including translation. Different proteins inhibit its activation according to the nutritional context. New mechanisms are still being discovered to control this pathway. DISC1, a protein which has been studied as a risk factor to acquire schizophrenia, inhibits Akt-mTORC1 activation during differentiation of hippocampal neurons.

In this work, we describe a new role of DISC1, participating in the regulation of translation during stressful conditions. Through the labeling of proteins during their elongation with puromycin, we have discovered that DISC1 participates in the maintenance of translation after oxidative stress. We also found that DISC1 participates in the protection of cells after oxidative stress and after the over-stimulation of stress granule-formation. Stress granules (SGs) hold translationally silent mRNAs during stress, and their out-of-context occurrence is believed to play a role in the predisposition to suffer neurodegenerative diseases like amyotrophic lateral sclerosis. Using confocal and super-resolution microscopy, we found that DISC1 has an effect over SG formation and also, that DISC1 resides outside those structures. Being eIF3 a SG marker and a critical component of translation initiation machinery, its interaction with DISC1 during oxidative stress could be a consequence of a regulatory mechanism of translation in which DISC1 takes part. DISC1 function in the regulation of translation levels could represent one of the altered mechanisms in schizophrenic patients, and its study would help to know the causes of this complex disease and mechanisms that could help to overcome alterations present in some neurodegenerative diseases. Our experiments suggest that the mechanisms in which DISC1 engages into, by allowing to hold certain translation levels during stress would be relevant to mediate viability of proliferative cells, as those with mTORC1 hyper-activation.



## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	(iii)
SUMMARY .....	(iv)
INDICE DE FIGURAS .....	(viii)
INDICE DE TABLAS .....	(x)
ABREVIATURAS .....	(xi)

I. INTRODUCCIÓN.....	(1)
DISC1 Y MUTACIONES.....	(1)
INTERACCIONES Y FUNCIONES CONOCIDAS DE DISC1.....	(6)
INTERACCIONES DE DISC1 RELACIONADAS CON TRADUCCION.....	(12)
REGULACIÓN DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN.....	(17)
COMPARTIMENTALIZACIÓN DE ARNm TRADUCCIONALMENTE INACTIVOS.....	(21)
INTERACCIÓN DE eIF3h CON DISC1 Y LOS GRÁNULOS DE ESTRÉS.....	(27)

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	(28-30)
---	---------

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	(31)
<b>MATERIALES</b> .....	(31)
PLÁSMIDOS.....	(31)
ANTICUERPOS.....	(33)
<b>MÉTODOS DE LABORATORIO</b> .....	(35)
CULTIVO CELULAR.....	(35)
TRANSFECCIÓN TRANSCIENTE DE CÉLULAS HEK 293.....	(36)
TRANSDUCCIÓN DE SHRNA EN MEF <i>Tsc2</i> -/-.....	(37)
ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS MEF <i>Tsc2</i> -/-.....	(38)
INDUCCIÓN DE ESTRÉS METABÓLICO, GENOTÓXICO Y OXIDATIVO.....	(38)
INMUNOCITOQUIMICA.....	(39)
INMUNODETECCION DE PROTEINAS.....	(40)
INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE SU SÍNTESIS.....	(41)
CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.....	(42)
CONSTRUCCIÓN DE ADN Y DIGESTIÓN PREPARATIVA.....	(43)
TRANSFORMACIÓN BACTERIAS COMPETENTES.....	(44)
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA.....	(44)
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A MEDIANA ESCALA.....	(45)
ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA.....	(46)
GENERACIÓN DE SILENCIAMIENTO Y K/O MEDIANTE CRISPR/CAS9.....	(46)
ENSAYO DE VIABILIDAD USANDO TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.....	(47)
ENSAYO DE VIABILIDAD USANDO XTT.....	(47)

#### **IV. RESULTADOS (48)**

<b>OBJETIVO 1:</b> Determinar si DISC1 participa en la regulación de la síntesis de proteínas.....	(48)
<b>OBJETIVO 2:</b> Determinar el rol de DISC1 en la formación de gránulos de estrés y la síntesis de proteínas.....	(60)
<b>OBJETIVO 3:</b> Caracterizar la interacción de DISC1 con componentes de la maquinaria traduccional.....	(67)
<b>OBJETIVO 4:</b> Determinar si DISC1 ejerce un rol cito-protector durante el estrés.....	(78)

<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>(87-93)</b>
<b>VI. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>(94-95)</b>
<b>VII. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>(96)</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>(97)</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura del transcrito primario de DISC1.....	(2)
<b>Figura 2:</b> Hipótesis “Two Hit” del desarrollo de esquizofrenia.....	(4)
<b>Figura 3:</b> Algunos interactores de DISC1.....	(5)
<b>Figura 4:</b> Regulación de la vía Akt-mTORC1 por DISC1 y sus efectos en la diferenciación neuronal hipocampal.....	(8)
<b>Figura 5:</b> Activación canónica de la vía Akt-mTORC1.....	(10)
<b>Figura 6:</b> DISC1 interactúa con diversos ARNm y permite el transporte de <i>ITPR1</i> a través de su región 3'UTR.....	(13)
<b>Figura 7:</b> Ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la traducción canónico y posterior <i>scanning</i> del ARNm.....	(14)
<b>Figura 8:</b> Representación a escala de la secuencia de aminoácidos de DISC1, separando la codificada por cada exón.....	(16)
<b>Figura 9:</b> Esquema simplificado de las etapas de la traducción de ARNm.....	(18)
<b>Figura 10:</b> Composición de un gránulo de estrés.....	(23)
<b>Figura 11:</b> Regulación del ensamblaje de Gránulos de estrés dependiente de G3BP1....	(26)

<b>Figura 12:</b> La inmunodetección de la incorporación de puromicina en las proteínas es sensible a cambios en los niveles de traducción.....	(51)
<b>Figura 13:</b> DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante diferentes contextos celulares.....	(52)
<b>Figura 14:</b> DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante el tratamiento con arsenito de sodio.....	(53, 54)
<b>Figura 15:</b> DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante el tratamiento con arsenito de sodio al analizarse usando CRISPR/Cas9.....	(55)
<b>Figura 16:</b> Los niveles de expresión de la proteína DISC1 no varían durante el estrés genotóxico ni oxidativo.....	(58)
<b>Figura 17:</b> La estabilidad de la proteína DISC1 no varía ante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio.....	(59)
<b>Figura 18:</b> DISC1 es necesario para disminuir el número de gránulos de estrés inducidos por arsenito de sodio.....	(61, 62)
<b>Figura 19:</b> DISC1 es necesario para disminuir el número de gránulos de estrés inducidos por arsenito de sodio al analizarse usando CRISPR/Cas9.....	(63)
<b>Figura 20:</b> La mantención de la traducción dependiente de DISC1 ocurriría de forma independiente a la dinámica de ensamblaje de SGs.....	(65, 66)
<b>Figura 21:</b> DISC1 interactúa con las proteínas en proceso de síntesis.....	(68)
<b>Figura 22:</b> eIF3h interactúa con DISC1 y G3BP1 durante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio en células HEK293.....	(69)
<b>Figura 23:</b> DISC1 no es incorporado preferencialmente en gránulos de estrés.....	(71-73)
<b>Figura 24:</b> DISC1 reside fuera de los gránulos de estrés.....	(74, 75)
<b>Figura 25:</b> DISC1 no es incorporado preferencialmente en cuerpos de procesamiento (PBs).....	(76)

**Figura 26:** DISC1 es necesario para promover la viabilidad celular ante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio. ....(79)

**Figura 27:** DISC1 es necesario la viabilidad celular tras la inducción crónica de gránulos de estrés.....(81)

**Figura 28:** La sobre-expresión de DISC1 es citotóxica.....(83)

**Figura 29:** La sobre-expresión de DISC1 disminuye la viabilidad celular tras la inducción crónica de gránulos de estrés.....(85-86)

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1:** Anticuerpos utilizados.....(34)



## ABREVIATURAS:

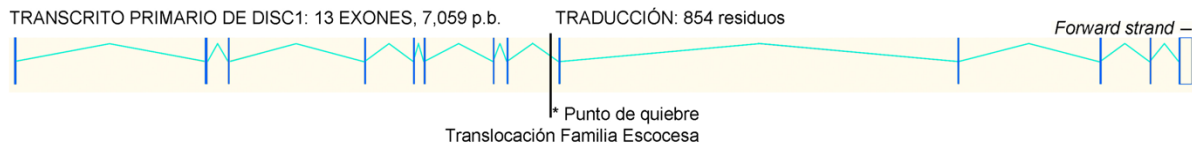
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BSA:</b>	"Bovine serum albumin"
<b>CRISPR:</b>	"Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"
<b>DMEM:</b>	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT:</b>	"Dithiothreitol"
<b>FBS:</b>	"Fetal Bovine Serum"
<b>GFP:</b>	"Green Fluorescent Protein"
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G
<b>MEF:</b>	"Mouse Embryonic Fibroblast"
<b>NaCl:</b>	"Sodium Chloride"
<b>NP-40:</b>	"Nonyl phenoxypolyethoxylethanol"
<b>PIC:</b>	"Preinitiation Complex"
<b>Puro.:</b>	Puromicina
<b>PBS:</b>	"Phosphate-Buffered Saline"
<b>RFP:</b>	"Red Fluorescent Protein"
<b>SDS-PAGE:</b>	"Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"
<b>SDS:</b>	"Sodium Dodecyl Sulfate"
<b>shRNA:</b>	"Short Hairpin ARN"
<b>TAE:</b>	"Tris base, Acetic acid and EDTA"
<b>TBS:</b>	"Tris-buffered saline"
<b>TE:</b>	"Tris + EDTA"
<b>Tris-HCl:</b>	"Tris base + hydrochloric acid"
<b>WT:</b>	"Wild Type"

## I. INTRODUCCIÓN

### DISC1 Y MUTACIONES

*Disrupted In Schizophrenia 1* (DISC1) es una proteína estudiada como un factor de riesgo para padecer esquizofrenia y una amplia variedad de enfermedades psiquiátricas. El punto de quiebre de la translocación cromosomal balanceada t(1;11)(q42.1;q14.3) encontrada en una familia escocesa, ocurre en medio del gen codificante para DISC1 (ver figura 1). Esta translocación es heredada junto a una predisposición de padecer esquizofrenia, desorden bipolar, depresión mayor, entre otras condiciones psiquiátricas (Millar et al. 2000, Thomson et al. 2013). Una predisposición similar fue encontrada también en una familia norteamericana (Sachs et al. 2005), pero asociada a la herencia de una mutación que cambia el marco de lectura de DISC1. Diversas características conductuales, neuro-estructurales y neuroquímicas comunes en pacientes con esquizofrenia también han sido halladas en ratones que poseen diferentes alteraciones en la expresión de Disc1 (mutaciones Q31L, L100P, silenciamiento, sobre-expresión de dominantes negativas. T.V. Lipina et al. 2013, T. V. Lipina et al. 2010, Arime et al. 2014, Dahoun et al. 2017). Desde estos hallazgos DISC1 ha sido foco de estudio para comprender su función fisiológica, y con ello, intentar revelar el mecanismo molecular alterado en esquizofrenia y otras enfermedades mentales.





**Figura 1: Estructura del transcrito primario de DISC1.** La figura representa el orden y posición relativa de los exones codificantes para la isoforma DISC1 Lv. Los recuadros azules representan los exones, mientras que las líneas celestes que los unen representan los intrones de este transcrito. Fuente: Elaboración propia.

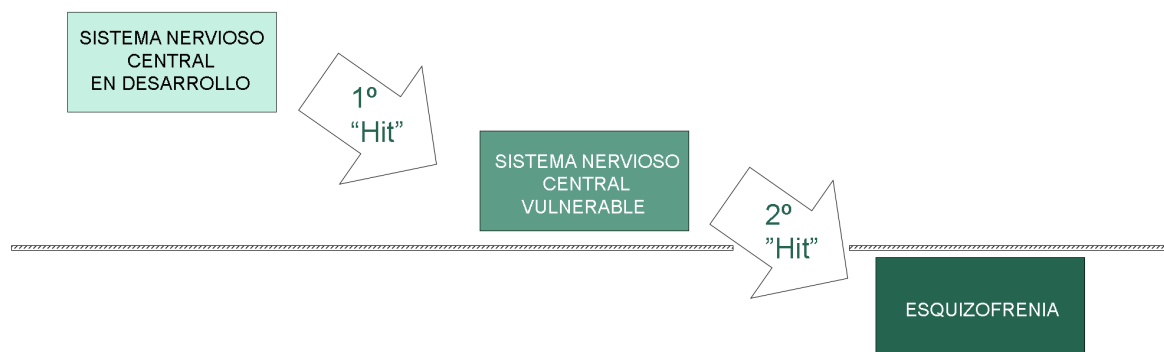
Si bien el mecanismo del desarrollo de la esquizofrenia en pacientes aún dista mucho de conocerse por completo, y se acepta como una enfermedad multifactorial (Uher y Zwicker 2017), sí existe un consenso en cuanto a las funciones cerebrales normales que son alteradas en los pacientes. Entre ellas destaca la plasticidad neuronal (Gururajan y Van Den Buuse 2014), característica clave que permite el dinamismo de las conexiones del sistema nervioso central, clave para el funcionamiento cerebral, con repercusiones en casi cualquier aspecto de la vida de un ser humano, considerando aspectos motores y cognitivos.

Diferentes hipótesis relativas a las causas de esta enfermedad han sido postuladas conforme a los hallazgos que se han encontrado. La hipótesis que permite explicar a grandes rasgos el desarrollo de la enfermedad se denomina “Two-hit”, en la cual se postula que el sistema nervioso central de los pacientes adquiere cierta susceptibilidad a desarrollar la enfermedad durante el desarrollo, un primer evento. Esta susceptibilidad hoy en día se postula como una consecuencia de una conectividad sináptica deficiente (ver figura 2). Posteriormente, un segundo evento, un factor medioambiental, sería el responsable de desencadenar la enfermedad en cercanías de la madurez en dichas personas susceptibles (Gururajan and Van Den Buuse 2014).

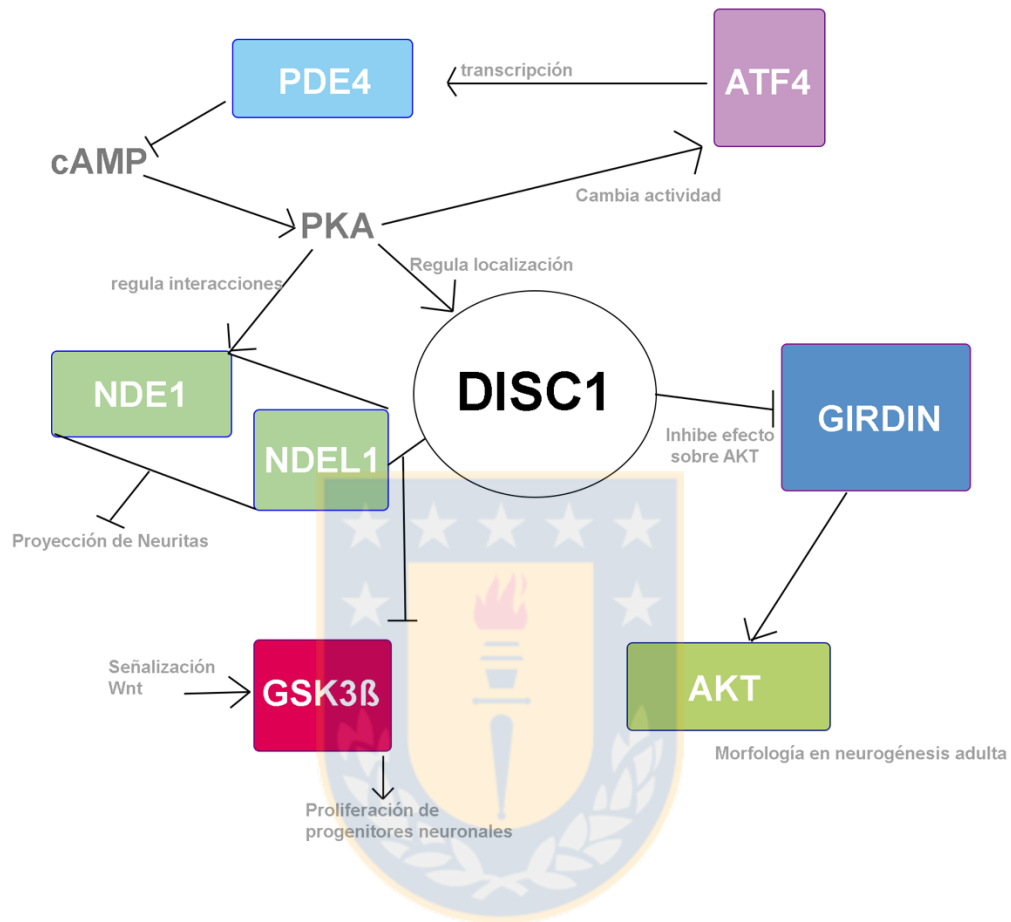
Posteriormente ha tomado relevancia la “hipótesis de la dopamina”, la cual complementa molecularmente a la hipótesis “Two-Hit”. Esta hipótesis se sustenta en que la afinidad de los fármacos antipsicóticos por los receptores de este neurotransmisor se relaciona fuertemente con sus potenciales clínicos, y a que niveles incrementados de dopamina inducen síntomas psicóticos en personas saludables (Berman et al. 2009).

Gran parte de la investigación en torno a las funciones de DISC1 se han centrado en su posible rol en esquizofrenia. En el marco del desarrollo neuronal, fenómeno en donde ocurriría el primer evento que predispondría a la esquizofrenia, DISC1 juega un rol en procesos claves, como la proliferación y migración (Bradshaw and Porteous 2012)(Ishizuka et al. 2011). A pesar de que el conocimiento de las funciones moleculares que sustenten estas funciones de DISC1 es limitado, se ha encontrado interaccionando a DISC1 con múltiples proteínas propias del centrosoma, sinapsis y pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelulares como Akt-mTORC1 (Akt/PKB, Protein Kinase B; mTORC1, *mammalian Target Of Rapamycin - Complex 1*) (Wu, Li, y Xiao 2013, Kamiya et al. 2008, Bradshaw et al. 2008, Enomoto et al. 2009, Kim et al. 2011, D. Porteous y Millar 2009), ver figura 3.

La compleja red de interactores de DISC1 dificulta el esclarecimiento de un mecanismo molecular único que explique cómo alteraciones en DISC1 puedan predisponer al padecimiento de estas enfermedades, pero respalda una causa multifactorial para el desarrollo de ellas. Profundizar en la función normal de DISC1 permitiría obtener valiosa información sobre los fenómenos celulares alterados en esquizofrenia, que a pesar de no ser exclusivos de DISC1, sí puedan explicar cómo una persona adquiere esta enfermedad conforme pasan los años.



**Figura 2: Hipótesis “Two Hit” del desarrollo de esquizofrenia.** Esta hipótesis sostiene que el padecimiento de la enfermedad se debe a una serie de eventos que predisponen a un individuo a desarrollar esquizofrenia en etapas posteriores. El primer evento correspondería a alteraciones durante el desarrollo del sistema nervioso, las cuales pueden tener una causa genética o epigenética. Hoy en día se ha propuesto que una de estas alteraciones puede ser un descontrol sobre la actividad de mTOR, el que conlleve a alteraciones en la síntesis de proteínas y con ello a una morfología y conectividad neuronales anormales, afectando así a la plasticidad neuronal. Un segundo evento es requerido según esta hipótesis, debido a factores ambientales que en una persona sin un sistema nervioso susceptible no conllevarían al padecimiento de la enfermedad. En cambio, en una persona con deterioro en su plasticidad neuronal este segundo evento sí podría conllevar a las alteraciones cognitivas propias de la esquizofrenia y enfermedades relacionadas. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3: Algunos interactores de DISC1.** DISC1, como proteína de andamiaje, presenta muchos interactores. Entre ellos también existen relaciones directas e indirectas, las que permiten regular diversos aspectos de una célula neuronal como la proliferación de sus progenitores y diferenciación. Modificado desde (Yerabham et al. 2013).

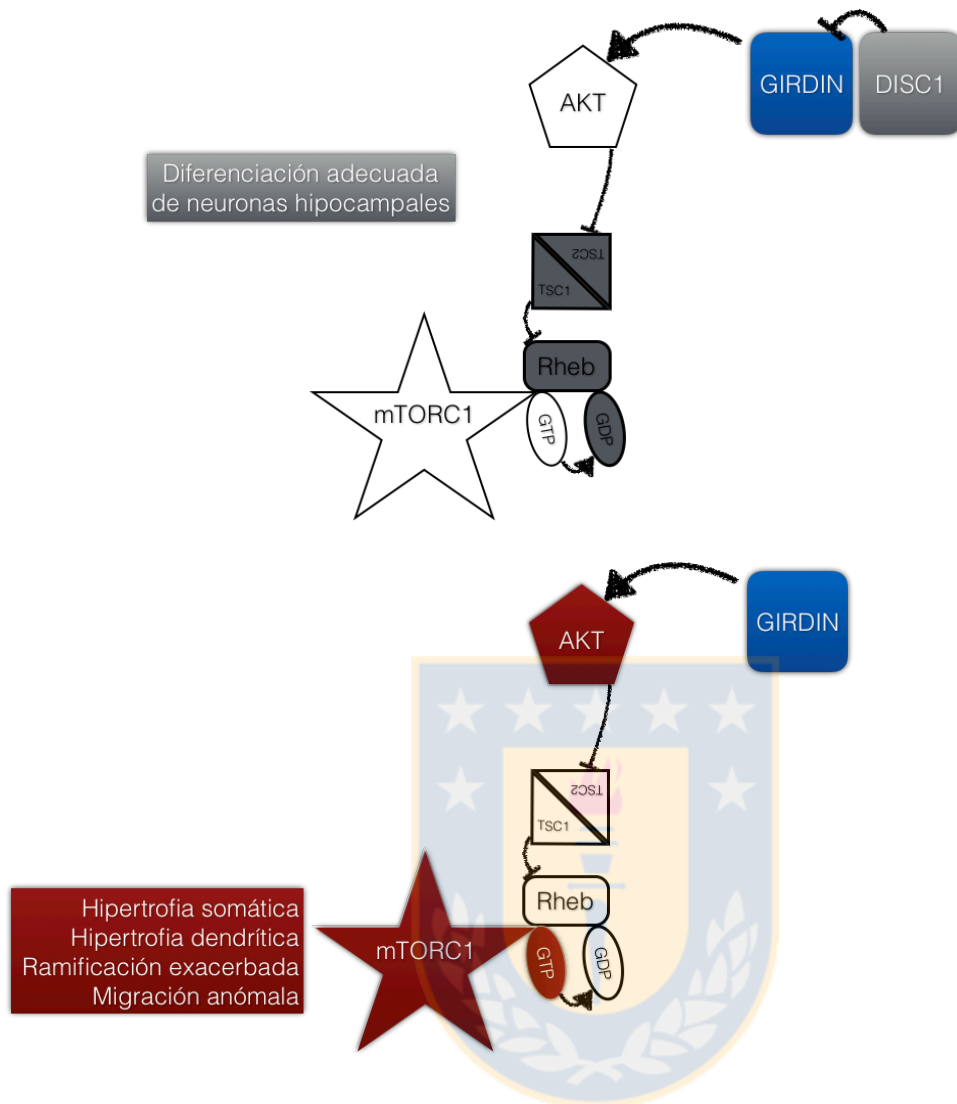
## INTERACCIONES Y FUNCIONES CONOCIDAS DE DISC1

DISC1 es una proteína *scaffold*, o de andamiaje, que estructuralmente es intrínsecamente desordenada y posee múltiples interactores diferentes descritos hasta hoy (D. J. Porteous et al. 2006). Algunos de estos interactores contribuyen a las funciones de DISC1 en el sistema nervioso, como PDE4 (*Phosphodiesterase 4*) y GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3 beta*). DISC1 y PDE4 interactúan, potencialmente inhibiendo la fosforilación del complejo NDE1/LIS1/NDEL1 (NDE1: *nudE Nuclear Distribution gene E homolog 1*, LIS1: *Lissencephaly-1*; NDEL1: *NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1*) por parte de PKA (*Protein Kinase A*), la cual es inhibitoria para la proyección de neuritas (Bradshaw et al. 2008). La interacción de DISC1 con GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*) inhibe la actividad quinasa de ésta última enzima, permitiendo así una adecuada proliferación de progenitores neuronales en el hipocampo adulto (Mao et al. 2009).

Otro interactor de DISC1 relevante para el sistema nervioso es GIRDIN (*Girders of actin filaments*), (Enomoto et al. 2009). GIRDIN interactúa con Akt facilitando su activación, y con ello la de sus blancos corriente-abajo, como el complejo 1 de la quinasa mTOR (mTORC1). La mayoría de los mecanismos moleculares en que DISC1 participa han sido descritos en el marco del estudio de fenómenos neuronales. Sin embargo, la expresión de DISC1 en diversos tejidos más allá del sistema nervioso central y su participación en la regulación de vías de señalización tan conservadas en eucariontes como Akt-mTORC1, permiten suponer que sus funciones no se limitan al sistema nervioso.

La vía Akt-mTORC1 es fundamental para regular el metabolismo celular, promoviendo vías anabólicas, como la traducción. La interacción de DISC1 con GIRDIN impide la interacción de GIRDIN con Akt, por lo que la regulación de la expresión de DISC1 permite regular la actividad de mTORC1. La carencia de DISC1 demostró causar hipertrofia somática y dendrítica en las neuronas afectadas, a través del descontrol de Akt-mTORC1(Enomoto et al. 2009, Kim et al. 2009), ver figura 4.





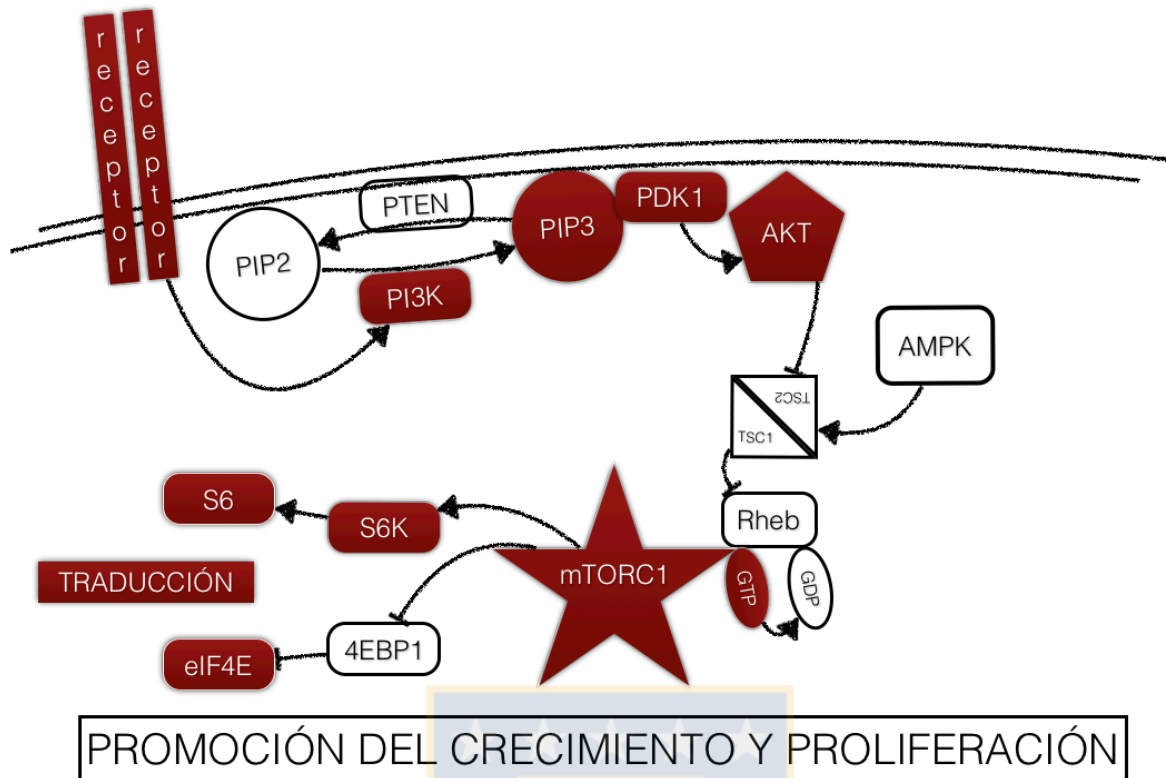
**Figura 4: Regulación de la vía Akt-mTORC1 por DISC1 y sus efectos en la diferenciación neuronal hipocampal.**

Representación de la regulación de Akt-mTORC1 por DISC1-GIRDIN en células hipocampales de ratón. El silenciamiento de DISC1 o la sobre-expresión de GIRDIN son capaces de hiper-activar Akt-mTORC1 en estas células, causando una diferenciación neuronal anómala dependiente de la hiper-activación de mTORC1, fenotipo reversible tras la incubación con rapamicina. Fuente: Elaboración propia.

El descontrol de la actividad de mTORC1 a menudo se debe a mutaciones y deleciones de los supresores de tumores que normalmente le inhiben, como PTEN, TSC1 o TSC2 . La activación descontrolada de mTORC1 promueve el crecimiento y proliferación celular al estimularse procesos anabólicos, principalmente la síntesis de proteínas (Fonseca et al. 2014). Por ello, no es extraño que en más de un 50% de los casos de cáncer ésta vía se encuentre activa (Menon y Manning 2008).

La estimulación de la síntesis de proteínas mediada por mTORC1 se rige por una cadena de eventos de fosforilación que cuando inicia desde la unión de un factor de crecimiento (como insulina) a su receptor tirosina quinasa en la membrana plasmática, este último dimeriza, auto-fosforila y trans-fosforila a otras quinasas, como PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Cuando PI3K fosforila a su sustrato PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate), la formación de su producto PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triPhosphate) recluta a Akt en la membrana, donde puede ser fosforilada (T308) por PDK1 (Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1), activando la fosforilación de sus blancos, que en general inducen el crecimiento celular y sobrevivencia (Saxton y Sabatini 2017), ver figura 5.





**Figura 5: Activación canónica de la vía Akt-mTORC1.** El mecanismo de activación se basa principalmente en fosforilaciones sucesivas dependientes de quinasas, el reclutamiento de Akt en la membrana gracias a PIP3. Además de la actividad GTPasa de Rheb, la que permite que se encuentre de forma preferente unida a GDP, incapaz de activar a mTORC1, a menos que su GAP TSC1/TSC2 sea inactivado por Akt. Fuente: Elaboración propia.

Diferentes enfermedades se caracterizan por un aumento en la actividad de mTORC1, la esclerosis tuberosa es una de ellas. Los pacientes con dicha enfermedad desarrollan tumores “benignos” de forma generalizada en ojos, corazón, pulmones y cerebro. En el sistema nervioso central esta enfermedad se manifiesta con retardo mental, epilepsia e incluso autismo (Reiling y Sabatini 2008, Lasarge y Danzer 2014, Kwiatkowski 2003). En este contexto, se conoce que mTOR regula la proliferación, sobrevivencia, crecimiento y funcionamiento neuronales. Las alteraciones genéticas causantes de estas enfermedades conllevan a anormalidades estructurales como la hipertrofia somática y dendrítica de las neuronas, características que comparten con células que presentan un descontrol en la activación de mTORC1 producto del silenciamiento de DISC1, como fue descrito previamente (Enomoto et al. 2009, Kim et al. 2011).

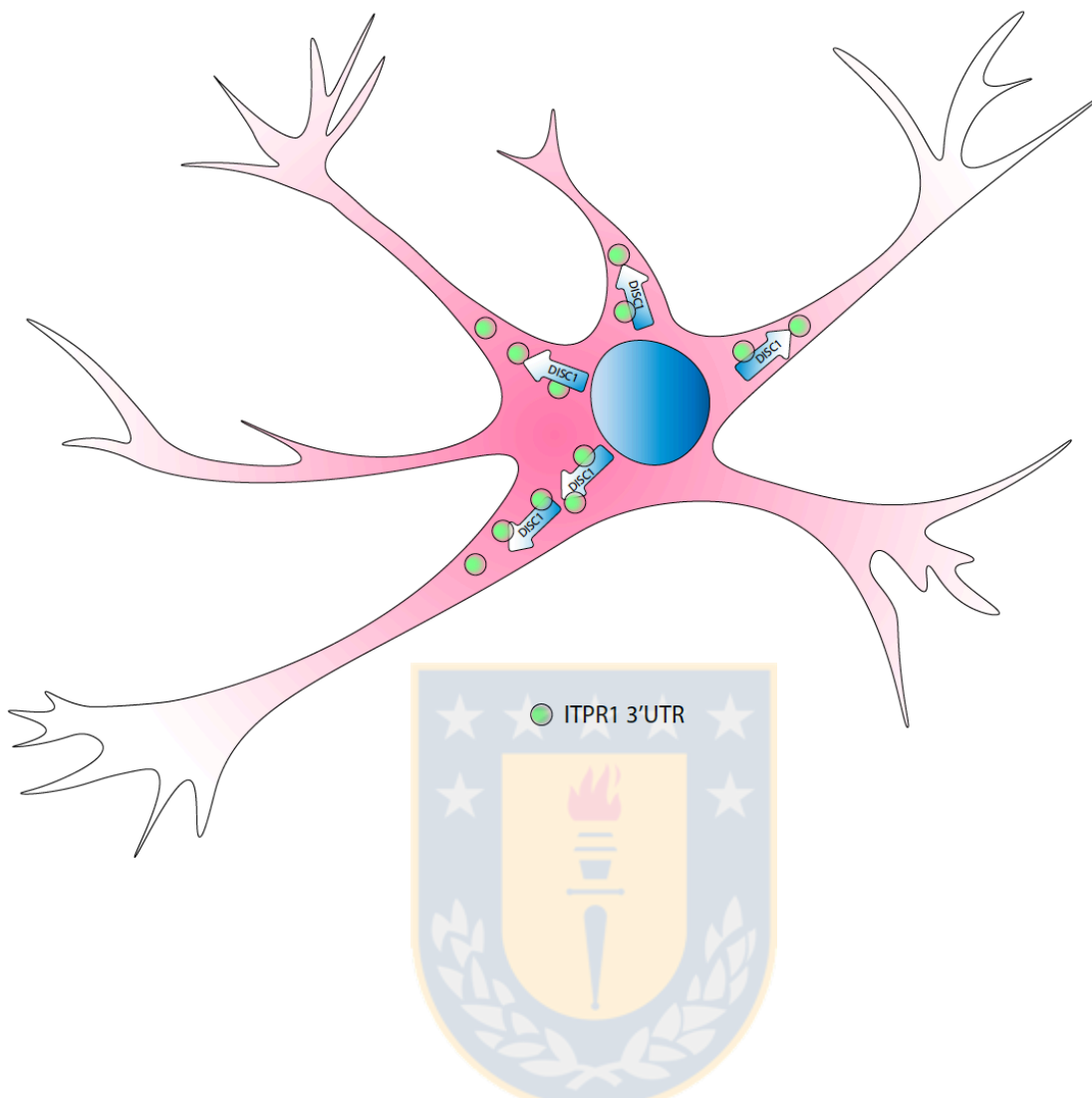
La señalización dopaminérgica, proceso molecular frecuentemente afectado en esquizofrenia, también es un estímulo que promueve la síntesis de proteínas (Smith et al. 2005, Nagai et al. 2007). Debido a todos estos antecedentes es posible que los mecanismos moleculares que subyacen a lo que ocurre en pacientes portadores de mutaciones en DISC1 involucren una desregulación en la síntesis de proteínas.

Si bien las interacciones de DISC1 descritas previamente ocurren en el citoplasma, también existen otros interactores nucleares, como el factor de transcripción ATF4 (Soda et al. 2013, Kakiuchi et al. 2007). Este factor corresponde a uno de los efectores de la respuesta UPR para contrarrestar el estrés de retículo, el cual puede inducirse por una sobre estimulación de la síntesis de proteínas (Kroemer, Mariño, y Levine 2010, Reiling y Sabatini 2008).

## INTERACCIONES DE DISC1 RELACIONADAS CON TRADUCCION

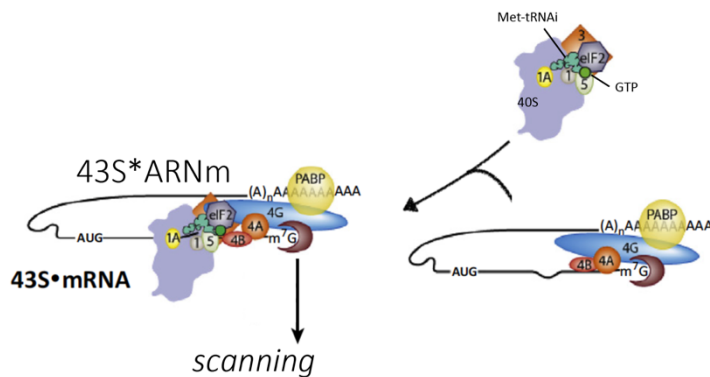
Fuera de los efectos sobre la activación de mTORC1 producto de la interacción de DISC1 con GIRDIN, se han encontrado otros interactores de DISC1 que lo vinculan de una forma más directa con el proceso de la traducción. Algunos de ellos son la sub-unidad h de eIF3 (*eukaryotic initiation factor 3*), (Ogawa, Kasai, y Akiyama 2005), HZF (hematopoietic zinc finger) y el 3' UTR del ARNm de ITPR1 (entre otros ARNm) (Tsuboi et. Al, 2015), ver figura 6. La interacción de DISC1 con el 3' UTR del ARNm de ITPR1 es potenciada por HZF, siendo relevante para el transporte de este ARNm en las dendritas y permitir una adecuada plasticidad neuronal. La interacción de DISC1 con dicho ARN mensajero requiere del dominio estructural de unión a ARN "ARM", cercano al extremo N terminal de la proteína DISC1.

eIF3, por otro lado, es el factor de inicio de la traducción de mayor tamaño y comprende 13 sub-unidades. La unión de eIF3 a la sub-unidad ribosomal menor (40S) es requerida para el ensamblaje del complejo de pre-iniciación (PIC) en el inicio canónico de la traducción (Shirokikh y Preiss 2018, Hinnebusch 2017), ver figura 7.

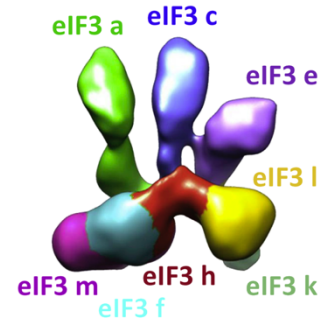


**Figura 6: DISC1 interactúa con diversos ARNm y permite el transporte de *ITPR1* a través de su región 3'UTR.** DISC1 puede interactuar con varios ARNm diferentes en células neuronales, entre ellos el de *ITPR1*. El dominio “ARM” de unión a ARN de DISC1 es necesario para que DISC1 promueva el transporte del 3'UTR de *ITPR1* (Tsuboi et. al. 2015).

A



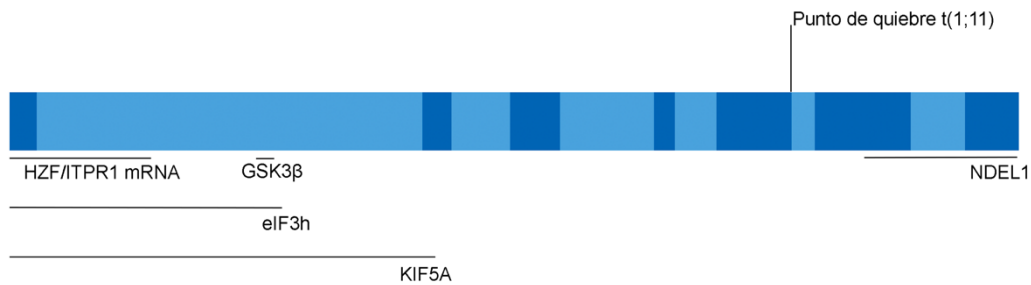
B



**Figura 7: Ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la traducción canónico y posterior *scanning* del ARNm.** A) Para iniciarse la búsqueda del codón de inicio de la traducción, el ARNm debe “activarse” previamente, al reclutarse el complejo de pre-inicio de la traducción (43S) en el ARNm. En el mecanismo dependiente de cap requiere la unión del ARNm con el complejo eIF4F (formado por eIF4A, -4E y -4G), junto a factores como PABP (que reconocen la cola poli-A del ARNm y permiten circularizarlo) previo a la carga de 43S formado por la sub-unidad ribosomal 40S, eIF1A, -1, -5 y -3, junto al complejo ternario [Met-tRNAi—eIF2—GTP]. B) Reconstrucción desde crio-microscopía electrónica de parte de eIF3 de mamífero, el octámero formado por eIF3a, -c, -e, -l, -k, -m, -f y eIF3h, ocupando este último una ubicación central en esta estructura. Modificado desde (Hinnebusch 2017).

La sobre-expresión de algunas de las sub-unidades de eIF3 encontrada en varios tipos de cáncer deriva en un aumento en la síntesis de proteínas. eIF3h, por ejemplo, ha sido encontrada sobre-expresada en un 18% de los cánceres de mama y un 30% en los cánceres de próstata, encontrándose también aumentados sus niveles de ARNm en un 26% de los casos de carcinoma hepatocelular y a su gen amplificado en numerosos casos, como en el cáncer colorectal (Spilka et al. 2013).

Al reportarse la interacción directa de DISC1 con eIF3h, se caracterizó que DISC1 requiere de al menos la porción de sus primeros 231 aminoácidos del extremo N-terminal para interaccionar con eIF3h. Dicha fracción forma parte del único dominio globular de DISC1 (Soares et al. 2011), que también alberga al dominio ARM requerido para la interacción de DISC1 con el ARNm de ITPR1 (Tsuboi et al. 2015), ver figura 8. Estos resultados sugieren en conjunto que DISC1 podría mediar el tráfico de la maquinaria traduccional junto a ciertos ARNm en proyecciones neuronales. La interacción de DISC1 con eIF3 es conservada durante diferentes tipos de estrés en que se inhibe la síntesis proteica (Ogawa, Kasaiy Akiyama 2005).



**Figura 8: Representación a escala de la secuencia de aminoácidos de DISC1, separando la codificada por cada exón.** Se muestran las porciones mínimas de DISC1 que interaccionan con eIF3h y algunos de sus interactores relevantes para la función neuronal. Fuente: Elaboración propia.

La traducción ocurre de forma secuencial en múltiples etapas y dispone de variados puntos de control. En efecto, la síntesis de proteínas ocurre a través de ciclos de inicio, elongación y término de la traducción, etapas en las cuales se reconocen y decodifican los ARN mensajeros. El control traduccional permite añadir un punto de control adicional sobre la expresión génica, de modo que la síntesis de proteínas se adecúe de forma rápida a circunstancias celulares, de forma independiente a la síntesis de cada ARNm (Hershey, Sonenberg y Mathews 2012).

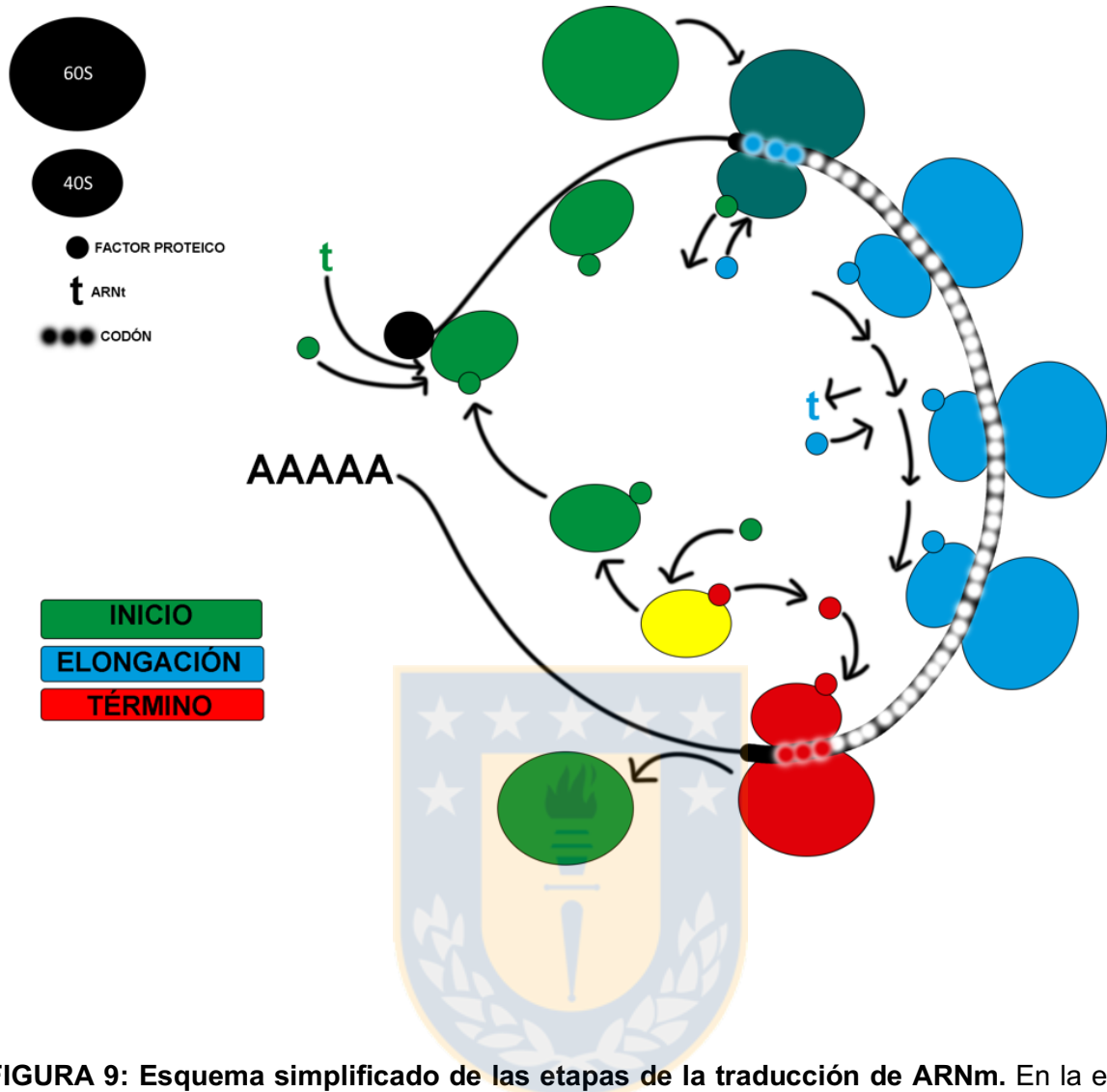
## REGULACIÓN DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Para que pueda comenzar un ciclo de decodificación de una molécula de ARN, la maquinaria traduccional debe reclutarse en ella. Los diversos factores de inicio de la traducción permiten la incorporación orquestada de los componentes necesarios para sintetizar las proteínas.

En resumen, en el mecanismo consenso para el inicio de la traducción, factores de inicio que son anclados en el 5' *cap* del ARNm reclutan a la sub-unidad 40S en el 5'UTR del ARNm. Posteriormente ocurre el *scanning*, o búsqueda del codón de inicio AUG, proceso en que tras deslizarse 40S hasta reconocer dicho codón, se permite el reclutamiento de la sub-unidad mayor del ribosoma (60S) con la ayuda de la unión y liberación de otros factores de inicio de la traducción. De esta forma se puede continuar con la etapa de elongación y finalmente la terminación (Shirokikh y Preiss 2018), ver figura 9.

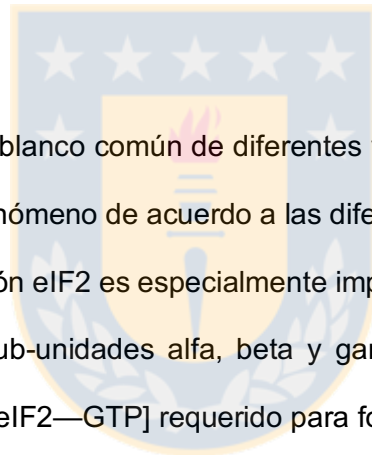






**FIGURA 9: Esquema simplificado de las etapas de la traducción de ARNm.** En la etapa de inicio, se recluta la sub-unidad menor del ribosoma (40S) gracias a la ayuda de varios factores de inicio, luego dicha sub-unidad se desplaza por el ARNm hasta que es reconocido un codón de inicio de la traducción, permitiéndose el reclutamiento de la sub-unidad mayor (60S) y la posterior elongación del polipéptido en dicha sub-unidad, hasta que finalmente es reconocido un codón de término y los componentes son reciclados para una nueva ronda de síntesis. Modificado desde (Shirokikh y Preiss 2018).

El reclutamiento de 40S al ARNm en la estructura *cap* es guiado por eIF4F, complejo conformado por eIF4A, eIF4E y eIF4G. eIF4E es un componente clave para la regulación de la traducción por el metabolismo energético, ya que su para formar al complejo 4F depende de la actividad quinasa del complejo mTORC1 a través de 4EBPs (4E-Binding Protein-1, -2 y -3). 4EBPsinteraccionancon la sub-unidad 4E de eIF4F, desplazando la interacción de la sub-unidad 4E con eIF4G, pero la fosforilación de 4EBPs por mTORC1 permite que eIF4E se encuentre disponible para formar parte del complejo eIF4F en el *cap* 5'm7G (Hay y Sonenberg 2004, Thoreen et al. 2012). La proteína de andamiaje eIF4G es necesaria para el reclutamiento de 40S en forma del complejo de pre-inicio de la traducción 43S en el ARNm, gracias a su afinidad por eIF1, eIF5 y eIF3 (Asano et al. 2001, He et al. 2003, Hinnebusch 2014, Weber, Hickeyy Baglioni 1978).



El inicio de la traducción es un blanco común de diferentes vías de señalización, permitiendo la modulación global de este fenómeno de acuerdo a las diferentes particularidades celulares. El factor de inicio de la traducción eIF2 es especialmente importante en esta regulación, es un trímero, conformado por las sub-unidades alfa, beta y gama. eIF2 es un componente del complejo ternario [Met-tRNA<sub>i</sub>—eIF2—GTP] requerido para formar el complejo de pre-inicio de la traducción 43S junto a la subunidad 40S. eIF2B posee actividad GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), permitiendo que una vez hidrolizado el GTP del complejo ternario tras ocurrir de forma satisfactoria el reconocimiento codón-anticodón AUG, éste GDP resultante pueda ser intercambiado por GTP y poder comenzar una nueva etapa de inicio (Bogorad, Liny Marintchev 2017, Jennings y Pavitt 2014, Wortham y Proud 2015).

Durante el estrés celular, diferentes quinasas son activadas de acuerdo a la naturaleza del estímulo presente, permitiendo fosforilar a la sub-unidad alfa de eIF2. Dicha fosforilación en la serina 51 inhibe la actividad GEF de eIF2 beta requerida para la formación del complejo ternario ya mencionado. A pesar de que las quinasas HRI (Heme-Regulated Inhibitor), PKR (Protein Kinase R), PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase) y GCN2 (General Control Non-depressible 2) fosforilan a eIF2 $\alpha$  en el mismo residuo, éstas son activadas en diferentes contextos (Taniuchi et al. 2016). HRI permite la inhibición global de la síntesis proteica en hepatocitos tras la privación de grupo Hemo, PKR es activada por la detección de ARN de doble hebra (característico de infecciones virales), PERK durante estrés de retículo endoplásmico y GCN2 durante privación de aminoácidos principalmente.

A pesar de que es aceptado que el inicio de la traducción ocurre en gran medida de esta forma (dependiente de *scanning de cap*), existen muchos mecanismos que no requieren del reconocimiento del 5'cap para reclutar al ribosoma e iniciar la síntesis de proteína. Estos mecanismos se estimulan cuando la traducción dependiente de cap se inhibe. Las denominadas IRES (Internal Ribosome Entry Site) son secuencias que se encuentran en los ARN que son requeridas para el ensamblaje de la maquinaria traduccional en ellos de forma independiente a eIF4F y el 5'cap del ARNm, permitiendo la estimulación de la síntesis de numerosas proteínas (Thompson 2012), entre las que destacan aquellas que permiten sobrellevar la condición desfavorable en que se encuentren.

El inicio de la traducción no es la única etapa del fenómeno que es regulada de acuerdo a las condiciones celulares, ya que la elongación y terminación también disponen de un fino control.

## COMPARTIMENTALIZACIÓN DE ARNm TRADUCCIONALMENTE INACTIVOS

Los mecanismos de regulación presentados hasta ahora, mediados por interacciones entre proteínas y por cascadas de señalización dependientes de fosforilaciones específicas, que pueden culminar en una respuesta transcripcional, no son los únicos que regulan la traducción de ARNm. De hecho, el concepto de compartimentalización de las cascadas de señalización ha incorporado poco a poco otros componentes no proteicos, como los ARNm (Buchan y Parker 2009).

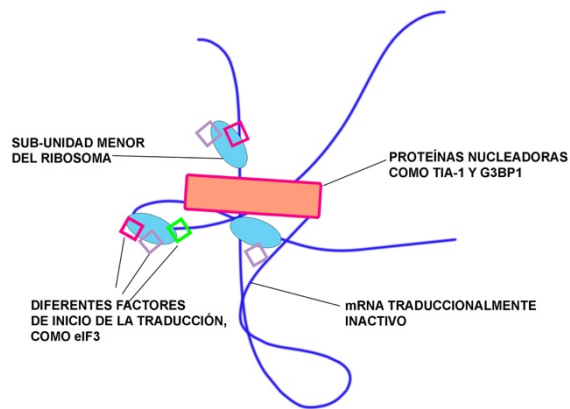
Los ARNm se encuentran normalmente asociados a muchas proteínas diferentes, formando mRNPs, complejos que no se encuentran de forma azarosa en el citoplasma (Mitchell y Parker 2014). El ensamblaje de diferentes mRNPs, dependiendo de la naturaleza del ARNm o de las proteínas que lo acompañan puede también diferir de acuerdo a la condición celular en que se encuentren. Por ejemplo, frente a temperaturas extremas, estrés oxidativo y osmótico, infecciones virales y radiación UV, entre otras condiciones, los ARNm que se encuentran traduccionalmente inactivos pueden incluirse en grandes complejos citoplasmáticos que son desensamblados una vez que el estrés celular cesa (Buchan y Parker 2009), ver figura 10.

Dichos complejos ribo-nucleo-proteicos han sido clasificados de distintas formas. En general, a pesar de que los ARNm no pueden ser traducidos en ellos, no existe un consenso que defina su función celular. Con el tiempo se ha llegado a postular dos conformaciones principales, los gránulos de estrés (SGs) y cuerpos de procesamiento (PBs).

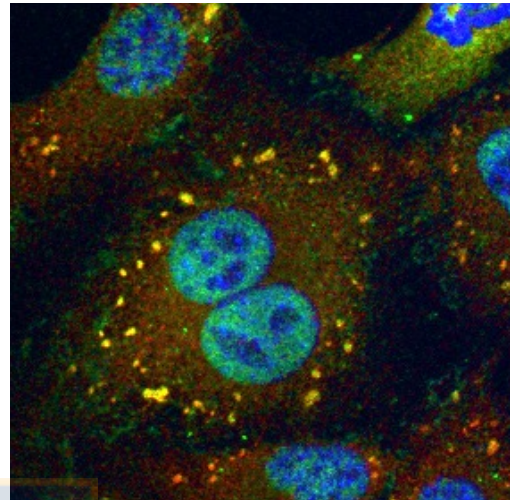
Se asume que los gránulos de estrés protegen a los ARNm incluidos en ellos, ya que a pesar de no ser traducidos allí, los SGs no presentan una acumulación de enzimas involucradas en la degradación de ARNm. En cambio, en los PBs sí se encuentran reclutadas diversas enzimas involucradas en el decaimiento de ARNm, como Dcp1, entre otras (Stoecklin y Kedersha 2013, Buchan y Parker 2009).



A)



B)



**Figura 10: Composición de un gránulo de estrés.** A) Esquema simplificado de un gránulo de estrés canónico. Los gránulos de estrés presentan ARNm traducionalmente inactivos, es decir, formando mRNPs que no son polisomas, sin presencia de sub-unidades mayores del ribosoma. Estos mRNPs sí presentan sub-unidades menores del ribosoma y un conjunto de factores de inicio característicos de los gránulos de estrés, como eIF3. Los SGs también presentan proteínas nucleadoras, las cuales son requeridas para el ensamblaje de estas estructuras. En general, estas proteínas presentan porciones intrínsecamente desordenadas en su estructura, lo que les brinda una baja solubilidad y una susceptibilidad mayor a agregarse.

B) Co-localización del factor de inicio de la traducción eIF3 y la proteína nucleadora de SGs TIA-1 en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con arsenito de sodio. Mediante microscopía confocal es posible distinguir los gránulos de estrés en el citoplasma de células eucariotas estresadas con arsenito de sodio gracias a la co-localización de marcadores específicos para SGs, como TIA-1 (verde) y eIF3 (rojo). TIA-1 posee también residencia nuclear, co-localizando parcialmente con la señal de Hoechst (azul).

Fuente: Elaboración propia.

Las proteínas compartidas por ambas estructuras, como Xrn1 y Rck, junto al continuo recambio de sus componentes han permitido suponer que la aparición de SGs podría derivar desde una previa formación de PBs (Buchan y Parker 2009). Entre las proteínas que pueden integrarse a gránulos de estrés se encuentran numerosos factores de inicio de la traducción y Raptor, una sub-unidad del complejo mTORC1 (Thedieck et al. 2013), (Wippich et al. 2013). Como ya fue mencionado anteriormente, mTORC1 se inactiva en condiciones adversas, incluso ante estrés oxidativo, para disminuir el gasto energético. La inclusión de Raptor en gránulos de estrés demostró contribuir a la inactivación de mTORC1 durante estrés oxidativo, protegiendo a las células de sufrir apoptosis, probablemente debido a una inhibición de la traducción de ARNm (Thedieck et al. 2013).

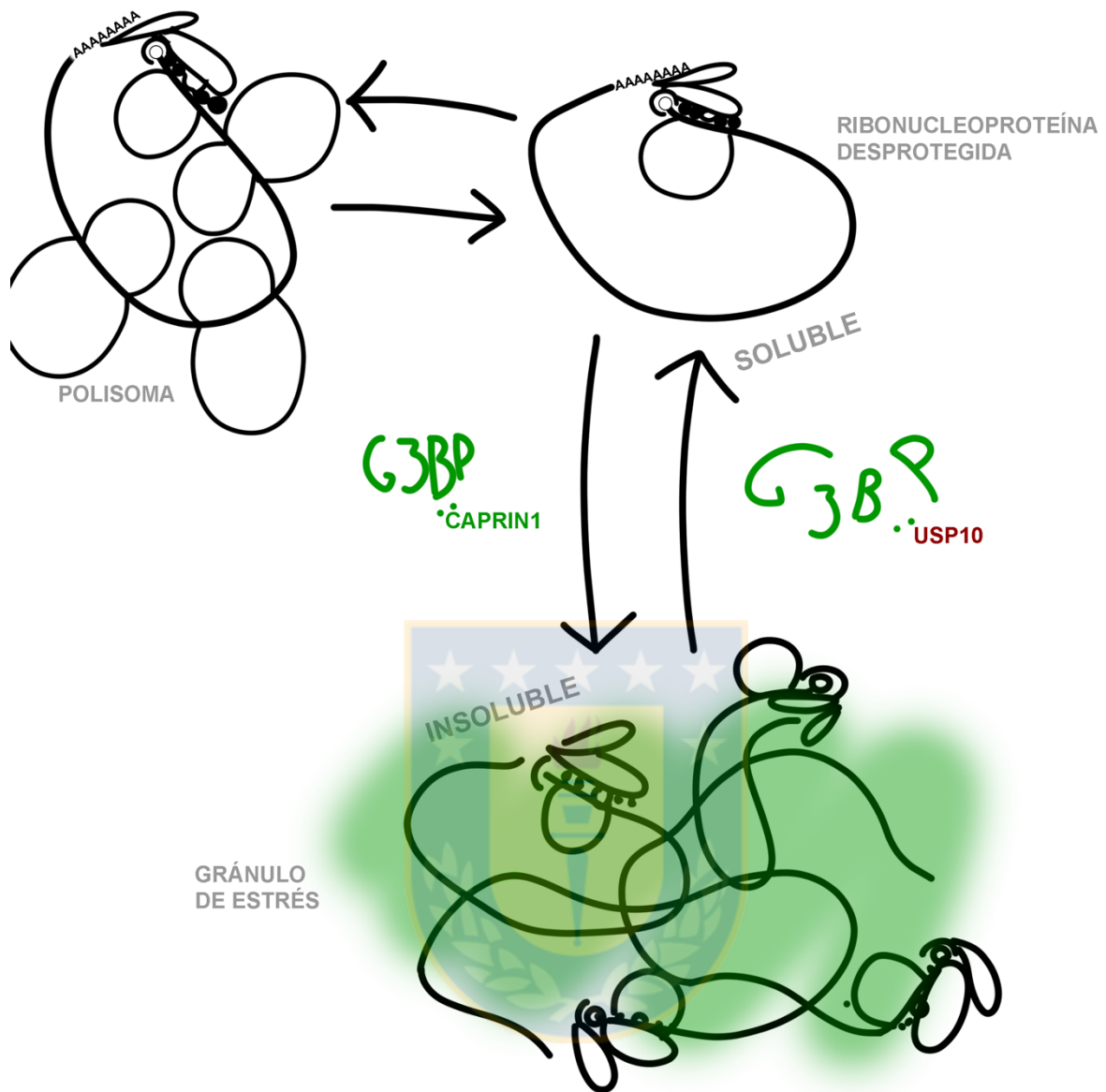
A pesar de que no existe un consenso sobre la función celular de los gránulos de estrés, sí es aceptado que la desregulación de su ensamblaje y desensamblaje tiene consecuencias celulares que incluso podrían corresponder a la causa de algunas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica. Esta posibilidad ha sido respaldada por la formación de agregados citoplasmáticos de proteínas que normalmente tienen residencia nuclear tras presentar mutaciones propias de pacientes con ELA o FTLD (*FrontoTemporal Lobar Degeneration*), como FUS, TDP-43 y SOD1. Dichos agregados citoplasmáticos han presentado marcadores de SGs (Bosco et al. 2010)(Vance et al. 2013), por lo que es posible que la funcionalidad y viabilidad neuronales observada en estos casos pueda también explicar los mecanismos subyacentes a otras enfermedades que afectan al sistema nervioso central.

Tal como aparentemente mutaciones en FUS, TDP-43 y SOD1 inducen su agregación en el citoplasma, también es posible que se ensamblen gránulos de estrés debido a la alteración de proteínas “core” de estas estructuras, como G3BP1 y TIA-1. Esta inducción de gránulos de estrés que puede ser independiente de p-eIF2 $\alpha$  puede deberse a la sobre-expresión de proteínas *core*, o a diferentes mutaciones de ellas mismas (Kedersha, Ivanov y Anderson 2013).

Nuevos mecanismos de regulación del ensamblaje y desensamblaje de gránulos de estrés han sido descubiertos recientemente. Por ejemplo, la unión de CAPRIN1 a G3BP1 estimula la agregación de G3BP1 en SGs, mientras que la unión mutuamente excluyente de USP10 a G3BP1 favorece su solubilidad fuera de dichas estructuras (ver figura 11). Estos antecedentes respaldan un rol celular conservado de la formación de SGs en eucariontes y permiten trazar un modelo que explique su ensamblaje (Kedersha et al. 2016).

La fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida durante el estrés, o la inhibición de eIF4A relentizan globalmente la etapa de inicio de la traducción, lo que resulta en un aumento de mRNPs con menor reclutamiento de ribosomas, es decir, no polisomales. Estos mRNPs, con mayores regiones de ARNm expuestas, las que antes eran protegidas por los ribosomas pueden unirse a proteínas con regiones de unión a ARNm, como TIA-1. Estos complejos pueden cambiar su solubilidad de acuerdo a modificaciones postraduccionales de sus componentes y participación de otros reguladores. Por ejemplo, La unión de Caprin1 a G3BP1 disminuye su solubilidad, favoreciendo el ensamblaje de SGs, mientras que la fosforilación en S149 de G3BP1 y su unión con Usp10 induce el desensamblaje de los gránulos de estrés (Kedersha et al. 2016).





**Figura 11: Regulación del ensamblaje de Gránulos de estrés dependiente de G3BP1.**

Diferentes condiciones de estrés aumentan la concentración de ARNm en mRNPs (ribonucleoproteínas compuestas de ARNm) traduccionalmente inactivas, las que se reclutan junto a Caprin1-G3BP1 en gránulos de estrés. Mientras que USP10 a través de su interacción con G3BP1 permite su desensamblaje. Fuente: Elaboración propia.

## INTERACCIÓN DE eIF3h CON DISC1 Y LOS GRÁNULOS DE ESTRÉS

Una regulación de la inclusión de componentes de la maquinaria traduccional como eIF3 y sus interactores en gránulos de estrés, podría corresponder a un mecanismo de control de la síntesis de proteína en un contexto fisiológico. Durante el estrés celular, las células deben coordinar la condensación y disolución de gránulos de estrés con el control de las vías de señalización que controlan la estimulación de la síntesis de proteínas (Buchan y Parker 2009). Alteraciones en la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de los gránulos de estrés afectan la viabilidad celular, por lo que es necesario ahondar en los mecanismos subyacentes.

DISC1 interactúa con eIF3, de forma directa con su sub-unidad eIF3h, incluso durante el estrés nutricional y oxidativo, condiciones conocidas por inducir la formación de SGs (Ogawa, Kasaiy Akiyama 2005). A pesar de que eIF3, como muchos otros factores de inicio de la traducción, puede incluirse en SGs, la proteína DISC1 endógena no es incluida en dichos gránulos. Es posible que la fracción de eIF3h que interactúa con DISC1 se incluya de forma diferencial en los gránulos de estrés en comparación a la fracción de eIF3h que no interactúa con DISC1. O bien, que dicha interacción inalterada observada por Ogawa y colaboradores sea un indicio la estabilidad de la interacción de ciertos ARNm y la maquinaria traduccional asociada a ellos con DISC1 durante el estrés.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar si efectivamente DISC1 puede regular la síntesis proteica de forma independiente a la modulación de Akt-mTORC1 mediada por GIRDIN y profundizar en el mecanismo involucrado en dicha regulación.

## II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

**Hipótesis:** DISC1 mantiene la síntesis de proteínas durante el estrés oxidativo, favoreciendo la viabilidad celular

**Objetivo General:** Caracterizar el rol de DISC1 en la regulación de la síntesis de proteínas durante el estrés celular.



## **Objetivos Específicos:**

### **1º Determinar si DISC1 participa en la regulación de la síntesis de proteínas.**

Se evaluará si DISC1 es requerido para la respuesta celular ante el estrés metabólico, genotóxico y oxidativo. Específicamente, se analizarán los niveles globales de síntesis de proteínas luego de inducir estos tipos de estrés en células transducidas con un shRNA dirigido contra DISC1 y también en células con menores niveles de DISC1 obtenidas mediante la edición de genoma mediada por CRISPR-Cas9.

### **2º Determinar el rol de DISC1 en la formación de gránulos de estrés y la síntesis de proteínas.**

Se evaluará si DISC1 es requerido para la respuesta celular al ante el estrés oxidativo. Específicamente se analizará el número de gránulos de estrés formado tras la incubación con arsenito de sodio, en células con menor expresión de DISC1 obtenidas como antes mencionado. También se analizará la dependencia de la dinámica de ensamblaje de gránulos de estrés para la participación de DISC1 en la respuesta celular ante el estrés oxidativo.

### **3° Caracterizar la interacción de DISC1 con componentes de la maquinaria traduccional.**

Con el propósito de ahondar en un mecanismo que explique un posible requerimiento de DISC1 en el mantenimiento de la traducción tras el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio, se analizará si la interacción de DISC1 con la sub-unidad h del factor de inicio de la traducción eIF3. También se analizará si DISC1 es incluido en gránulos de estrés o cuerpos de procesamiento (PBs), dos ribo-nucleoproteínas de diferente naturaleza que son formadas durante el estrés.

### **4° Determinar si DISC1 ejerce un rol cito-protector durante el estrés.**

Se evaluará si DISC1 es relevante para mantener la viabilidad celular tras el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio y/o tras la inducción crónica de gránulos de estrés. Respaldando de este modo la relevancia de DISC1 en la homeostasis celular durante la respuesta celular a condiciones estresantes, o ante el descontrol de la esta respuesta celular.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### MATERIALES

##### PLÁSMIDOS:

pCMV-dR8.2 dvpr (Plásmido Addgene #8455, (Stewart et al. 2003))

pCMV-VSVG (Plásmido Addgene #8454, (Stewart et al. 2003))

pLKO.1-scramble (Plásmido Addgene #8453, (Sarbasov et al. 2005))

pLKO.1-TSC2 (Plásmido Addgene #15478, (Kim DH. et al. 2007))

pEGFP-C1 (Plásmido clontech)

pDsRed-monomer-C1-DISC1 DU16477, Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit, University of Dundee, Scotland, UK.

pLJM60-Tia1 (Plásmido Addgene #38243, (Sabatini DM. Et. Al. 2012))

pEGFP-C1-G3PB1 (Donado por el Dr. Ricardo Soto Riffo)

pEGFP1-G3BP1S149E (Donado por el Dr. Ricardo Soto Riffo)

pEGFP-C1-DCP1A (Donado por el Dr. Ricardo Soto Riffo)

pD1321-AP-mouseDISC1 gRNA (DNA2.0 Inc.)

pD1321-AP-CONTROL (DNA2.0 Inc)

Secuencias clonadas en el vector pLKO.1:

*Scramble:*

5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'

shDISC1 "mouse/rat":

CCGGAAGGCTACATGAGAAGCACAGCTCGAGCTGTGCTTCTCATGTAGCCTTTTTTTTG

shDISC1 "EXON2"

CCGGAACGGCTTCCAAGACACCTTCCTCGAGGAAGGTGTCTTGGAAGCCGTTTTTTTTTG

shDISC1 "EXON 10"

CCGGAAGGCAAACACTGTGAAGTGCCTCGAGGCACTTCACAGTGTTTGCCTTTTTTTTG



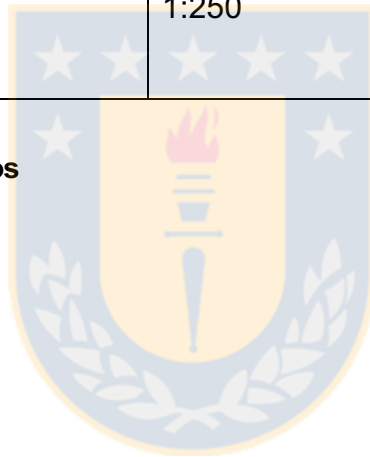
## ANTICUERPOS

Código	Dilución <i>Western Blot</i>	Dilución inmunocitoquímica	Dilución Inmunoprecipitación
DISC1 (B-2) Santa Cruz	1:1000	1:300	
eIF3h Cell Signaling #3413	1:1000	1:100	1:100
GFP (B2) Santa Cruz	1:1000		1:100
$\beta$ -actin (C4, Santa Cruz Biotechnology)	1:10000		
Puromycin (12D10, Millipore)	1:2000	1:100	1:100
TIA-1 (C20, Santa Cruz Biotechnology)	1:2000	1:300	
p-S6(Ser235/236) Cell Signaling #2211	1:2000		
p-eIF2a (ser51/52) Santa Cruz	1:500		
Anti-mouse Alexa fluor 488 (Life Technologies)		1:200	
Anti-mouse Alexa fluor 555 (Life Technologies)		1:200	
Anti-rabbit Alexa fluor 633 (Life Technologies)		1 :200	



Anti-rabbit Alexa fluor 546 (Life Technologies)		1 :200	
Anti-mouse Alexa fluor 546, Jackson ImmunoResearch		1:200	
IgG normal (mouse) sc2025, Santa Cruz.			4 µg
IgG normal (rabbit) sc2027, Santa Cruz.			4 µg
Hoechst, Thermo Fisher Scientific.		1:250	

**Tabla 1: Anticuerpos utilizados**



## MÉTODOS DE LABORATORIO

### CULTIVO CELULAR.

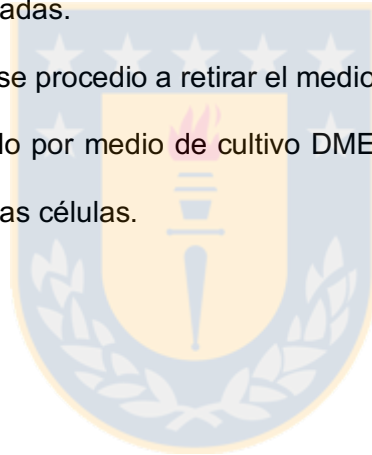
Las líneas celulares MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> y HEK293 fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (Hyclone) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS, Biological Industries), 1% glutamina (Invitrogen) y penicilina/estreptomicina al 0,5 % (Invitrogen), fórmula que será mencionada como DMEM completo. Las células fueron mantenidas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro y tripsinizadas antes de que alcanzaran un 70% de confluencia para expandir o congelar en criotubos en nitrógeno líquido.

Para tripsinizar las células, una vez retirado el medio de cultivo, se lavaron con PBS 1X y se incubaron por un minuto con 1 mL de tripsina (Hyclone) 0,5 % p/v (5X), en el caso de las células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> y con tripsina 1X en el caso de células HEK 293. Las células incubadas con tripsina fueron resuspendidas en DMEM completo para inhibir la actividad de la enzima y centrifugadas en tubos de centrifugación de 15 mL (Falcon) a 1000 r.p.m. para posteriormente descartar el sobrenadante y resuspender las células en la solución requerida para cada trabajo posterior (PBS 1X, DMEM 20% FBS 10% DMSO, por ejemplo).

## TRANSFECCIÓN TRANSCIENTE DE CÉLULAS HEK 293.

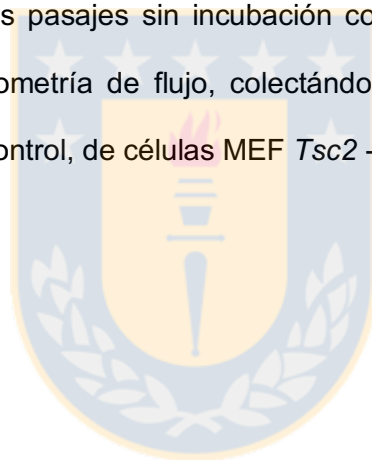
Para transfectar esta línea celular se diluyó HBS 2X en DMEM sin suero, glutamina ni antibiótico ("DMEM free") hasta HBS 1X, en un volumen final de 250  $\mu$ L (para transfectar células cultivadas en placas de 10 cm de diámetro). En paralelo se diluyó en el mismo volumen de DMEM free la cantidad de plasmidio requerida para cada experimento (10  $\mu$ g para placas de 10 cm). Posteriormente, gota a gota se agregó la dilución de ADN sobre la mezcla de HBS, apoyando suavemente el tubo eppendorf receptor sobre un agitador tipo vortex. Tras esperarse 20 minutos, se procedió a distribuir la mezcla resultante, gota a gota, sobre el medio de cultivo completo (pero sin antibiótico) en que las células HEK293 se encontraban previamente incubadas.

Luego de al menos seis horas, se procedió a retirar el medio de cultivo con los cristales de fosfato de calcio, para cambiarlo por medio de cultivo DMEM completo (con antibióticos) hasta el momento de procesar las células.



## TRANSDUCCIÓN DE SHRNA EN MEF *Tsc2* -/-.

La transducción lentiviral de las células MEF *Tsc2* -/- se realizó con partículas lentivirales producidas en células HEK293, para ello, las células HEK293 fueron transfectadas de forma transiente y de forma conjunta con los vectores pCMV-dR8.2 dvpr, pCMV-VSVG y pLKO.1-GFP (shRNA scramble o shRNA dirigidos contra DISC1). Durante tres días consecutivos, posterior a las 24 horas desde la transfección de las células HEK293, se tomó el sobrenadante de ellas y se filtró con un filtro de 0,45  $\mu$ M para depositarse sobre las células blanco, MEF *Tsc2* -/-. Dicho sobrenadante fue suplementado con polybrene 4  $\mu$ g/mL con para aumentar la competencia de las células blanco. Luego de recuperarse las células transducidas tras al menos tres pasajes sin incubación con partículas lentivirales, ellas fueron sorteadas mediante citometría de flujo, colectándose sólo las células GFP+, al compararse con su respectivo control, de células MEF *Tsc2* -/- sin transducir.



## ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>.

La transfección transiente de células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> se realizó mediante electroporación, de acuerdo al protocolo de Neon Transfection System (Thermo Fischer Scientific). 1,5 millones de células fueron resuspendidas en 90  $\mu$ L de buffer de resuspensión, más 30  $\mu$ g de ADN plasmidial hasta llegar a un volumen final de 115  $\mu$ L en un tubo eppendorf desde donde se recolectaron 100  $\mu$ L con las puntas suministradas por el fabricante. La condición estandarizada en la cual se pudo obtener una alta eficiencia de transfección y baja muerte celular fue de un pulso de 30 msec usando un voltaje de 1150 voltios.

## INDUCCIÓN DE ESTRÉS METABÓLICO, GENOTÓXICO Y OXIDATIVO.

El estrés metabólico inducido por carencia de suero fue inducido al incubar las células con medio DMEM (Hyclone) suplementado con 1% glutamina (Invitrogen) y penicilina/estreptomicina al 0,5 % (Invitrogen) durante 16 horas. El estrés genotóxico fue inducido por la incubación durante 16 horas con la droga doxorubicina a una concentración de 1  $\mu$ M. El estrés oxidativo fue inducido por la incubación con dos compuestos diferentes, 16 horas con peróxido de hidrógeno 1 mM y 45 minutos con arsenito de sodio 0,5 mM.

## INMUNOCITOQUIMICA.

Las células que fueron observadas por microscopía fueron cultivadas previamente en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio redondos, de 15 mm de diámetro. Tras cultivarse, se retiró el medio de cultivo y se lavó el remanente con PBS 1X, para posteriormente fijar las células con para-formaldehído al 4% en PBS 1X durante 15 minutos. Luego de tres lavados con PBS 1X se permeabilizaron las células con Triton X 100 0,1% en PBS 1X durante 10 minutos, tras otros tres lavados con PBS 1X se incubaron los cubreobjetos con los anticuerpos primarios correspondientes diluídos en BSA al 3% en PBS 1X durante toda la noche o al menos 6 horas. Luego de otros tres lavados con PBS 1X se incubaron las células con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en BSA al 3% en PBS 1X durante una hora, junto a la tinción nuclear. Luego de esta incubación y otros tres lavados con PBS 1X se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos de vidrio usando medio de montaje Dako y a esperar el secado del mismo durante al menos una noche. El microscopio confocal espectral usado fue LSM780 NLO Zeiss (objetivos 40X y 60X, CMA Bío-Bío). La microscopía de super-resolución fue obtenida usando el equipo ELYRA S.1 (SIM-SR), Zeiss (CMA Bío-Bío).

## INMUNODETECCION DE PROTEINAS.

Se realizó inmunodetección de proteínas a través de la técnica de *Western Blot*. Se realizó lisis celular en 50  $\mu$ L de “buffer” de lisis por condición (0.5% Igepal CA030, 10mM, Hepes pH 7.9, 1mM DTT, 100 mM NaCl, 0.5 mM PMSF) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (PPC1010-1ML, Sigma Aldrich). Se igualó concentraciones de las proteínas lisadas mediante la técnica de Bradford y se separaron las proteínas a través de electroforesis en gel denaturante al 15, 10, 8 y 6% de acrilamida (SDS-PAGE) dependiendo del tamaño de las proteínas en estudio. Se utilizaron geles de 1.5 mm para la detección de proteínas. Las muestras se incubaron por 5 minutos a 95 °C con un *buffer* de carga para proteínas (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) en presencia de 0,1 M de DTT. Luego las muestras se sembraron junto al estándar pre-teñido (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa Thermo) en el gel, para posteriormente correrlas a 80V constantes en solución de corrida (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0.1 % SDS). Se cargaron entre 25-100  $\mu$ g de proteínas totales para la detección de proteínas específicas, las que posteriormente fueron transferidas desde el gel a una membrana de PDNF en solución de transferencia (25mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol) durante 1 hora y 20 minutos a 100 volts o toda la noche a 30 volts si la transferencia involucraba proteínas de alto peso molecular. Para verificar la correcta transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo “Ponceau” (P3504-10G, Sigma Aldrich). Luego de esto, se realizaron múltiples lavados con agua destilada, para luego bloquearla con leche descremada al 5% en TBS-Tween (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.05 % Tween20) durante 1 hora. Después se incubó con el anticuerpo primario y el secundario por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C cada uno, realizando tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos después de cada incubación de anticuerpo. Finalmente, la membrana se reveló con líquidos quimioluminocentes (“Western Lightening Plus-ECL”, Perkin Elmer) y se expuso a una película autoradiográfica (Ultracruz Autoradiography Film

Blue, Santa Cruz Biotechnology), o bien en un fotodocumentador PXi (Pixie) gel documentation system, Syngene. Se realizaron análisis densitométricos de la señal obtenida utilizando el programa ImageJ 1.49q (NIH, USA).

#### INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE SU SÍNTESIS.

Se incubaron las células durante los últimos 10 minutos previos a su colección con puromicina 10 µg/ml. Posteriormente se siguió el protocolo para detección de proteínas, pero dirigido contra el epítipo de puromicina adquirido por las proteínas que estaban siendo elongadas durante la incubación con el aminonucleósido.

La señal de los péptidos cuantificada desde *western Blot* fue normalizada por la señal de beta-actina para cada condición, mientras que el análisis de la señal de péptidos marcados con puromicina mediante inmunocitoquímica fue hecho cuantificando célula a célula la señal obtenida.



## CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se usó un *buffer* de lisis compuesto de Tris-HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 1% NP-40. Luego de cuantificar las muestras, se igualó la concentración de proteína total y se pre-limpié cada lisado con 50 µL de resina A/G-agarosa (santa cruz) por una hora junto a 2 µg de IgG normal. Luego de descartar la resina, se incubó con anticuerpo primario o IgG normal durante dos horas más otras cuatro horas junto a 50 µL de resina A/G-Agarosa. Luego de descartarse el sobrenadante, la resina se lavó al menos tres veces con *buffer* de lisis y se incubó con *buffer* de carga 2X y se continuó con el protocolo de inmunodetección de proteínas.



## CONSTRUCCIÓN DE ADN Y DIGESTIÓN PREPARATIVA.

Con el objeto de generar vectores que permitieran transducir secuencias de ADN que posteriormente a ser transcritas permitieran obtener diferentes shRNAs dirigidos contra el mRNA de DISC1, se procedió a clonar diferentes pares de oligonucleótidos con extremos sobresalientes correspondientes a los cortes de las enzimas EcoRI y AgeI. Para ello se digirió el vector pLKO.1-shTSC2 con las mismas enzimas de digestión. Se realizaron digestiones preparativas para purificar al vector, empleando 10 µg de ADN y 20 unidades de cada enzima de restricción, utilizando al “buffer” de compatibilidad según las especificaciones de la empresa (New England Biolabs) en 15 µL totales de reacción. La incubación de la reacción se llevó a cabo a 37°C por 8 horas y luego, se purificaron los fragmentos desde gel de agarosa al 1% en 0.5X TAE (40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1.14mL/L ácido acético glacial, pH 7.8) en presencia de bromuro de etidio con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREYNAGEL). Se cuantificó por gel, analizando la banda generada a través de densitometría empleando el programa ImageJ 1.49q (NIH, USA), para luego realizar la ligación usando una proporción molar de 1:4 respectivamente y al vector linearizado sin presencia de inserto a modo de control de religación. La ligación fue hecha usando enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) según las recomendaciones de la empresa, incubando a 16°C por 16 horas. Posteriormente cada mezcla de ligación se transformó en bacterias competentes XL-1 Blue (Catalog #200249, Agilent Technologies) usando el método de transformación por calcio.

## TRANSFORMACIÓN BACTERIAS COMPETENTES.

Para efectuar la transformación bacteriana, se incubó la reacción de ligación con 50  $\mu\text{L}$  de bacterias competentes por 30 minutos en hielo. Posterior a esto, se indujo el shock térmico a 42°C por 2.5 minutos y se incubó la mezcla por 5 minutos en hielo. A continuación, las células se recuperaron por una hora a 37°C en medio LB (Medio Luria-Bertani, MO BIO Laboratories, Inc.) sin antibiótico, para posteriormente sembrar las bacterias en placas agar LB/Ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; la cuales se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las colonias presentes en la placa se inocularon en medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para su posterior crecimiento.

## PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA.

Se analizaron al menos 10 colonias por separado para verificar la presencia del fragmento clonado en la nueva construcción. Se crecieron las colonias en 6 mL de medio LB con ampicilina por toda la noche a 37°C. Posteriormente, 1.5 ml de bacterias fueron centrifugadas por 10 minutos a 9000 rpm. Luego se descartó el sobrenadante, para resuspender el pellet con 300  $\mu\text{L}$  de "buffer" TENS (10mM Tris- HCL pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1N NaOH, 0.5% SDS) por vórtex. La mezcla anterior se incubó en hielo por 10 minutos y se le agregó 15  $\mu\text{L}$  de Acetato de sodio 3M pH 5.2, agitando nuevamente en vórtex. A continuación, se realizó una centrifugación por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo donde se le agregó 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% frío para obtener la precipitación del ADN. Posterior a esto se realizó una centrifugación por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet de ADN se lavó con 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se realizó otra centrifugación por 10 minutos. Después, el pellet se resuspendió en agua desionizada conteniendo RNasa a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Finalmente, para verificar si los clones elegidos correspondían a la construcción esperada, se realizó una digestión analítica (1 unidad de enzima en 15  $\mu\text{L}$  finales) empleando enzimas de restricción

(New England Biolabs) según descripción de la empresa. Se verificó la liberación de fragmentos mediante un gel de agarosa al 1% en 0.5X de tampón TAE. Una vez detectado el clon que contenía la construcción con el inserto, se generó un vial de “glicerol stock” correspondiente (850  $\mu$ L de caldo inoculado con 150  $\mu$ L de glicerol puro) para su almacenamiento a largo plazo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La colonia se creció en 500 mL de caldo de cultivo para purificar ADN a gran escala.

#### PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A MEDIANA ESCALA.

Para obtener ADN plasmidial suficiente para cada requerimiento, cada construcción fue transformada como se describió anteriormente y dichas bacterias se crecieron en 500 ml de LB/ampicilina a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se usó el kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (MACHEREY NAGEL) siguiendo las instrucciones del manual. Finalmente, se disolvió el pellet en de “buffer” TE (100mM Tris Cl pH 8.0, 1mM EDTA) y se determinó la concentración de ADN a través de la absorbancia obtenida mediante el uso de un NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c). Se consideraron las absorbancias a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas) y se obtuvo la razón 260/280 que idealmente alcanza un radio de 1.8-2.0 para muestras de calidad óptima.

## ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA.

La separación de fragmentos de ADN obtenidos fue realizada mediante geles de agarosa al 1%. El tampón empleado para la electroforesis fue TAE (Tris-Ácido Acético EDTA; Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM; pH 7,6). Los geles de agarosa se prepararon con TAE conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/mL (Merc). El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific). Para visualizar las diferentes bandas de ADN en el gel de agarosa, el gel fue ubicado en un equipo transiluminador y fotodocumentador (VilberLourmat).

## GENERACIÓN DE SILENCIAMIENTO Y K/O MEDIANTE CRISPR/CAS9.

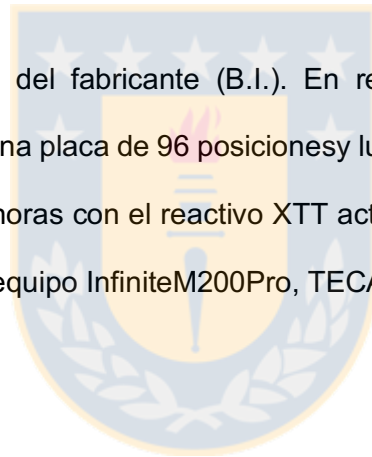
Células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> fueron electroporadas como se indicó previamente con el vector pD1321-DISC1gRNA, diseñado para generar una mutación genómica en el gen Disc1 murino mediante la expresión de la proteína Cas9 silvestre acoplado a la proteína RFP (acrónimo del inglés “Red Fluorescent Protein”). El vector vacío pD1321 no presenta secuencias codificantes para ARN guías requeridos para la proteína Cas9. Tanto la proteína Cas9 como RFP se pueden producir de manera eficiente desde un único constructo, ya que están separadas por un péptido basado en el péptido 2A autoescindible, permitiendo un salto traduccional (Provost et al. 2007). Las células electroporadas fueron disgregadas 18 horas post-electroporación mediante tripsinización y sometidas a citometría de flujo acoplado a sorteo celular (BDFACSAria III cell sorting). En cada experimento se seleccionó un pool de 100 células correspondientes al 1% de las células más fluorescentes, verificándose la edición mediante western blot debido a la heterogeneidad de posibles mutaciones inducidas en el genoma.

## ENSAYO DE VIABILIDAD USANDO TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.

Las células se lavaron dos veces con PBS 1X tibio y se fijaron por diez minutos con la solución 10% v/v ácido acético, 10% v/v metanol en agua destilada. Luego de remover la solución fijadora se incubaron las células con una solución de cristal violeta 0,4 %p/v, Metanol 10% v/v, ácido acético 10% v/v en agua destilada. Luego de retirar el colorante se lavó con PBS 1X tres veces y se incubó con ácido acético 10% en agitación para luego cuantificar la absorbancia a 590 nm.

## ENSAYO DE VIABILIDAD USANDO XTT.

Se siguieron las instrucciones del fabricante (B.I.). En resumen, 5000 células fueron sembradas en cada pocillo de una placa de 96 posiciones y luego del tratamiento estudiado fueron incubadas durante tres horas con el reactivo XTT activado. Posteriormente se leyó la absorbancia a 490 nm en el equipo InfiniteM200Pro, TECAN.



#### IV. RESULTADOS

**OBJETIVO 1: Determinar si DISC1 participa en la regulación de la síntesis de proteínas.**

Para evaluar si DISC1 participa en la regulación de la síntesis de proteínas se utilizó el silenciamiento de DISC1 en la línea celular MEF *Tsc2*  $-/-$ . El uso de estas células en que mTORC1 no puede regularse por la fosforilación de *Tsc2* dependiente de Akt permite aislar la contribución de DISC1 sobre la traducción del efecto inhibitorio de DISC1 sobre la vía Akt-mTORC1 y el inicio de la traducción.

Se analizó la respuesta de estas células ante diversos contextos estresantes de cultivo celular, fuera del crecimiento en condiciones estándar, ya que el control traduccional que permite definir cuánto y qué proteínas son sintetizadas, es particularmente relevante durante condiciones que desafían la integridad celular. Se evaluó el efecto de DISC1 sobre la síntesis global de proteínas durante el estrés metabólico inducido por la ausencia de suero en el medio de cultivo, el estrés genotóxico inducido por la droga quimioterapéutica doxorubicina y el estrés oxidativo inducido por la incubación con peróxido de hidrógeno.

Para evaluar este efecto se generaron vectores codificantes para un shRNA que permitiera silenciar la expresión de DISC1 de forma transitoria y estable.

El silenciamiento estable se logró produciendo partículas lentivirales en células HEK293 capaces de transducir células blanco, MEF *Tsc2*  $-/-$ , de forma que integren la secuencia codificante para el shRNA en su genoma.

Se probaron tres secuencias diferentes, de las cuales una (DISC1 mouse/rat) demostró silenciar a DISC1 en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>. La selección mediante citometría de flujo de las células transducidas, que expresan GFP, permitió obtener una línea celular MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> con silenciamiento estable de DISC1 (ver figura 13 A).

La síntesis global de proteínas fue comparada entre células con DISC1 silenciado con la de células que expresan un shRNA que no hibrida con ningún ARNm conocido. El mecanismo molecular que nos permitió comparar estos niveles se basa en la inhibición de la síntesis proteica por parte del antibiótico puromicina (Schmidt et al. 2009). La puromicina, es un aminonucleósido con similitud estructural con el extremo 3' de los ARN de transferencia, por lo que puede ingresar en el ribosoma y formar un enlace covalente con los péptidos en proceso de elongación, deteniendo la polimerización.

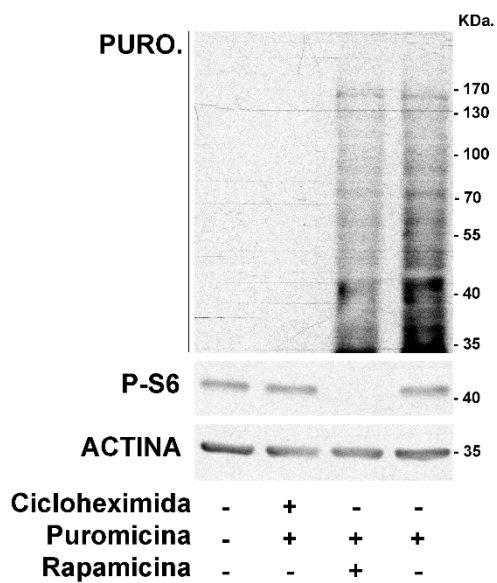
La incubación con puromicina y la posterior inmunodetección de las proteínas que la incorporan es un protocolo que ha sido ampliamente utilizado en los últimos años y permite evitar el uso de análogos radioactivos de ciertos aminoácidos, técnica que conlleva altos riesgos para la salud. Se evaluó la sensibilidad de esta técnica para comparar la síntesis proteica global entre diferentes condiciones. La señal obtenida desde la inmunodetección de estas proteínas disminuye abruptamente, como se esperaba, al pre-incubarse las células con cicloheximida antes del pulso de puromicina. Otro control fue la inhibición de la traducción tras la inhibición farmacológica de mTORC1 mediada por rapamicina, condición en que se obtuvo una marca distinguible de proteínas con incorporación de puromicina, pero menor a la encontrada sin la incubación con esta droga (ver figura 12).

De entre las condiciones estresantes evaluadas: privación de suero, tratamiento con doxorubicina o con peróxido de hidrógeno, sólo las últimas dos indujeron menores niveles de traducción global en células con menores niveles de DISC1 (ver figura 13).

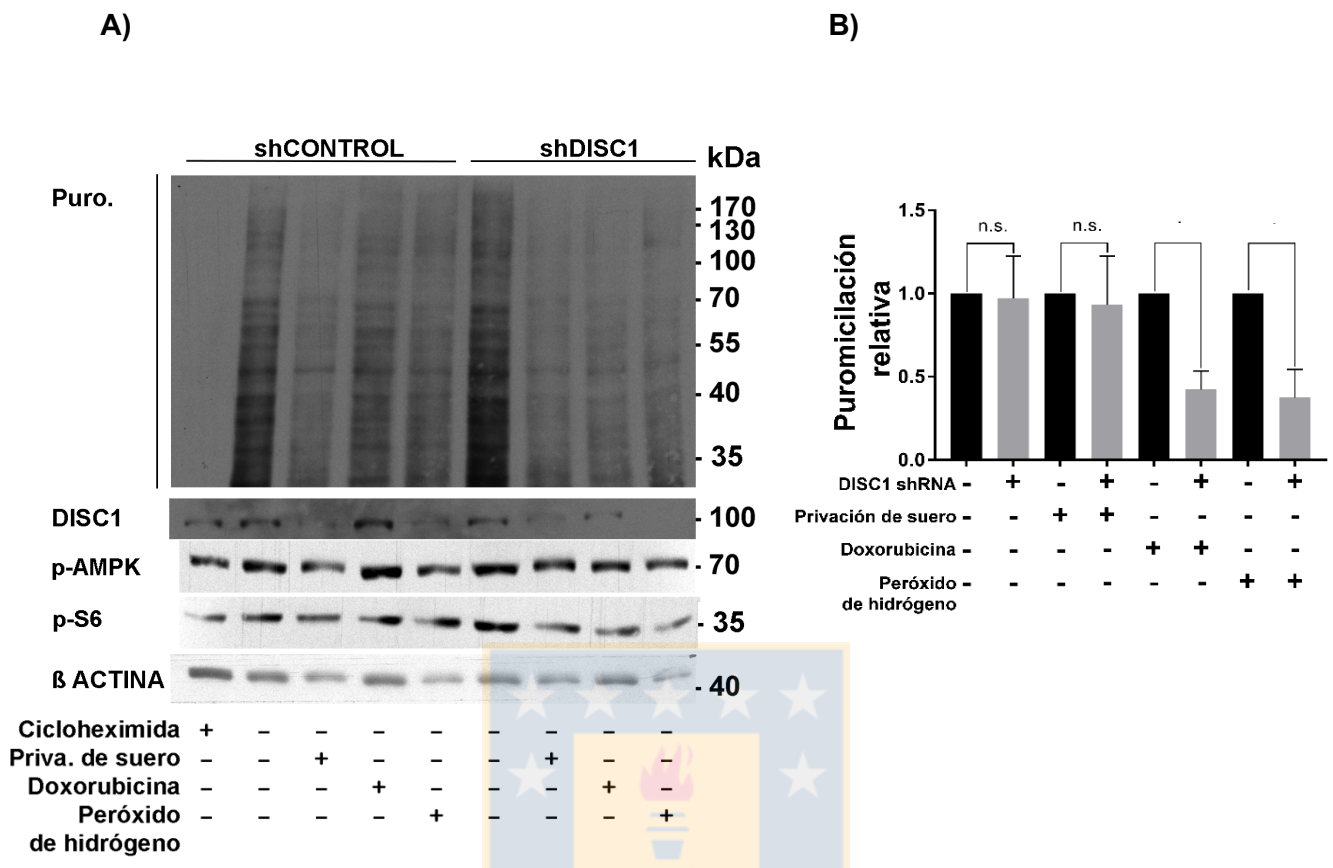


La inhibición de la activación de la vía Akt-mTORC1 por parte de la interacción DISC1-GIRDIN ya mencionada permite suponer que el silenciamiento de DISC1 activa a GIRDIN-Akt-mTORC1. En cambio, los datos presentados hasta ahora encontrados en células sin expresión de TSC2, respaldan que DISC1 es necesario para mantener la traducción de forma independiente de Akt durante el estrés oxidativo. Para descartar que la inhibición de la traducción observada tras el silenciamiento de DISC1 durante el estrés oxidativo se deba a una inhibición de la señalización activadora del inicio de la traducción, se analizó la activación de la vía Akt-mTORC1. Las células con menor expresión de DISC1 no presentan una disminución significativa de la fosforilación de S6rp (p-S6), sugiriendo que la disminución en la traducción encontrada en estas células se debe a un factor ajeno a la señalización regulatoria del inicio de la traducción (ver figura 13).

Ya que tanto doxorubicina como peróxido de hidrógeno son capaces de generar estrés oxidativo en las células, se evaluaron cambios en la síntesis de proteínas global ante el tratamiento con arsenito de sodio, un compuesto altamente tóxico que induce estrés oxidativo, al mismo tiempo que induce la formación de gránulos de estrés. Se encontró mediante inmunocitoquímica que las células con menores niveles de DISC1 presentan menor síntesis proteica global durante la incubación con arsenito de sodio (ver figura 14).

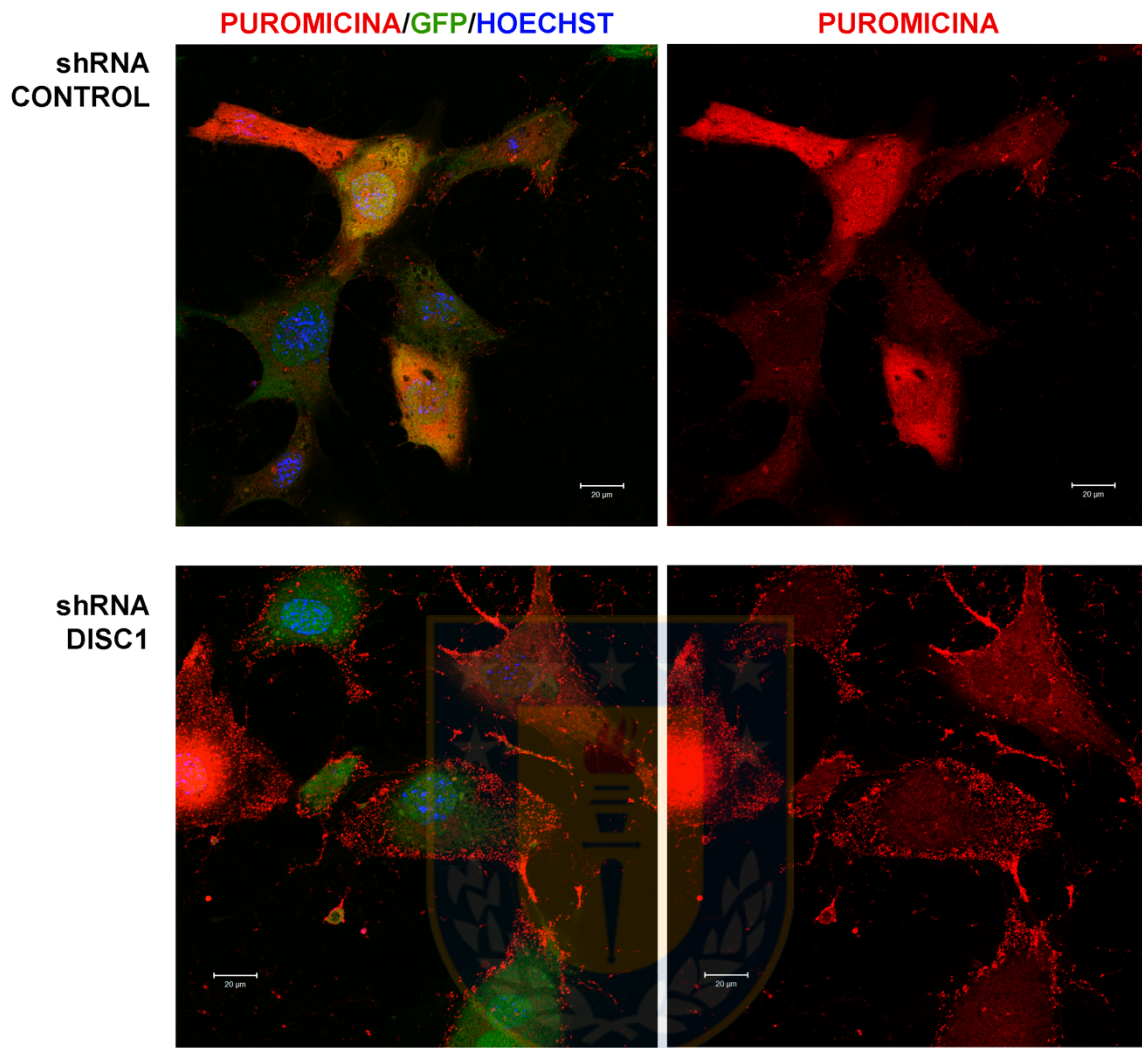


**Figura 12: La inmunodetección de la incorporación de puromicina en las proteínas es sensible a cambios en los niveles de traducción. Western Blot:** Se evaluaron las diferencias en la inmunodetección de los péptidos unidos covalentemente a puromicina entre diferentes contextos farmacológicos. Puro.: señal de puromicina, P-S6: señal de la fosforilación de rpS6 dependiente de p70S6K corriente debajo de mTORC1, Actina: control de carga. Figura representativa, n=3. Fuente: Elaboración propia.

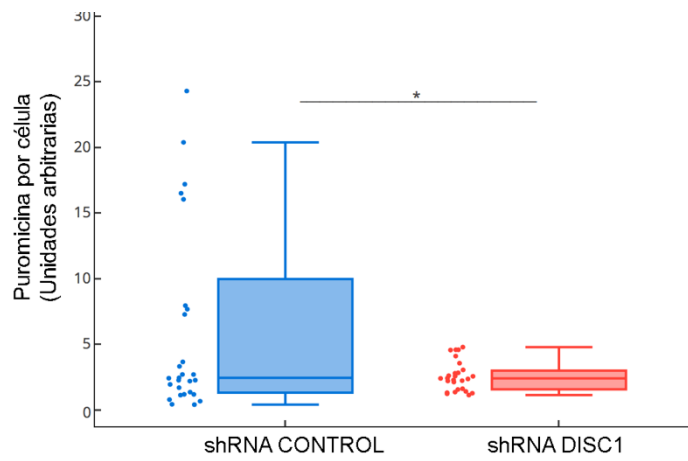


**Figura 13: DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante diferentes contextos celulares.** Se evaluó el efecto del silenciamiento estable de DISC1 en células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> en la inmunodetección de las proteínas marcadas con puromicina ante diferentes tratamientos. Sólo la incubación con doxorubicina y peróxido de hidrógeno indujeron una disminución significativa en la síntesis global de proteínas tras el silenciamiento de DISC1. A) *Western Blot.* de proteínas marcadas con puromicina, de DISC1, Actina, p-AMPK y p-S6 endógenos. B) Cuantificación relativa de la señal de puromicina obtenida desde células menor expresión de DISC1 en relación a aquellas células transducidas con un shRNA no relacionado incubadas en las mismas condiciones, los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar, n=3. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). Fuente: Elaboración propia.

A)

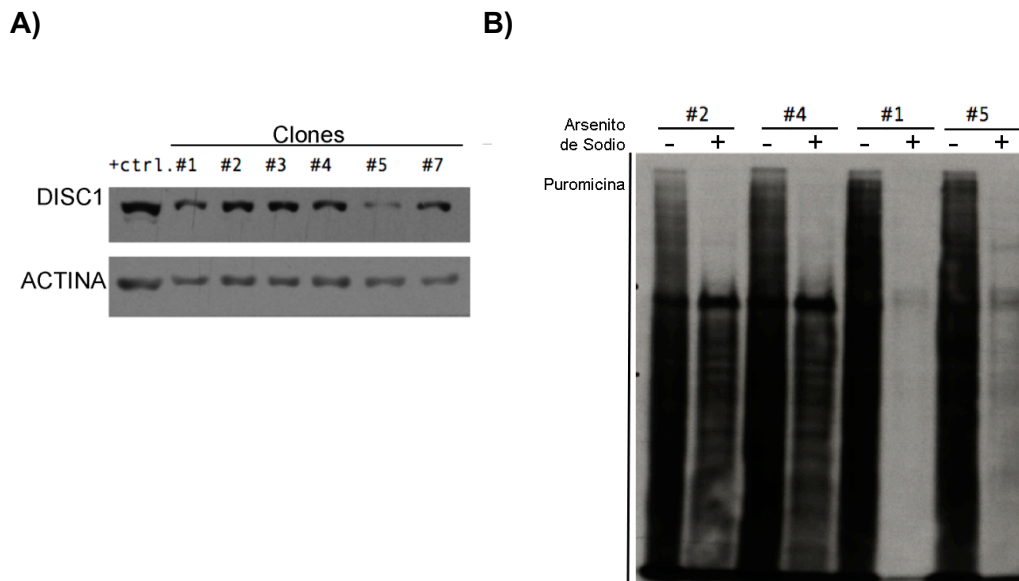


B)



**Figura 14: DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante el tratamiento con arsenito de sodio.** Se analizó las diferencias en la inmunodetección de las proteínas marcadas con puromicina tras ser incubadas con arsenito de sodio entre células que expresan menores niveles de DISC1 y sus respectivos controles, a través de microscopía confocal. El silenciamiento estable de DISC1 fue obtenido gracias a la transducción de shRNA mediada por partículas lentivirales. Las células con silenciamiento de DISC1 presentaron menores niveles de traducción. A) Microscopía confocal de las proteínas marcadas con puromicina, Rojo: Puromicina, Azul: Hoechst, Verde: GFP. Aumento 63X. Figura representativa, n=5. B) Cuantificación de la señal de puromicina por cada célula del experimento representativo mostrado en A), los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). Fuente: Elaboración propia.





**Figura 15: DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante el tratamiento con arsenito de sodio al analizarse usando CRISPR/Cas9.** Se analizó las diferencias en la inmunodetección de las proteínas marcadas con puromicina tras ser incubadas con arsenito de sodio entre células que expresan menores niveles de DISC1 y sus respectivos controles, a través de *Western Blot*. La menor expresión de DISC1 fue obtenida gracias a la edición de genoma mediada por CRISPR Cas9. Los sub-grupos de células con menor expresión de DISC1 presentaron menores niveles de traducción. Cada Clon representa un sub-grupo de células obtenido desde citometría de flujo. A) *Western Blot* Expresión de DISC1 en cada sub-grupo de células, n=1. B) *Western Blot* de las proteínas marcadas con puromicina tras el tratamiento de cada clon con arsenito de sodio. Fuente: Elaboración propia.

La mantención de la síntesis proteica dependiente de DISC1 durante el tratamiento con arsenito de sodio también fue evaluada mediante la edición del genoma mediada por CRISPR-Cas9, dirigiendo la hibridación de la sonda de sgRNA con el gen de DISC1 en células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> (ver figura 15).

La transfección transiente con el vector codificante tanto para el ARN guía y la enzima Cas9 fusionada a RFP permitió seleccionar aquellas células con mayor expresión de Cas9 mediante citometría de flujo. De esta forma se enriqueció una población celular que tuviera una alta probabilidad de haber editado el gen de DISC1 de forma tal que se desplazara el marco de lectura producto de deleciones o inserciones. Efectivamente, de los sub-conjuntos de células aisladas tras este procedimiento, dos presentaron una menor expresión de DISC1 que el resto.

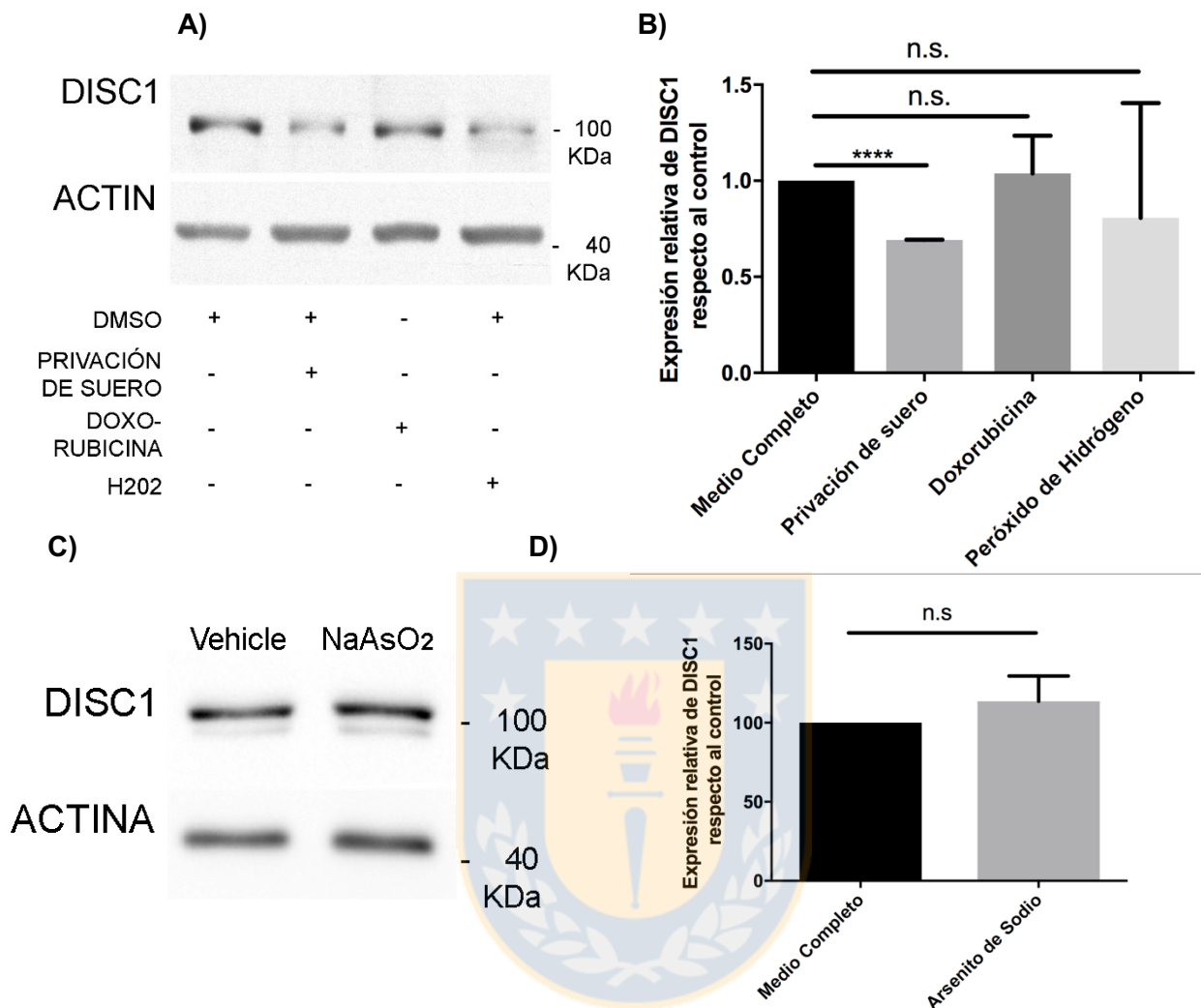
Esos conjuntos de células fueron sujetos de la comparación de sus niveles de traducción global encontrándose que efectivamente, tras la incubación con arsenito de sodio, las poblaciones celulares denominadas “clon 1” y “clon 5” presentan menor traducción que el resto, de la misma forma que aquellas células con silenciamiento de DISC1 mediante shRNA (ver figura 4).

Ya que DISC1 fue encontrado necesario para mantener la traducción sólo en algunas de las condiciones estudiadas, se procedió a determinar si existe alguna correlación entre los niveles endógenos de expresión de DISC1 y la mantención de la traducción. Se estudiaron todas las condiciones ensayadas previamente y se encontró que DISC1 no varió su expresión en ninguno de los contextos celulares en que demostró ser relevante para mantener la síntesis de proteínas. De forma interesante, la única condición estudiada en que se registró un cambio significativo en la expresión de DISC1, disminuyendo, fue el estrés metabólico inducido por la privación de suero, contexto en el cual DISC1 no fue hallado responsable de mantener la síntesis de proteínas (ver figura 16). Como el silenciamiento de DISC1 no causó una disminución significativa en la traducción global tras la privación de suero, el estrés metabólico inducido fue evaluado mediante el *shift* de p-AMPK, el que efectivamente es presentado bajo dicho tratamiento (ver carriles 3 y 7 de figura 13 A). Este *shift* correspondería a un indicio de una menor razón ATP/AMP en las células tratadas.

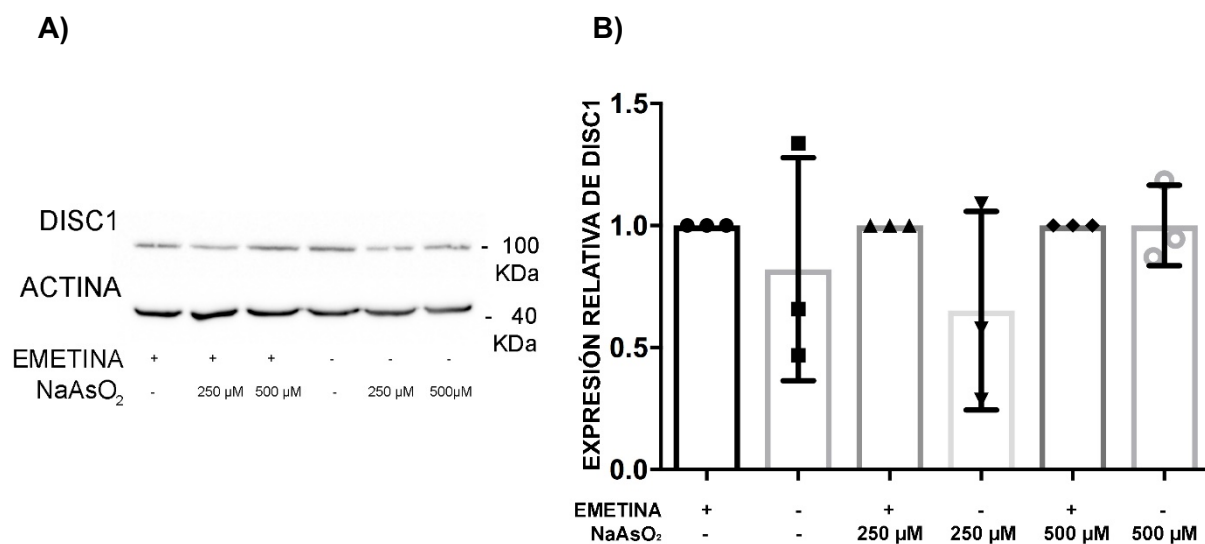
Esta observación sugiere que la mantención de la expresión de DISC1 es relevante para su función en el control de la traducción durante el estrés oxidativo, ya que fuera del tratamiento con peróxido de hidrógeno y con arsenito de sodio, la incubación con la droga quimioterapéutica doxorubicina también induce estrés oxidativo en las células.

Con tal de evaluar la posibilidad de que exista un mecanismo responsable de mantener la expresión de DISC1 durante el estrés oxidativo se estudió la estabilidad de DISC1 tras la incubación de células HEK293 con NaAsO<sub>2</sub> durante treinta minutos. Como era de esperarse, tras esta corta incubación no se hallaron diferencias de expresión de DISC1, pero la incubación con concentraciones ascendentes de NaAsO<sub>2</sub> permite distinguir una tendencia hacia mantener estables los niveles de DISC1 a medida que se incrementa la concentración del agente estresor (ver figuras 16 y 17).





**Figura 16: Los niveles de expresión de la proteína DISC1 no varían durante el estrés genotóxico ni oxidativo.** Comparación relativa de los niveles de DISC1 de células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> durante el estrés con respecto a células sin tratar. A) *Western Blot* de Disc1 y Actina endógenos de un experimento representativo, tras privación de suero, incubación con doxorubicina y con Peróxido de Hidrógeno. B) Cuantificación relativa de DISC1, normalizada con la expresión de Actina, n=3. C) *Western Blot* de Disc1 y Actina endógenos de un experimento representativo, tras la incubación con NaAsO<sub>2</sub>. D) Cuantificación relativa de DISC1, normalizada con la expresión de Actina, n=3. , los datos presentados en B) y D) corresponden a la media ± desviación estándar. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, (P < 0.05). Fuente: Elaboración propia.



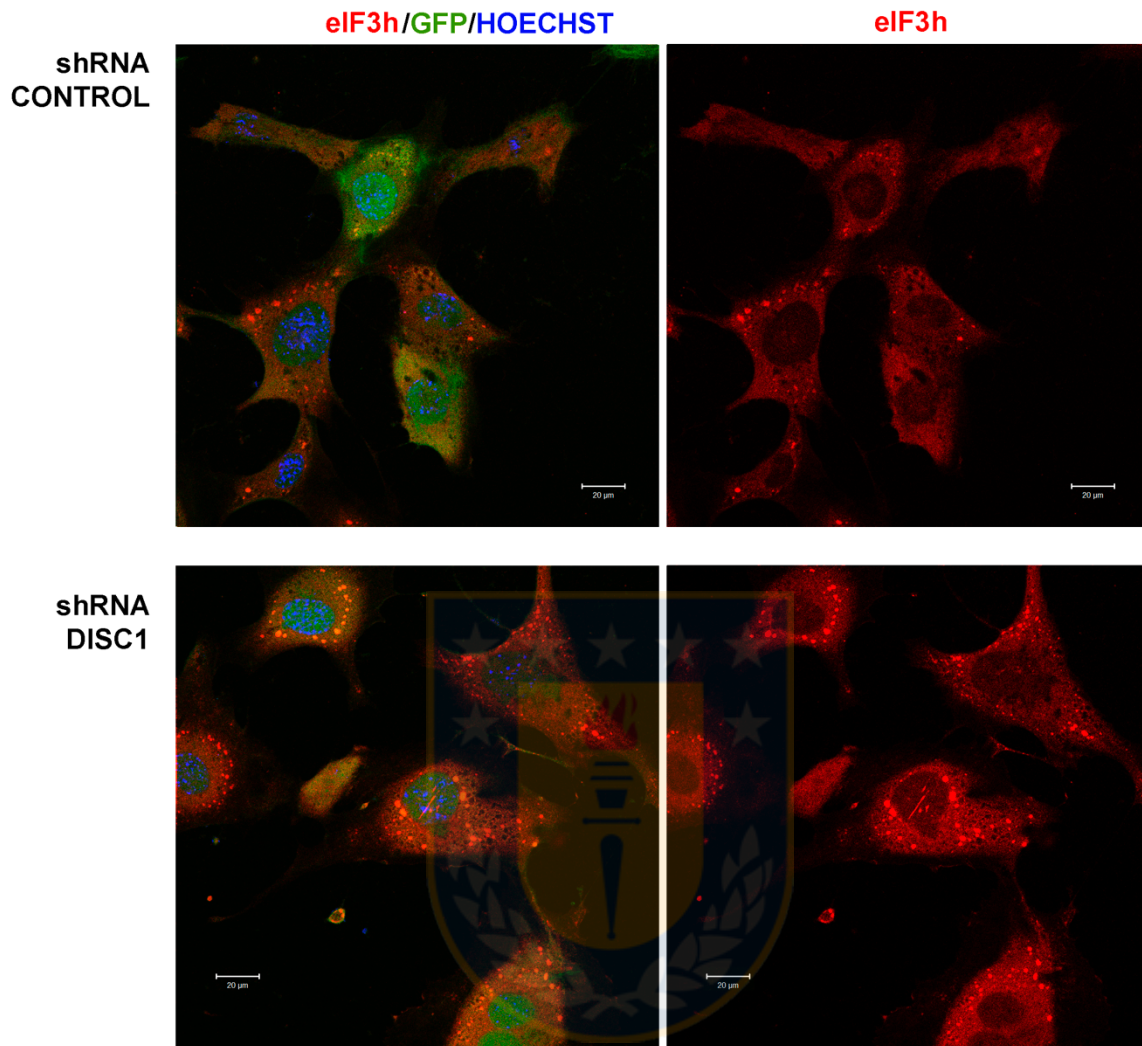
**Figura 17: La estabilidad de la proteína DISC1 no varía ante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio.** Comparación relativa de los niveles de DISC1 de células HEK293 tras la incubación con NaAsO<sub>2</sub> respecto a células incubadas previamente con emetina. A) *Western Blot* de Disc1 y Actina endógenos de un experimento representativo. B) Cuantificación relativa de DISC1, normalizada con la expresión de Actina, n=3. Fuente: Elaboración propia.

**OBJETIVO 2: Determinar el rol de DISC1 en la formación de gránulos de estrés y la síntesis de proteínas.**

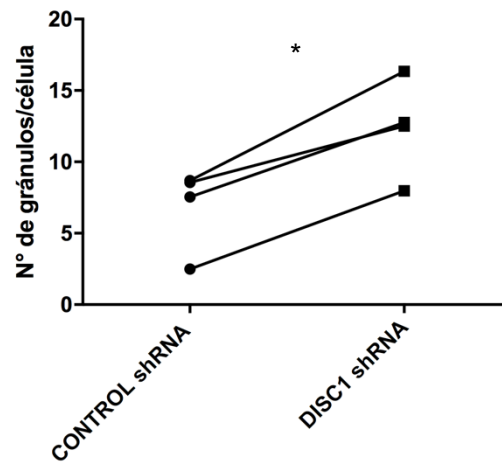
Debido a que la estimulación de la síntesis de proteínas inhibe la formación de gránulos de estrés, se analizó la función de DISC1 en la formación de estos complejos ribonucleoproteicos. Se encontró que DISC1 inhibe la formación de gránulos de estrés, ya que tanto las células con silenciamiento estable de DISC1 (ver figura 18) y aquellas derivadas de la edición de DISC1 mediante CRISPR-Cas9 tienen un mayor número de gránulos de estrés por célula que aquellas con mayores niveles de expresión de DISC1 (ver figura 19).



A)



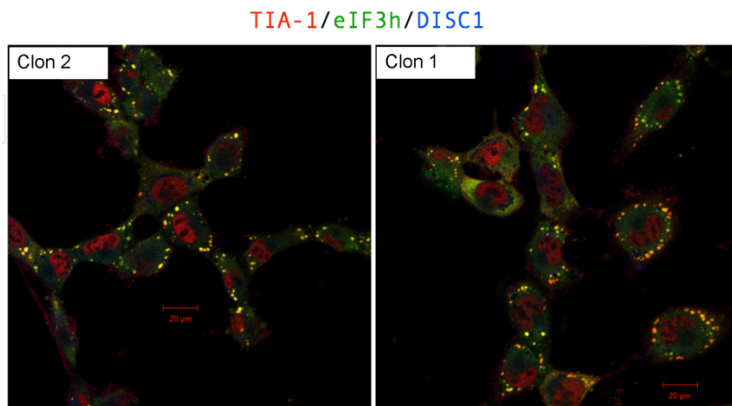
B)



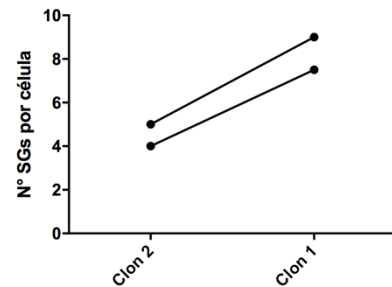
**Figura 18: DISC1 es necesario para disminuir el número de gránulos de estrés inducidos por arsenito de sodio.** Se evaluó el efecto del silenciamiento estable de DISC1 sobre el número de gránulos de estrés formado por cada célula. La microscopía confocal de células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> tratadas con arsénico permite distinguir que aquellas células que expresan menores niveles de DISC1 inducen un mayor número de gránulos de estrés por cada una de ellas. A) Microscopía confocal. Rojo: eIF3h (marcador SGs), Azul: Hoechst, Verde: GFP. Aumento 63X. B) Cuantificación del número de gránulos de estrés por cada célula, los datos presentados corresponden a la media de cada réplica, n=4. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). Fuente: Elaboración propia.



A)



B)



**Figura 19: DISC1 es necesario para disminuir el número de gránulos de estrés inducidos por arsenito de sodio sodio al analizarse usando CRISPR/Cas9.** Se evaluó el efecto de la menor expresión de DISC1 sobre el número de gránulos de estrés formado por cada célula. La microscopía confocal de células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> tratadas con arsénico permite distinguir que aquellas células que expresan menores niveles de DISC1 (Clon 1) inducen un mayor número de gránulos de estrés por cada una de ellas que su control (Clon 2). A) Microscopía confocal representativa. Rojo: eIF3h (marcador SGs), Azul: Hoechst, Verde: GFP. Aumento 60X.. B) Cuantificación del número de gránulos de estrés por célula, n=2. Fuente: Elaboración propia.

La disminución en el número de gránulos de estrés formados dependiente de DISC1 puede deberse al menos a dos motivos. La mantención de la traducción dependiente de DISC1 puede inducir una menor concentración de mRNPs traduccionalmente inactivos y por ende un menor número de SGs ensamblados, pero también DISC1 podría inhibir la formación de gránulos de estrés de forma directa y con ello impedir una inhibición de la traducción más aguda.

Con el objetivo de dar sustento a alguna de estas dos posibilidades, se procedió a sobre-expresar eGFP-G3BP1 S149E, una mutante fosfo-mimética de G3BP1 que emula la fosforilación inhibitoria de esta proteína crucial en el ensamblaje de SGs. De este modo, se inhibió la capacidad de ensamblar gránulos de estrés y se evaluó la traducción de estas células cuando fueron tratadas con arsenito de sodio. Se encontró que el silenciamiento de DISC1 co-relaciona con menores niveles de traducción global, aun cuando se sobre-expresa G3BP1S149E (ver figura 20).

Estos resultados sugieren que la mantención de la síntesis de proteínas dependiente de DISC1 inhibe el número de gránulos de estrés durante el estrés formados durante el estrés oxidativo y no de forma inversa.





**Figura 20: La mantención de la traducción dependiente de DISC1 ocurriría de forma independiente a la dinámica de ensamblaje de SGs.** Evaluación del efecto de DISC1 sobre la traducción en células con deficiencias en el ensamblaje de SGs mediado por la sobre-expresión de GFP-G3BP1 S149E. A) Inmunofluorescencia de células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> transfectadas con GFP, GFP-G3BP1 o GFP-G3BP1 S149E. GFP: verde, TIA-1: rojo. Figura representativa, n=3. B) El silenciamiento de DISC1 inhibe la traducción ante la sobre-expresión de G3BP1 *wt* o S149E. Inmunocitoquímica. Se cuantificó la señal de péptidos marcados con puromicina en células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> mediante microscopía de epifluorescencia tras sobre-expresarse GFP-G3BP1-S149E durante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio. Figura representativa. n=2. Fuente: Elaboración propia.

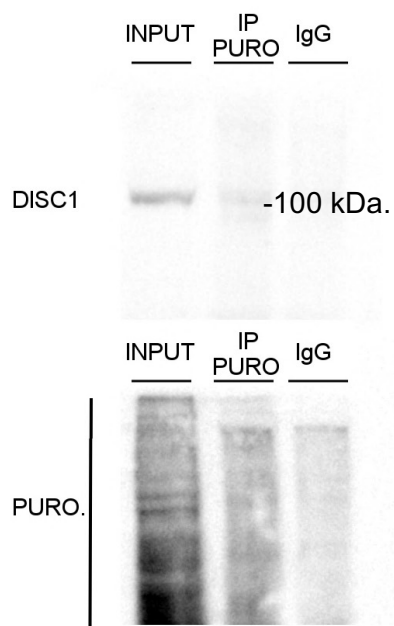


### **OBJETIVO 3: Caracterizar la interacción de DISC1 con componentes de la maquinaria traduccional.**

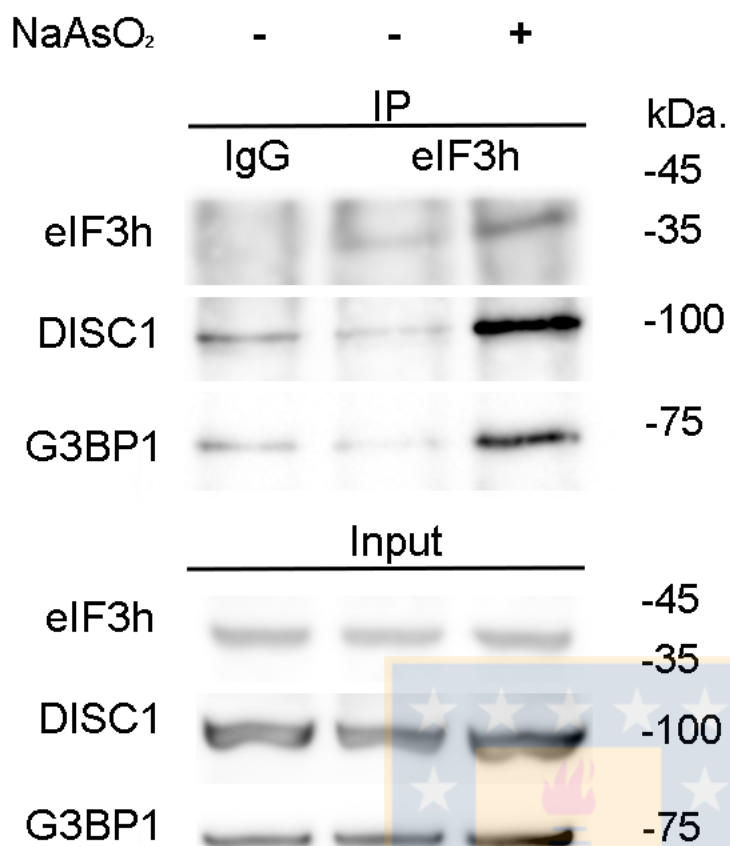
La interacción de DISC1 con ciertos componentes de la maquinaria traduccional ha sido evaluada recientemente. Con el objetivo de dilucidar si DISC1 interactúa con algún subconjunto de componentes de la maquinaria traduccional activa, se evaluó la co-inmunoprecipitación de DISC1 con las proteínas durante su síntesis. Se encontró a DISC1 co-inmunoprecipitando junto a las proteínas marcadas con puromicina durante su elongación (ver figura 21).

Un punto en común de la maquinaria traduccional activa e inactiva es eIF3, como se mencionó anteriormente. Mediante la co-inmunoprecipitación de eIF3h con DISC1 endógenos durante el tratamiento con arsenito de sodio en células HEK293, pudimos concluir que dicha interacción se mantiene a pesar de que la síntesis proteica es inhibida drásticamente en estas condiciones (ver figura 22).

Esta interacción respalda aún más la participación de DISC1 en la regulación de la traducción, ya que eIF3 es un factor de inicio prácticamente indispensable para el mecanismo canónico de inicio de la traducción, a la vez que es un marcador obligado de los gránulos de estrés.



**Figura 21: DISC1 interactúa con las proteínas en proceso de síntesis.** Se evaluó la co-inmunoprecipitación de DISC1 endógeno con el conjunto de proteínas marcadas con puromicina en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>. *Western Blot* desde co-inmunoprecipitación usando anti-puromicina. DISC1 endógeno y proteínas marcadas con puromicina. Figura representativa, n=3. Fuente: Elaboración propia.

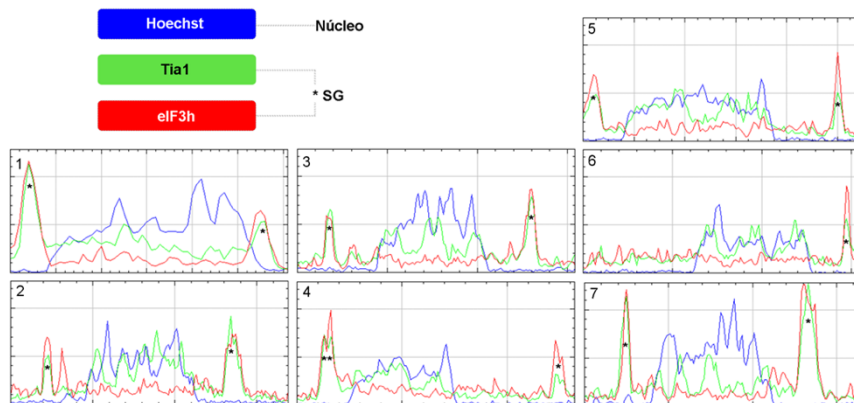
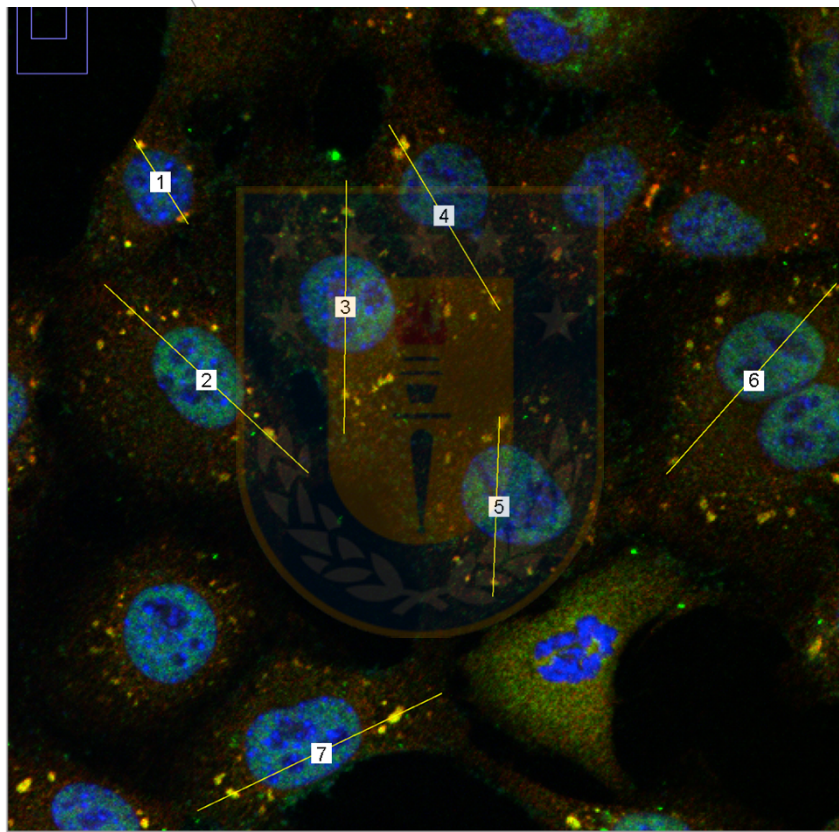
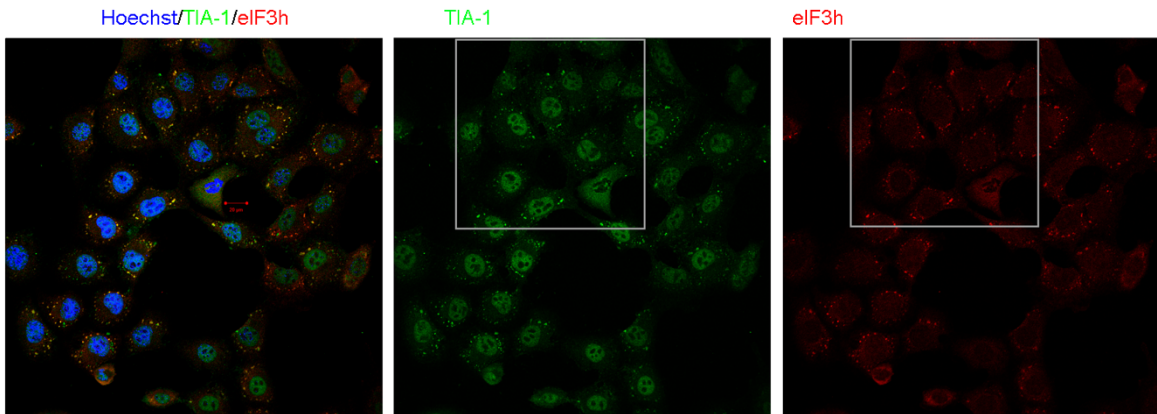


**Figura 22: eIF3h interactúa con DISC1 y G3BP1 durante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio en células HEK293.** Se evaluó la co-inmunoprecipitación de eIF3h junto a DISC1 y G3BP1, marcador de gránulos de estrés en células HEK293 tratadas con arsenito de sodio. *Western Blot* desde co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas eIF3h, DISC1 y G3BP1 usando anti-eIF3h. n=2. Fuente: Elaboración propia.

Mediante microscopía confocal se encontró que DISC1 endógeno no es enriquecido en gránulos de estrés, encontrándose principalmente fuera de estas estructuras, las que fueron identificadas como SGs por el doble marcaje con TIA-1 y eIF3h (ver figura 23). La exclusión de DISC1 de los gránulos de estrés fue corroborada por microscopía de súper-resolución, tras analizarse la localización de DsRed-DISC1 fuera de los gránulos de estrés (focos citoplasmáticos de TIA-1, ver figura 24). También se evaluó la posible interacción de DISC1 con los cuerpos de procesamiento, o PBs (Processing Bodies) comparando la señal de Ds-Red-DISC1 con GFP-Dcp1a mediante microscopía confocal, descartando también esta posibilidad (ver figura 25).

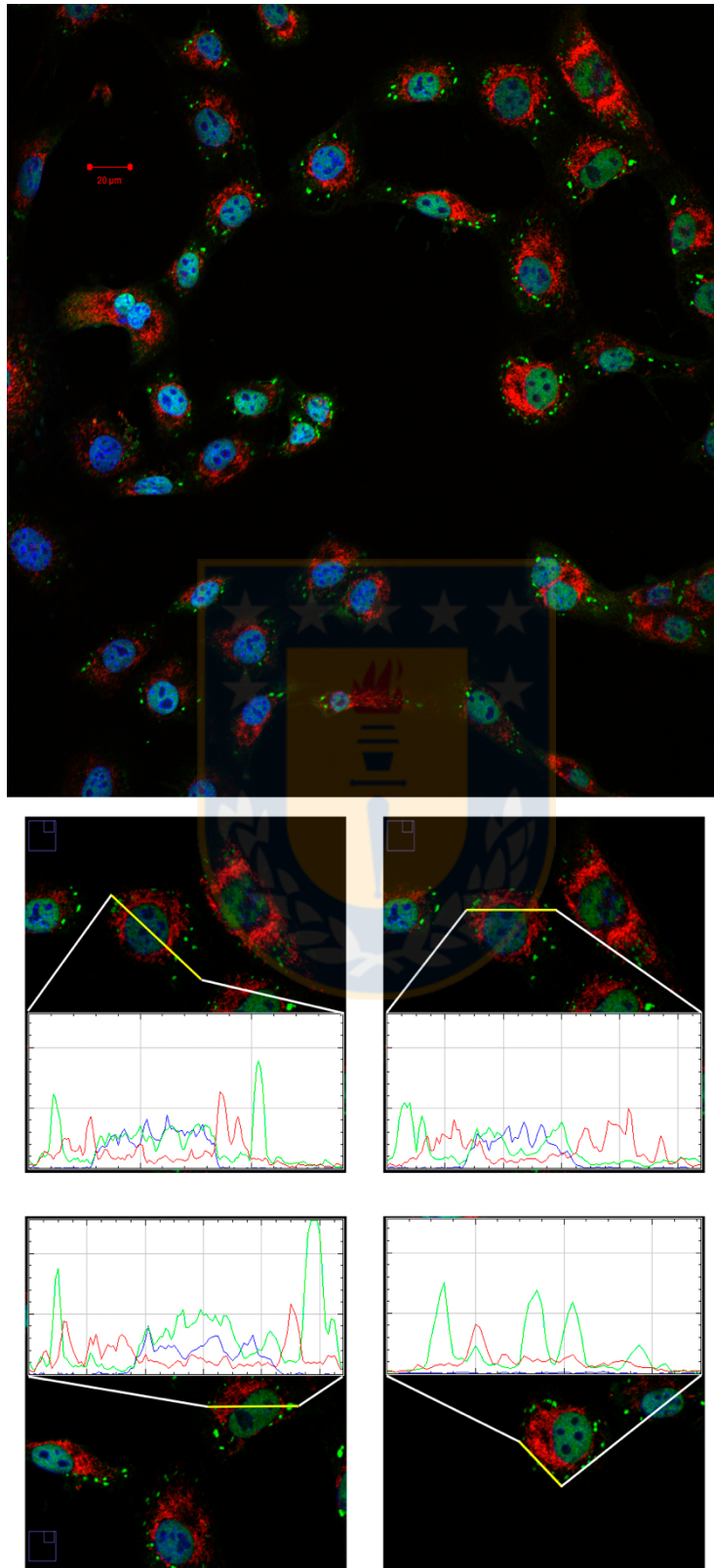


A)



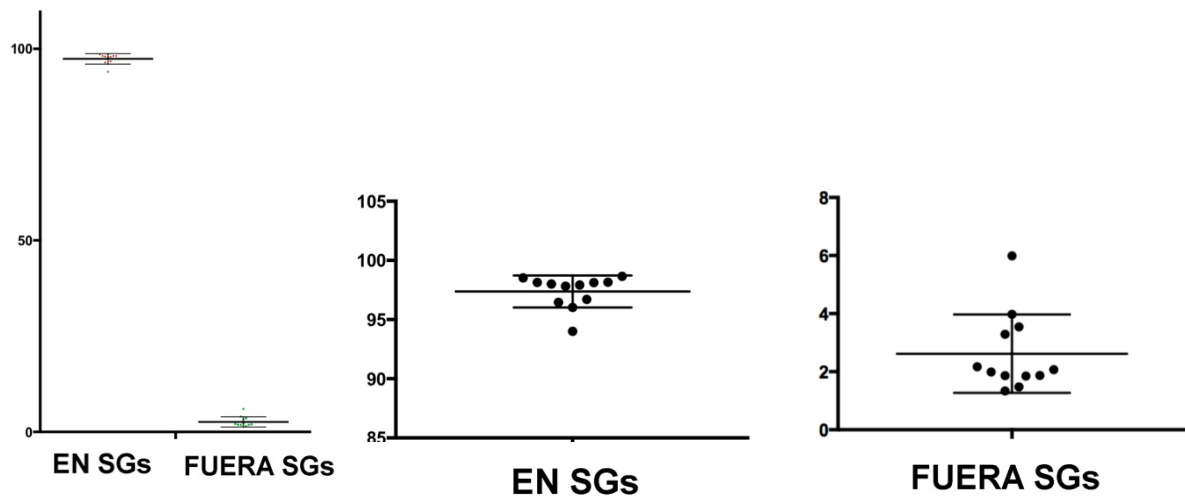
B)

DISC1/TIA1/HOECHST





C)



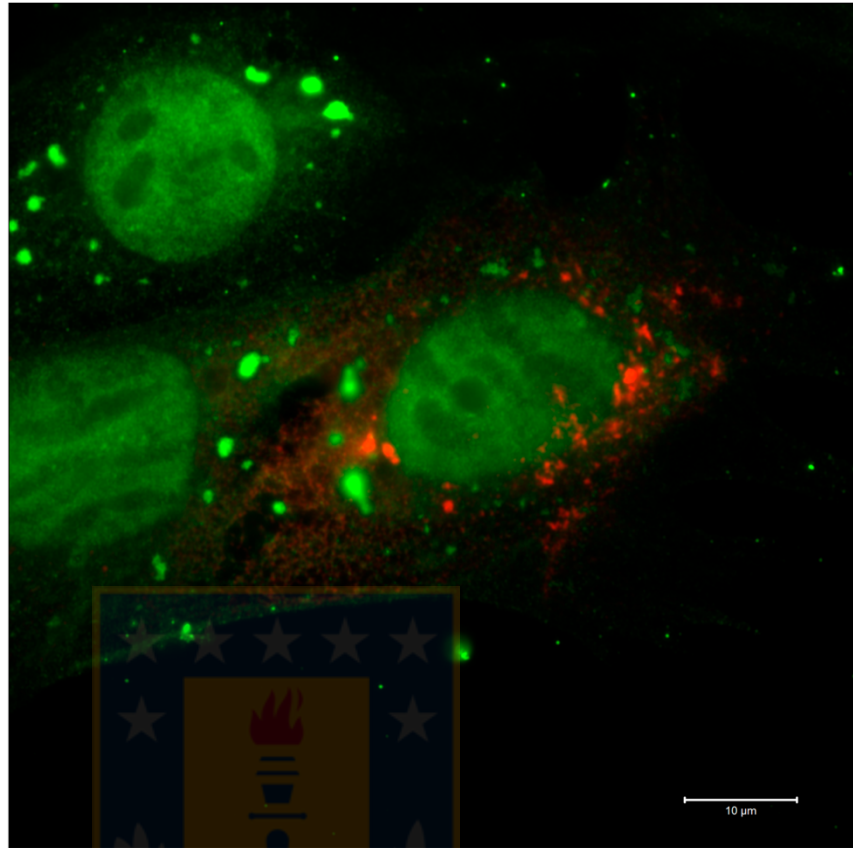
**Figura 23: DISC1 no es incorporado preferencialmente en gránulos de estrés.** La inclusión de DISC1 endógeno en gránulos de estrés fue evaluada utilizando microscopía confocal y el histograma de la señal indirecta de DISC1 y Tia1 endógenos obtenido desde la herramienta “RGB profiler” en ImageJ. La señal de cada canal se analizó a lo largo de la línea amarilla. DISC1 se encontró enriquecido en forma peri-nuclear pero con una distribución diferente a la de los SGs (picos verdes en los histogramas), imágenes correspondientes a células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> tratadas con arsenito de sodio. A) Microscopía confocal. Co-localización de eIF3h y Tia1 en SGs inducidos por arsenito de sodio. Hoechst: azul, Tia1: verde, eIF3h: rojo B) Microscopía confocal. Hoechst: azul, DISC1: rojo, Tia1: verde. Figuras representativas de tres experimentos independientes. C) Cuantificación de la señal de DISC1 endógeno presente en gránulos de estrés a través de microscopía confocal. DISC1 fue encontrado principalmente fuera de gránulos de estrés, a pesar de que una pequeña fracción de su señal sí co-localiza con Tia1 endógeno tras inducirse los gránulos de estrés con arsenito de sodio en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>. Figura representativa. n=3. Fuente: Elaboración propia.



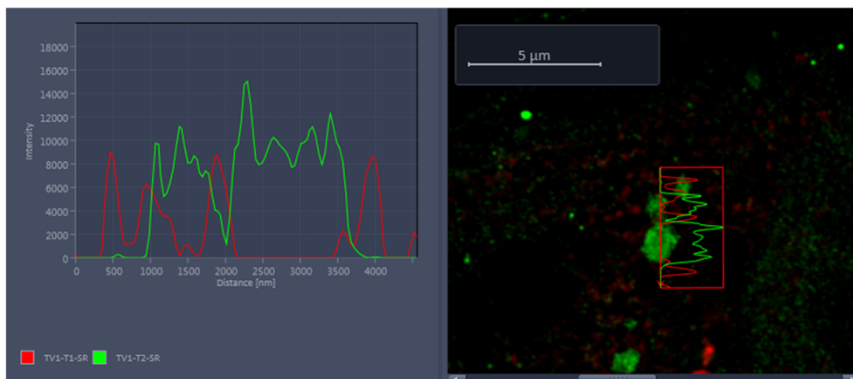
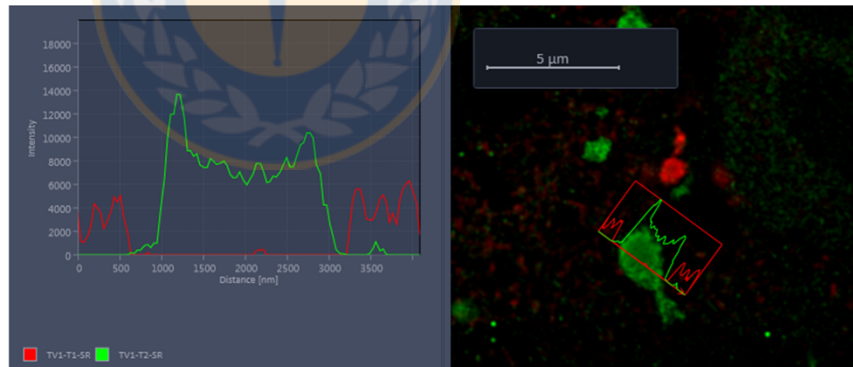
A)

DsRed-DISC1/TIA-1

SEÑAL  
EN BRUTO



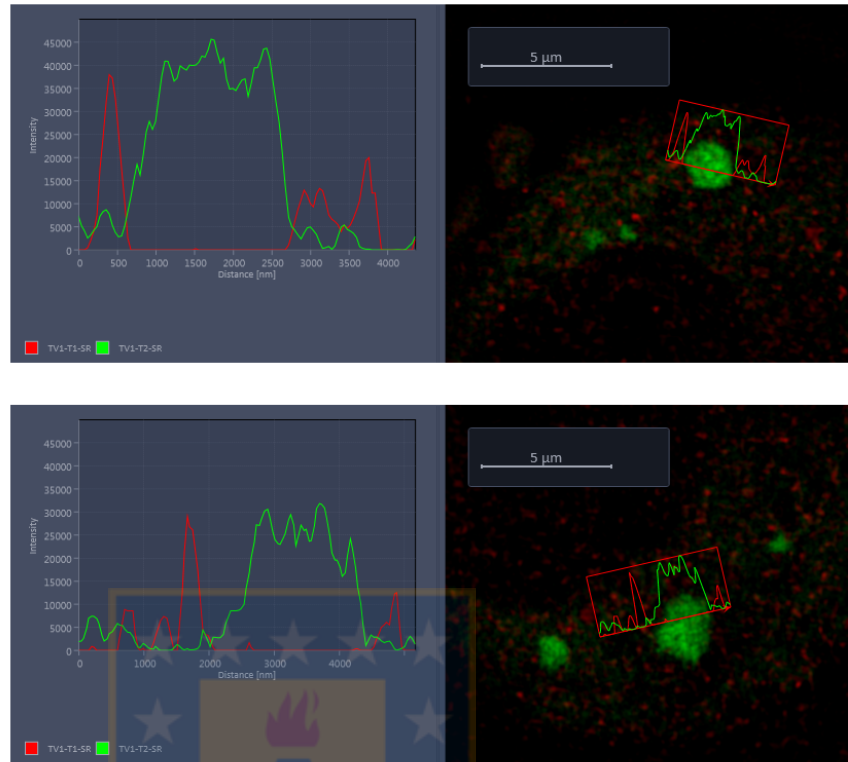
SEÑAL  
DEPURADA  
SÚPER  
RESOLUCIÓN



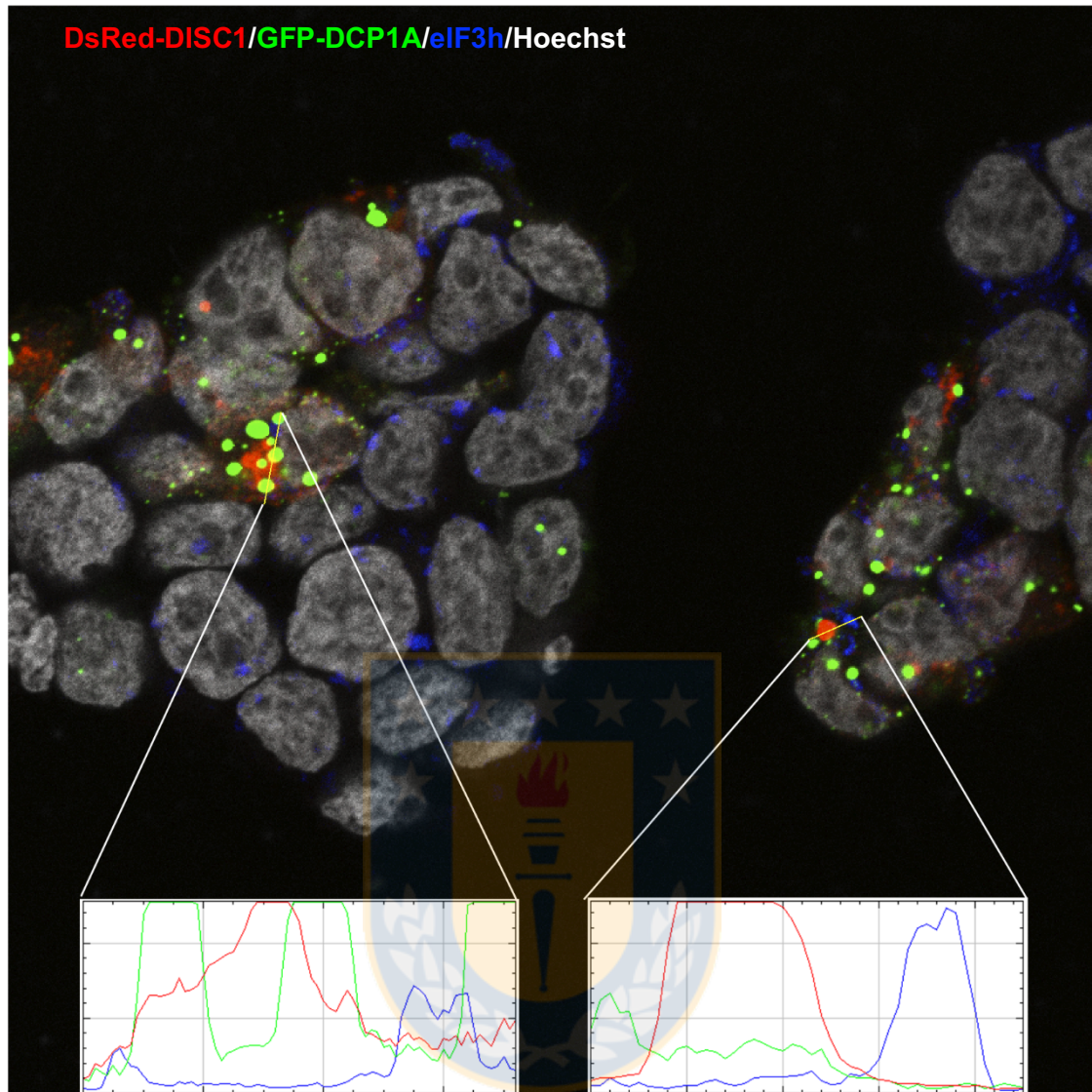
B)

SEÑAL DEPURADA  
SÚPER RESOLUCIÓN

DsRed-DISC1/GFP-G3BP1



**Figura 24: DISC1 reside fuera de los gránulos de estrés.** La co-localización de DISC1 con los SGs fue corroborada mediante microscopía de súper resolución en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> y HEK293 luego del tratamiento con arsenito de sodio. El análisis de los histogramas fue obtenidos desde cada señal permite distinguir que DISC1 no co-localiza con los gránulos de estrés refinados por el procesamiento de la imagen de microscopía de súper-resolución. A) DsRed-DISC1: Rojo, TIA-1 endógeno: verde en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>. B) DsRed-DISC1: Rojo, GFP-G3BP1: verde en células HEK293 n=2. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 25: DISC1 no es incorporado preferencialmente en cuerpos de procesamiento (PBs).** DISC1 fue encontrado principalmente fuera de cuerpos de procesamiento en células HEK293 luego del tratamiento con arsenito de sodio. El análisis de los histogramas entregados por la herramienta “RGB profiler” de ImageJ permite distinguir que los focos de DISC1 no colocalizan con los PBs refinados por el procesamiento de la imagen de súper-resolución, ni tampoco con los focos de eIF3h correspondientes a gránulos de estrés. Microscopía confocal: GFP-DCP1a: verde, DsRed-DISC1: rojo, eIF3h: azul, Hoechst: blanco. Figura representativa, n=3. Fuente: Elaboración propia.

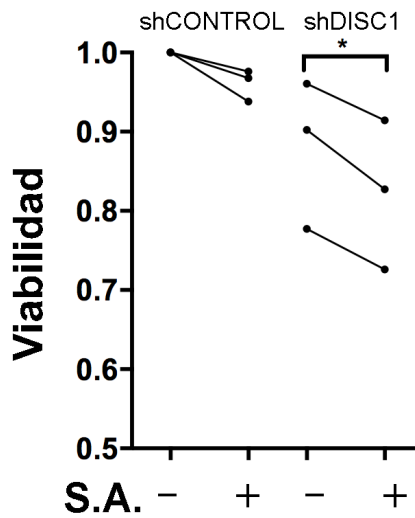
La exclusión de DISC1 de los agregados citoplasmáticos donde reside la maquinaria traduccional inactiva, la conservada interacción de DISC1 junto a eIF3 activo e inactivo, el no requerimiento del fenómeno de ensamblaje de gránulos de estrés para la mantención de la síntesis de proteínas dependiente de DISC1 y su aparente interacción con los péptidos marcados con puomicina, permiten proponer a DISC1 como un componente relevante para la regulación de la traducción durante el estrés oxidativo.



**OBJETIVO 4: Determinar si DISC1 ejerce un rol cito-protector durante el estrés.**

La inhibición global de la traducción, además de permitir una correcta adecuación de la expresión génica que responda al contexto celular en que se encuentren las células, permite disminuir el gasto energético que conlleva una activa síntesis de proteínas cuando las condiciones son adversas, favoreciendo la viabilidad celular. Por ello, evaluamos el rol de DISC1 en la viabilidad cuantificando la tinción de cristal violeta retenida por las células *Tsc2* *-/-* sometidas a estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio. El tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> 0,5 mM redujo la viabilidad celular tras 45 minutos de tratamiento sólo en células en que DISC1 había sido silenciado previamente (ver figura 26).



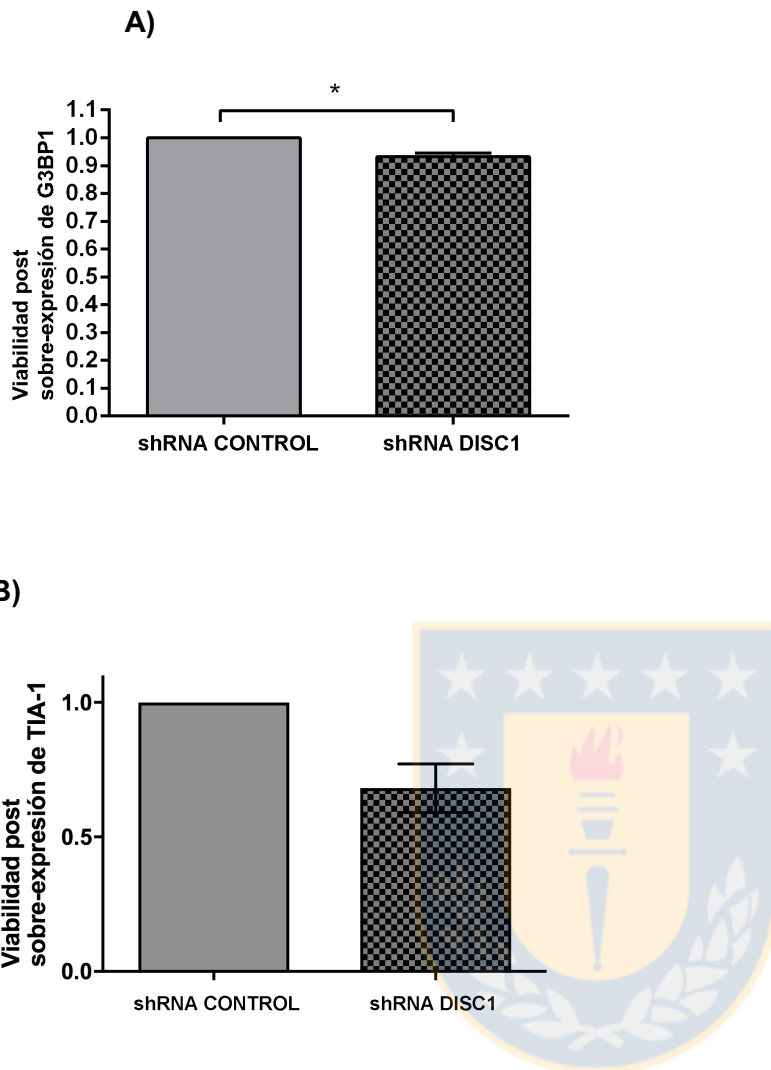


**Figura 26: DISC1 es necesario para promover la viabilidad celular ante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio.** Se evaluó la viabilidad celular mediante tinción por cristal violeta de células con menor expresión de DISC1 tras el tratamiento mencionado. El tratamiento con arsenito de sodio sólo indujo una disminución en la viabilidad celular en células MEF *Tsc2* *-/-* con silenciamiento de DISC1. Normalización de la absorbancia proveniente del tinte cristal violeta retenido por células incubadas en cada condición con respecto a la absorbancia de las células sin incubación con arsenito de sodio que fueron transfectadas con un shRNA no relacionado (1=100% viabilidad relativa). Los datos presentados corresponden a la media de cuatro experimentos independientes. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). Fuente: Elaboración propia.

La sobre-expresión de proteínas “core” del gránulo de estrés permite el ensamblaje de estas estructuras de forma crónica, condición en la cual la viabilidad celular puede encontrarse comprometida. Ya que DISC1 es necesario para mantener la síntesis de proteínas durante el estrés oxidativo, condición en que los gránulos de estrés pueden ser ensamblados, y a que DISC1 también permite mantener la traducción cuando G3BP1 es sobre-expresado, se evaluó el rol de DISC1 en la viabilidad celular en condiciones crónicas de ensamblaje de gránulos de estrés, gracias a la sobre-expresión de G3BP1. A través de un ensayo de XTT, que permite co-relacionar la viabilidad celular con la actividad mitocondrial, se encontró que DISC1 promueve la viabilidad tras la sobre-expresión de G3BP1 (ver figura 27). Esta observación se corroboró al encontrarse que DISC1 también es necesario para promover la viabilidad celular cuando TIA-1 es sobre-expresada en vez de G3BP1 para inducir la formación de gránulos de estrés.





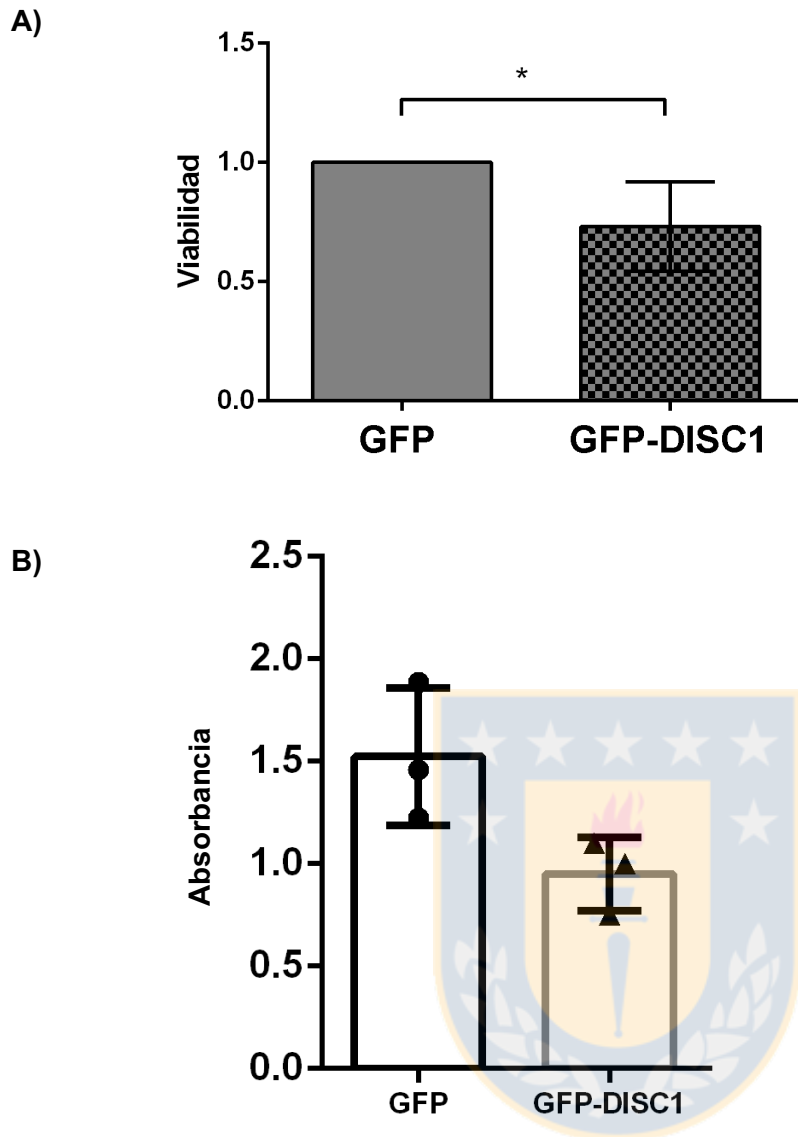


**Figura 27: DISC1 es necesario la viabilidad celular tras la inducción crónica de gránulos de estrés.** Se evaluó la viabilidad celular luego de sobre-expresar G3BP1 Y Tia1 en el contexto de menor expresión de DISC1. A) ensayo de XTT. Viabilidad celular relativa de células sobre-expresando G3BP1 en comparación a las transfectadas con vector vacío, en condiciones de menor expresión de DISC1. (1=100% viabilidad relativa) n=4. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). B) ensayo de XTT. Viabilidad celular relativa de células sobre-expresando Tia1 en comparación a las transfectadas con vector vacío, en condiciones de menor expresión de DISC1. Figura representativa, n=2. Fuente: Elaboración propia.



Ya que DISC1 es necesario para promover la síntesis proteica y la viabilidad celular durante contextos desfavorables como el estrés oxidativo o una inducción crónica de gránulos de estrés, se evaluó si la sobre-expresión de DISC1 pudiera corresponder a un factor citoprotector. Antes de evaluar dicho rol, se procedió a evaluar la inocuidad de la sobre-expresión de DISC1 en células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> a través de la cuantificación de la incorporación del tinte cristal violeta y de ensayos de viabilidad usando la aproximación de XTT (ver figura 28). Se encontró que la sobre-expresión de DISC1 per-se es citotóxica, al menos al medirse por XTT, ya que mediante incorporación de cristal violeta se aprecia la tendencia pero no resulta tener significancia estadística. Fuente: Elaboración propia.



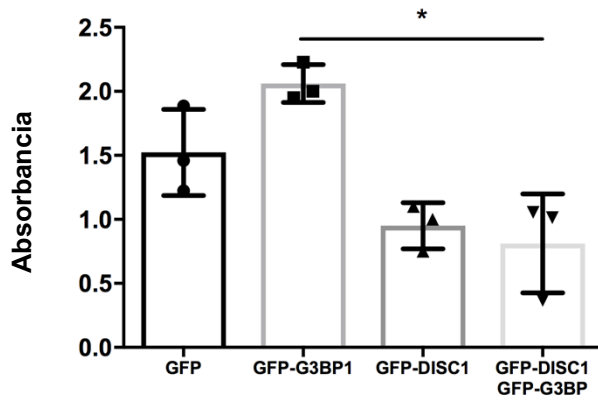


**Figura 28: La sobre-expresión de DISC1 es citotóxica.** La sobre-expresión de GFP-DISC1 disminuye la viabilidad celular sin necesidad de realizar otro tratamiento. A) Ensayo de XTT. Viabilidad celular expresada como la absorbancia obtenida desde células sobre-expresando GFP-DISC1 normalizada por la obtenida desde células expresando GFP (1=100% viabilidad relativa) n=4. B) Tinción por cristal violeta. Absorbancia obtenida desde la tinción de células sobre-expresando GFP-DISC1 y desde células expresando GFP. n=3. Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). Fuente: Elaboración propia.

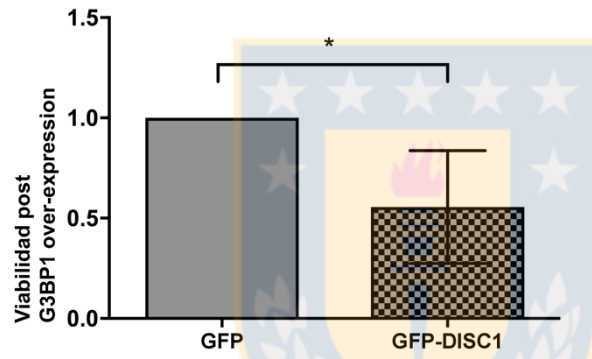
Posteriormente, se evaluó si la sobre-expresión de DISC1, a pesar de la observación anterior, favorece la viabilidad celular ante condiciones desfavorables como la estimulación crónica de la formación de gránulos de estrés mediada por la sobre-expresión de G3BP1 (ver figura 29). La sobre-expresión de DISC1 resultó ser desfavorable para la viabilidad celular en este contexto, a través del análisis de la tinción por cristal violeta y ensayos de XTT. El efecto desfavorable en la viabilidad celular fue corroborado también durante la sobre-expresión de TIA-1 mediante ensayos de XTT, en donde a diferencia de G3BP1, la sobre-expresión de TIA-1 per-se resultó en una disminución de la viabilidad celular.



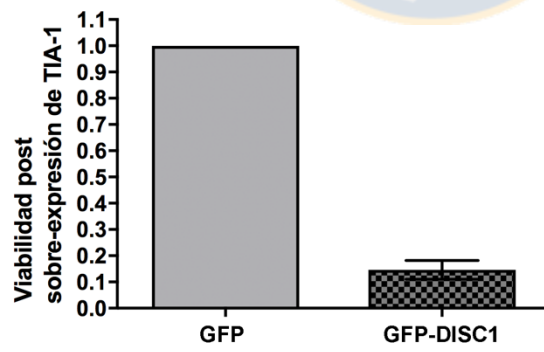
A)



B)



C)



**Figura 29: La sobre-expresión de DISC1 disminuye la viabilidad celular tras la inducción crónica de gránulos de estrés.** La sobre-expresión de DISC1 disminuye la viabilidad celular tras la sobre-expresión de proteínas nucleadoras de gránulos de estrés como G3BP1 o TIA-1. A) Tinción por cristal violeta. Viabilidad celular expresada como absorbancia del tinte cristal violeta retenido en cada condición, n=3. B) ensayo de XTT. Se graficó la variación de la viabilidad post sobre-expresión de G3BP1 de células que sobre-expresan GFP-DISC1 en relación a la disminución en la viabilidad que sufrieron las células producto de la sobre-expresión de G3BP1 y GFP (1=100% viabilidad). n=4. Los datos presentados en A) y B) corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Análisis estadístico: *t-test* no paramétrico, ( $P < 0.05$ ). C) Se realizó la misma comparación en células sobre-expresando TIA-1-flag en vez de GFP-G3BP1. Figura representativa de dos experimentos. Fuente: Elaboración propia.



## V. DISCUSIÓN

DISC1, tal como otras proteínas scaffold, tiene muchos interactores reportados y se ha encontrado involucrada en diversos fenómenos celulares y moleculares. Desde su descubrimiento como un factor de riesgo para enfermedades como la esquizofrenia, diferentes procesos asociados a la función neuronal han sido asociados con esta proteína, como la proliferación de precursores neuronales, la migración de neuronas hipocampales, la ramificación de dendritas, el tamaño del soma neuronal, entre otras (Yerabham et al. 2013). Por ello, no es de extrañar que algunos de los mecanismos moleculares en los cuales DISC1 participa tengan relevancia más allá de para el desarrollo y función neuronales, como en el control de la traducción.

En este trabajo, mediante diferentes estrategias, presentamos nuevos antecedentes que permiten identificar que DISC1 se encuentra involucrado en el control homeostático de la síntesis de proteínas durante el estrés oxidativo de la síntesis de proteínas durante el estrés oxidativo. En concreto, la expresión de DISC1 es requerida para mantener la traducción tras el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio, por peróxido de hidrógeno y tras la incubación con la droga quimio-terapéutica doxorubicina (ver figuras 13, 14 y 15). Estos hallazgos se complementan con el descubrimiento reciente de diferentes interactores de DISC1 que participan del proceso de traducción, que van desde el ARNm en sí, la subunidad h de eIF3 (Ogawa, Kasai, y Akiyama 2005) y diferentes proteínas que interaccionan con el ARN, como HZF, HnRNP U, SYNCRIP, PUR $\alpha$  y RACK1 (Tsuboi et. Al, 2015).

Debido a que DISC1 es una proteína intrínsecamente desordenada, que a través de su motivo ARM (Arginine Rich Motif) puede interactuar con el ARN directamente, tal como las proteínas nucleadoras de gránulos de estrés G3BP1 y TIA-1 y a que DISC1 es capaz de interactuar con una sub-unidad de eIF3, otro marcador estándar de los gránulos de estrés, particularmente de aquellos inducidos por el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio, evaluamos si DISC1 es un componente más de dichos RNPs (ver figuras 23 y 24). Encontramos que DISC1 endógeno es excluido de los gránulos de estrés, usando microscopía confocal (ver figura 23). Esta exclusión de DISC1 de los gránulos de estrés fue corroborada mediante microscopía de súper resolución, comparando la señal de DsRed-DISC1 con la de GFP-G3BP1 o bien la de TIA-1 endógeno (ver figura 24).

Debido a que previamente había sido descrito que DISC1 puede interactuar con eIF3h durante el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio y a que encontramos a DISC1 fuera de los SGs donde eIF3 reside, evaluamos si una fracción de eIF3h era capaz de interactuar con DISC1 a pesar de que no sea incluido en SGs. Mediante la co-inmunoprecipitación de eIF3h endógeno corroboramos que DISC1 sí interactúa con esta sub-unidad tras el tratamiento con arsenito de sodio, condición inductora de la formación de gránulos de estrés, mientras que además eIF3h interactúa con G3BP1 (ver figura 22). Esto sugiere la existencia de un sub-grupo de eIF3h que interactúa con DISC1 fuera de los gránulos de estrés, en donde podría participar de la mantención de la traducción durante el estrés oxidativo y otro sub-grupo que es incluido dentro de los SGs.

Ya que la interacción DISC1-eIF3h existe en células HEK 293 y a que previas observaciones muestran a DISC1 como un regulador negativo relevante para la actividad de Akt/mTORC1 estimulada por insulina en esta misma línea celular (Kim et al. 2009), podemos sugerir que el requerimiento de DISC1 para mantener la traducción durante el estrés oxidativo no es exclusivo para un contexto genético que conlleve un descontrol sobre Akt/mTORC1, como en las células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup>.

Debido a que DISC1 y eIF3h podrían formar parte de un RNP donde ocurra traducción, se evaluó si DISC1 interactúa con componentes de la maquinaria traduccional activa a través de la co-inmunoprecipitación de péptidos mientras son elongados gracias a su marcaje con puromicina. Esta aproximación demostró no ser idónea, ya que por un lado la interacción inespecífica de DISC1 y de las proteínas marcadas con puromicina con la resina impide realizar un análisis adecuado y a que además, el marcaje con puromicina induce la liberación del péptido siendo elongado desde el polisoma en donde se encuentra la maquinaria traduccional. Por ello, el uso de otras técnicas permitiría responder a esta interrogante, como el análisis de la presencia de DISC1 en la fracción de ARNm correspondiente a polisomas, desde una centrifugación usando un gradiente de sacarosa, por ejemplo.

Con respecto a los gránulos de estrés y el control traduccional, nuevos antecedentes han sido revelados. Por ejemplo, se conoce que las modificaciones post-traduccionales de algunas proteínas propias de los SGs cumplen un rol importante en la regulación del ensamblaje y desensamblaje de estas RNPs, como la fosforilación de G3BP1 en el residuo de serina S149, requerida para el desensamblaje de los gránulos de estrés mediante la solubilización de los agregados de esta proteína intrínsecamente desordenada (Kedersha et al. 2016).. El conocimiento de este mecanismo nos permitió analizar el efecto de la pérdida de DISC1 sobre los niveles de traducción en circunstancias en que el ensamblaje de los gránulos de estrés es deficiente producto de la sobre-expresión de una mutante



fosfo-mimética de G3BP1 (S149E). Gracias a los resultados obtenidos mediante esta estrategia podemos sugerir que la mantención de la traducción dependiente de la expresión de DISC1 ocurre de forma independiente a la dinámica de ensamblaje de los gránulos de estrés. A pesar de que producto de la sobre-expresión de esta proteína fosfo-mimética, efectivamente se inhibió el ensamblaje de gránulos de estrés de forma paralela al silenciamiento de DISC1, otras estrategias, como la sobre-expresión de usp10, proteína que media el desensamblaje de los gránulos a través de su interacción con G3BP1, o por ejemplo, el uso de células que carezcan de la expresión de G3BP1 o TIA1 sería de utilidad (Kedersha et al. 2016)..

La aparente independencia del efecto de la expresión de DISC1 sobre la traducción con respecto a la dinámica de ensamblaje de SGs respalda la existencia de un mecanismo en el cual DISC1, a través de sus interacciones con la maquinaria traduccional, promueve la síntesis proteica. Esto, en vez de que DISC1 sea requerido para inhibir la formación de gránulos de estrés durante el estrés oxidativo y que producto de ello se mantenga la traducción. Esta posibilidad es respaldada por el hecho de que DISC1 es requerido para mantener ciertos niveles de traducción tras la inhibición global de la síntesis proteica inducida por el tratamiento con peróxido de hidrógeno, doxorubicina y privación de suero, ya que las condiciones ensayadas no fueron capaces de inducir el ensamblaje de SGs detectables (datos del laboratorio).

El efecto del requerimiento de DISC1 sobre los niveles globales de traducción tras el estrés oxidativo, entre otros, es aparentemente opuesto al de esperarse producto de la modulación negativa de la vía Akt-mTORC1 mediada por DISC1, pero destaca la relevancia del contexto celular sobre el control de procesos relevantes en el metabolismo. Esta correlación entre los niveles de expresión de DISC1 y la traducción detectable por el marcaje de las proteínas siendo elongadas en sí no es suficiente para poder asegurar que DISC1 estimula la traducción mediante su interacción con eIF3h, pero si son considerados otros antecedentes, como la exclusión de DISC1 junto a eIF3h de otro sub-grupo de eIF3h, incorporado en SGs, RNPs de ARNm silente, se puede sugerir que DISC1 se encuentra participando de algún mecanismo que afecta los niveles de traducción, cuyos efectos son detectables en condiciones de estrés oxidativo. Un interacto de eIF3h que tiene un efecto similar en la síntesis de proteínas al de DISC1 es METTL3, una enzima que cataliza la modificación N<sup>6</sup>-methyladenosina (m<sup>6</sup>A) en el ARNm. La interacción eIF3h-METTL3, específicamente, fue encontrada necesaria para estimular la traducción, aparentemente a través del favorecimiento de el reciclaje de ribosomas (Choe J et al. 2018). DISC1, al ser una proteína de andamiaje, podría facilitar el ensamblaje de distintos RNPs diferentes a los SGs o PBs, que son traduccionalmente silentes.

El requerimiento de DISC1 para mantener la síntesis de proteínas durante el estrés es otro ejemplo de cómo, a pesar de que la inhibición global de la síntesis de proteínas es necesaria para disminuir el gasto energético y dar prioridad a un grupo en particular de ARNm para ser traducidos, son requeridos mecanismos accesorios para sostener la traducción de estas moléculas. Otro aspecto a considerar con respecto al contexto en que DISC1 participa de la mantención de la síntesis de proteínas es que tras el estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio la traducción se encuentra globalmente inhibida en su etapa de inicio, debido a la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , por lo que aquellos transcritos cuya traducción se encuentra mantenida durante estas circunstancias probablemente requieran de un mecanismo cap-independiente para iniciar su traducción (Shirokikh y Preiss 2018, Hinnebusch 2017).

La relevancia de DISC1 para el desarrollo de patologías diferentes a la esquizofrenia se puede vislumbrarse también desde el efecto citoprotector de la expresión endógena de DISC1 en condiciones de estrés oxidativo. Esto debido a que este tipo de estrés es particularmente relevante en células en activa proliferación, como las cancerosas. Estas células deben enfrentarse a un contexto adverso, especialmente en el centro de un tumor sólido a medida que este crece y deben ser capaces de sobrellevar estas condiciones para seguir proliferando (Sosa V et al. 2013). Las células MEF *Tsc2* <sup>-/-</sup> han sido ampliamente utilizadas como modelo de enfermedades caracterizadas por un descontrol de la actividad de mTORC1, como la esclerosis tuberosa (Zhang H et al. 2003), por ello es que su elección para desvincular la función de DISC1 sobre la traducción de la regulación sobre la vía Akt-mTORC1 mediada por DISC1 y GIRDIN nos permite sugerir que la regulación de los niveles de expresión de DISC1 tiene implicancias para células altamente proliferativas, como en el cáncer.

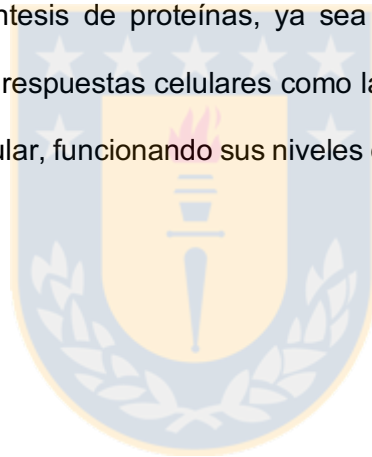
Con respecto nuestros hallazgos sobre la relevancia de DISC1 para mantener la viabilidad celular en aquellas condiciones en que los niveles endógenos de expresión de DISC1

fueron requeridos para mantener la síntesis de proteínas, también encontramos que DISC1 es necesario para mantener la viabilidad celular tras la estimulación crónica de la formación de gránulos de estrés gracias a la sobre-expresión de nucleadores de SGs como G3BP1 y TIA-1, incluso en ausencia de tratamiento con arsenito de sodio. Esto es resulta potencialmente relevante para el estudio de los fenómenos que subyacen el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que como fue mencionado previamente, la formación de agregados citoplasmáticos es una característica común encontrada en los cerebros post-mortem de pacientes de diferentes enfermedades como Alzheimer y Parkinson. Con respecto a ELA y demencia frontotemporal (FTLD) (Zhao M et al. 2018), sus agregados citoplasmáticos pueden co-localizar con diferentes marcadores de gránulos de estrés y la expresión de proteínas con mutaciones propias del ELA familiar, que interesantemente poseen dominios de unión a ARN, también induce la formación de agregados citoplasmáticos que presentan marcadores de gránulos de estrés. Por ello, la regulación de los niveles de expresión de DISC1 podría representar un nuevo enfoque para el estudio de estrategias terapéuticas que permitan enfrentar el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas.

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

- Los hallazgos obtenidos mediante ensayos de marcaje de proteínas con puromicina sustentan la participación de DISC1 en algún mecanismo capaz de mantener la traducción tras el estrés oxidativo. Una función que junto a la inhibición de GIRDIN previamente descubierta le permitiría a DISC1 regular negativa- o positivamente el fenómeno de acuerdo al contexto celular.
- DISC1 es necesario para disminuir el número de gránulos de estrés encontrados tras el estrés oxidativo. El mantenimiento de la traducción dependiente de DISC1 durante la respuesta celular al arsenito de sodio ante la sobre-expresión de G3BP1-S149E sugiere que la inhibición de la formación de SGs se debe a una mantención de la traducción y no a un control directo sobre la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de SGs.
- Durante la respuesta al estrés oxidativo, circunstancia en la que DISC1 es requerido para mantener la síntesis de proteínas, DISC1 reside fuera de los gránulos de estrés. Lo que fue comprobado mediante microscopía de súper resolución, incluso sobre-expresando DISC1 y G3BP1.

- La prescindencia de la dinámica de ensamblaje de SGs para la mantención de la traducción dependiente de DISC1, y la posible interacción de DISC1 con las proteínas marcadas con puromicina y/o con eIF3, incluso durante el estrés oxidativo, sugieren que es mediante dichas interacciones que se promueve directamente la mantención de la síntesis de proteínas. Nuevos antecedentes sustentan esta posibilidad.
- DISC1 es necesario para promover la viabilidad celular ante condiciones de estrés oxidativo, pero también durante la inducción crónica de gránulos de estrés, incluso en ausencia de estrés oxidativo. Este hallazgo sugiere que la participación de DISC1 en la mantención de la síntesis de proteínas, ya sea durante el estrés oxidativo o la estimulación crónica de respuestas celulares como la formación de SGs, es relevante para la homeostasis celular, funcionando sus niveles endógenos de expresión como un factor cito-protector.



## VII. AGRADECIMIENTOS

- Primero, quisiera agradecer a mi tutor, el doctor Ariel Castro por haberme apoyado desde un comienzo en un proyecto que no se asemeja al resto de nuestro equipo de trabajo. A la doctora Roxana Pincheira, que a pesar de no ser mi tutora siempre ha estado dispuesta a ayudar.
- También quiero agradecer al financiamiento estatal de mis estudios, gracias a la beca CONICYT Doctorado Nacional y a la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por financiar el décimo semestre del programa. También al departamento de Bioquímica y Biología Molecular por confiar en mí como colaborador este 2018. A los proyectos FONDECYT 1120923 y 1160731 del doctor Ariel Castro y FONDECYT 1110821, 1151031 de la doctora Roxana Pincheira.
- Personalmente necesito agradecer a mi familia, a mi madre Margarita, que a pesar de todas las adversidades jamás quiso hacerme sentir preocupado viviendo lejos de ella. A mi hermana Carolina, que la acompañó en todo momento sin recriminarme por estar más distante de lo que hubiese querido. A mi padre Fabián por apoyarse siempre durante ya casi once años fuera de casa. A mi Familia en Concepción, Principalmente a Alejandro, Carlos, Alfoncina, Baldur y muchos más, que nunca me dejaron solo.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Arime Y, Fukumura R, Miura I, Mekada K, Yoshiki A, Wakana S, Gondo Y, Akiyama K. *Behav Brain Funct.* 2014 Dec 8;10:45. "Effects of Background Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Disc1 L100P Behavioral Phenotype Associated with Schizophrenia in Mice."

Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valásek L, Donahue TF, Hinnebusch AG. Hinnebusch et al. *EMBO J.* 2001 May 1;20(9):2326-37. "Multiple Roles for the C-Terminal Domain of EIF5 in Translation Initiation Complex Assembly and GTPase Activation."

Berman SM, Kuczenski R, McCracken JT, London ED. *Mol Psychiatry.* 2009 Feb;14(2):123-42. "Potential Adverse Effects of Amphetamine Treatment on Brain and Behavior: A Review."

Bogorad AM, Lin KY, Marintchev A. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 16;45(20):11962-11979. "Novel Mechanisms of EIF2B Action and Regulation by EIF2 $\alpha$  Phosphorylation."

Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH Jr, Hayward LJ. *Hum Mol Genet.* 2010 Nov 1;19(21):4160-75. "Mutant FUS Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Incorporate into Stress Granules."

Bradshaw NJ, Ogawa F, Antolin-Fontes B, Chubb JE, Carlyle BC, Christie S, Claessens A, Porteous DJ, Millar JK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 26;377(4):1091-6. "DISC1, PDE4B, and NDE1 at the Centrosome and Synapse."

Bradshaw, Nicholas J, and David J Porteous. *Neuropharmacology.* 2012 Mar;62(3):1230-41. "DISC1-Binding Proteins in Neural Development, Signalling and Schizophrenia."

Buchan JR, Parker R. *Mol Cell.* 2009 Dec 25;36(6):932-41. "Eukaryotic Stress Granules : The Ins and Out of Translation." *Mol Cell* 36(6).

Choe J, Lin S, Zhang W, Liu Q, Wang L, Ramirez-Moya J, Du P, Kim W, Tang S, Sliz P, Santisteban P, George RE, Richards WG, Wong KK, Locker N, Slack FJ, Gregory RI. *Nature.* 2018 Sep;561(7724):556-560. "mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis".

Dahoun T, Trossbach SV, Brandon NJ, Korth C, Howes OD. *Transl Psychiatry.* 2017 Jan 31;7(1):e1015. "The Impact of Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) on the Dopaminergic System: A Systematic Review."

Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. *Neuron.* 2009 Sep 24;63(6):774-87. "Roles of Disrupted-in-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus."



Fonseca BD, Smith EM, Yelle N, Alain T, Bushell M, Pause A. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Dec;36:102-12. "The Ever-Evolving Role of MTOR in Translation."

Gururajan A, van den Buuse M. *J Neurochem.* 2014 May;129(3):377-87. "Is the MTOR-Signalling Cascade Disrupted in Schizophrenia?"

Hay N, Sonenberg N. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1926-45. "Upstream and Downstream of MTOR."

He H, von der Haar T, Singh CR, Li M, Li B, Hinnebusch AG, McCarthy JE, Asano K. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(15):5431-45. "The Yeast Eukaryotic Initiation Factor 4G (EIF4G) HEAT Domain Interacts with EIF1 and EIF5 and Is Involved in Stringent AUG Selection."

Hershey JW, Sonenberg N, Mathews MB. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Dec 1;4(12). "Principles of Translational Control: An Overview."

Hinnebusch AG. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:779-812. 2014. "The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation."

Hinnebusch AG. *Trends Biochem Sci.* 2017 Aug;42(8):589-611. "Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation."

Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson JF, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A. *Nature.* 2011 May 5;473(7345):92-6. "DISC1-Dependent Switch from Progenitor Proliferation to Migration in the Developing Cortex."

Jennings MD, Pavitt GD. *Cell Cycle.* 2014;13(17):2660-5. "A New Function and Complexity for Protein Translation Initiation Factor EIF2B."

Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. *Neurosci Lett.* 2007 May 7;417(3):316-21. "Association Analysis of ATF4 and ATF5, Genes for Interacting-Proteins of DISC1, in Bipolar Disorder." *Neuroscience Letters* 417(3): 316–21.

Kamiya A, Tan PL, Kubo K, Engelhard C, Ishizuka K, Kubo A, Tsukita S, Pulver AE, Nakajima K, Cascella NG, Katsanis N, Sawa A. *Arch Gen Psychiatry.* 2008 Sep;65(9):996-1006. "Recruitment of PCM1 to the Centrosome by the Cooperative Action of DISC1 and BBS4: A Candidate for Psychiatric Illnesses."

Kedersha N, Panas MD, Achorn CA, Lyons S, Tisdale S, Hickman T, Thomas M, Lieberman J, McInerney GM, Ivanov P, Anderson P. *J Cell Biol.* 2016 Mar 28;212(7):845-60 "G3BP-Caprin1-USP10 Complexes Mediate Stress Granule Condensation and Associate with 40S Subunits."

Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. *Trends Biochem Sci.* 2013 Oct;38(10):494-506. "Stress Granules and Cell Signaling: More than Just a Passing Phase?"

Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL. *Neuron*. 2009 Sep 24;63(6):761-73. "DISC1 Regulates New Neuron Development in the Adult Brain via Modulation of AKT-MTOR Signaling through KIAA1212."

Kroemer G, Mariño G, Levine B. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):280-93. "Autophagy and the Integrated Stress Response."

Kwiatkowski DJ. *Cancer Biol Ther*. 2003 Sep-Oct;2(5):471-6. "Rhebbling up MTOR."

Lasarge CL, Danzer SC. *Front Mol Neurosci*. 2014 Mar 14;7:18. "Mechanisms Regulating Neuronal Excitability and Seizure Development Following MTOR Pathway Hyperactivation."

Lipina TV, Niwa M, Jaaro-Peled H, Fletcher PJ, Seeman P, Sawa A, Roder JC. *Genes Brain Behav*. 2010 Oct;9(7):777-89. "Enhanced Dopamine Function in DISC1-L100P Mutant Mice: Implications for Schizophrenia."

Lipina TV, Fletcher PJ, Lee FH, Wong AH, Roder JC. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Feb;38(3):423-36. "Disrupted-in-Schizophrenia-1 Gln31Leu Polymorphism Results in Social Anhedonia Associated with Monoaminergic Imbalance and Reduction of CREB and  $\beta$ -Arrestin-1,2 in the Nucleus Accumbens in a Mouse Model of Depression."

Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH. *Cell*. 2009 Mar 20;136(6):1017-31. "Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 $\beta$ /Beta-Catenin Signaling."

Menon S1, Manning BD. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 2:S43-51. "Common Corruption of the MTOR Signaling Network in Human Tumors."

Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. *Hum Mol Genet*. 2000 May 22;9(9):1415-23. "Disruption of Two Novel Genes by a Translocation Co-Segregating with Schizophrenia."

Mitchell SF, Parker R. *Mol Cell*. 2014 May 22;54(4):547-58. "Principles and Properties of Eukaryotic MRNPs." *Molecular cell* 54(4): 547–58.

Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D, Nakanishi Y, Murai M, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K. *Learn Mem*. 2007 Mar 2;14(3):117-25. "Dopamine D1 Receptors Regulate Protein Synthesis-Dependent Long-Term Recognition Memory via Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 in the Prefrontal Cortex."

Ogawa F, Kasai M, Akiyama T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 16;338(2):771-6. "A Functional Link between Disrupted-In-Schizophrenia 1 and the Eukaryotic Translation Initiation Factor 3."

Porteous DJ, Thomson P, Brandon NJ, Millar JK. *Biol Psychiatry*. 2006 Jul 15;60(2):123-31. "The Genetics and Biology of Disc1-An Emerging Role in Psychosis and Cognition."

Porteous D, Millar K. *Neuron*. 2009 Sep 24;63(6):711-3. "How DISC1 Regulates Postnatal Brain Development: Girdin Gets in on the AKT."

Reiling JH, Sabatini DM. *Mol Cell*. 2008 Mar 14;29(5):533-5. "Increased MTORC1 Signaling UPRegulates Stress."

Sachs NA, Sawa A, Holmes SE, Ross CA, DeLisi LE, Margolis RL. *Mol Psychiatry*. 2005 Aug;10(8):758-64. "A Frameshift Mutation in Disrupted in Schizophrenia 1 in an American Family with Schizophrenia and Schizoaffective Disorder."

Saxton RA, Sabatini DM. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976. "MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease."

Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. *Nat Methods*. 2009 Apr;6(4):275-7. "SUnSET, a Nonradioactive Method to Monitor Protein Synthesis."

Shirokikh NE, Preiss T. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018 Jul;9(4):e1473. "Translation Initiation by Cap-Dependent Ribosome Recruitment: Recent Insights and Open Questions."

Smith WB, Starck SR, Roberts RW, Schuman EM. Smith WB1, Starck SR, Roberts RW, Schuman EM. *Neuron*. 2005 Mar 3;45(5):765-79. "Dopaminergic Stimulation of Local Protein Synthesis Enhances Surface Expression of GluR1 and Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons."

Soares DC, Carlyle BC, Bradshaw NJ, Porteous DJ. *ACS Chem Neurosci*. 2011 Nov 16;2(11):609-632. "DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness."

Soda T, Frank C, Ishizuka K, Baccarella A, Park YU, Flood Z, Park SK, Sawa A, Tsai LH. *Mol Psychiatry*. 2013 Aug;18(8):898-908. "DISC1-ATF4 Transcriptional Repression Complex: Dual Regulation of the CAMP-PDE4 Cascade by DISC1."

Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):376-90. Oxidative stress and cancer: an overview.

Spilka R, Ernst C, Mehta AK, Haybaeck J. *Cancer Lett*. 2013 Oct 28;340(1):9-21. "Eukaryotic Translation Initiation Factors in Cancer Development and Progression."

Stoecklin G, Kedersha N. *Adv Exp Med Biol*. 2013;768:197-211. "Relationship of GW/P-Bodies with Stress Granules."

Taniuchi S, Miyake M, Tsugawa K, Oyadomari M, Oyadomari S. *Sci Rep*. 2016 Sep 16;6:32886. "Integrated Stress Response of Vertebrates Is Regulated by Four EIF2 $\alpha$  Kinases."

Thedieck K, Holzwarth B, Prentzell MT, Boehlke C, Kläsener K, Ruf S, Sonntag AG, Maerz L, Grellscheid SN, Kremmer E, Nitschke R, Kuehn EW, Jonker JW, Groen AK, Reth M, Hall MN, Baumeister R. Cell. 2013 Aug 15;154(4):859-74. "Inhibition of MTORC1 by Astrin and Stress Granules Prevents Apoptosis in Cancer Cells."

Thompson SR, Trends Microbiol. 2012 Nov;20(11):558-66. "Tricks an IRES Uses to Enslave Ribosomes."

Thomson PA, Malavasi EL, Grünewald E, Soares DC, Borkowska M, Millar JK. Front Biol (Beijing). 2013 Feb 1;8(1):1-31. "DISC1 Genetics, Biology and Psychiatric Illness."

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. Nature. 2012 May 2;485(7396):109-13. "A Unifying Model for MTORC1-Mediated Regulation of mRNA Translation."

Tsuboi D, Kuroda K, Tanaka M, Namba T, Iizuka Y, Taya S, Shinoda T, Hikita T, Muraoka S, Iizuka M, Nimura A, Mizoguchi A, Shiina N, Sokabe M, Okano H, Mikoshiba K, Kaibuchi K. Nat Neurosci. 2015 May;18(5):698-707 "Disrupted-in-Schizophrenia 1 Regulates Transport of ITPR1 mRNA for Synaptic Plasticity."

Uher R, Zwickler A. World Psychiatry. 2017 Jun;16(2):121-129. "Etiology in Psychiatry: Embracing the Reality of Poly-Gene-Environmental Causation of Mental Illness."

Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, Urwin H, Manser C, Miller CC, Hortobágyi T, Dragunow M, Rogelj B, Shaw CE. Hum Mol Genet. 2013 Jul 1;22(13):2676-88. "ALS Mutant FUS Disrupts Nuclear Localization and Sequesters Wild-Type FUS within Cytoplasmic Stress Granules."

Weber LA, Hickey ED, Baglioni C. J Biol Chem. 1978 Jan 10;253(1):178-83. "Influence of Potassium Salt Concentration and Temperature on Inhibition of mRNA Translation by 7-Methylguanosine5'-Monophosphate."

Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L. Cell. 2013 Feb 14;152(4):791-805. "Dual Specificity Kinase DYRK3 Couples Stress Granule Condensation/Dissolution to MTORC1 Signaling."

Wortham NC, Proud CG. Biochem Soc Trans. 2015 Dec;43(6):1234-40. "EIF2B: Recent Structural and Functional Insights into a Key Regulator of Translation."

Wu Q, Li Y, Xiao B. Gene. 2013 Apr 15;518(2):223-30. "DISC1-Related Signaling Pathways in Adult Neurogenesis of the Hippocampus."

Yerabham, Antony S.K., Oliver H, Weiergräber, Nicholas J, Bradshaw, and Carsten Korth. J Clin Invest. 2003 Oct;112(8):1223-33. "Revisiting Disrupted-in-Schizophrenia 1 as a Scaffold Protein." *Biological Chemistry*.

Zhang H, Cicchetti G, Onda H, Koon HB, Asrican K, Bajraszewski N, Vazquez F, Carpenter CL, Kwiatkowski DJ. J Clin Invest. 2003 Oct;112(8):1223-33. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR.

Zhao M, Kim JR, van Bruggen R, Park J. Park J. Mol Cells. 2018 Sep 30;41(9):818-829.. RNA-Binding Proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

