

L'HETEROCEPHALUS GLABER ENS AJUDA EN LA LLUITA CONTRA EL CÀNCER



ALUMNA: ZOÉ MEINI

DIRIGIT PER: FRAN GUEROLA

2N BATXILLERAT

INS VERDAGUER

BARCELONA GENER, 2014-2015

*“Si tengo mil ideas y sólo una termina por funcionar, me siento
satisfecho.” - Alfred Nobel-*

Nota d'agraïments

Primer de tot, voldria donar les gràcies de tot cor a les persones que m'han ajudat a fer possible aquest treball:

- A la meva tutora del treball Francisca Guerola, per haver-se mostrat tant pacient amb mi, i haver-me ofert la seva ajuda des del principi. Per haver-me dedicat el seu temps, tant per corregir el meu treball, com per motivar-me i donar-me idees.
- A la Marta Coronado per haver sigut la meva tutora durant la meva Estada a la UAB, i per haver-se mostrat tant oberta i disposada a ajudar-me sempre que ho necessités. Per haver tingut la paciència d'explicar-me conceptes, per haver-me dirigit la part pràctica del meu treball i per haver-me dedicat part del seu temps, tant els dimecres que he passat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), com el seu temps lliure en què hem mantingut contacte mitjançant missatges de text.
- Al doctor Antonio Barbadilla, per haver-me permès l'entrada a l'IBB i haver-m'hi proporcionat un ordinador per poder realitzar la part pràctica del meu treball. Així com els ànims que m'ha donat durant tota la meva Estada i el seu bon humor constant.
- Al programa Argó, gràcies al qual vaig poder accedir a la UAB.
- A l'investigador Emmanuel Compe per haver accedit a contestar la meva entrevista i dedicar-me part del seu temps amb converses telefòniques.
- Als meus pares i amics que m'han donat suport durant la realització del treball animant-me en els moments difícils.

ÍNDEX

1. Introducció.	6
2. Metodologia del treball.	9
3. Objectius.	14
4. Part teòrica.	15
4.1. Resultats de la recerca bibliogràfica.	15
4.1.1. Presentació de l'Heterocephalus glaber.	15
4.1.2. Presentació de l'àcid hialurònic.	22
5. Part pràctica.	26
5.1. Procediment.	26
5.1.1. Instal·lació dels programes adients.	26
5.1.2. Gen i proteïna HAS2.	28
5.1.3. Seleccionar gens i organismes candidats.	29
5.1.4. Estudi del domini proteic del gen.	31
5.1.5. Diferències entre les seqüències proteïques.	32
5.1.6. Detecció de la selecció natural.	33
5.2. Resultats de la part pràctica.	36
5.2.1. Domini proteic del gen HAS2.	36
5.2.2. Diferències a les seqüències proteïques de la proteïna HAS2 entre els organismes que apareixen a la taula d'organismes i proteïnes. ...	36

5.2.3. Detecció de la selecció natural.	38
5.3. Discussió dels resultats.	39
5.3.1. Comparació de la proteïna HAS2.	39
5.3.2. Detecció de la selecció natural.	42
5.3.3. Entrevista amb un investigador de l' IGBMC.	43
6. Conclusions.	49
7. Glossari.	52
8. Annexos.	56
8.1. Articles.	56
8.2. Guió de la part pràctica.	74
8.3. Scripts utilitzats.	79
8.4. Entrevista en versió original.	80
8.5. Dietari del Treball de Recerca.	81
8.6. CD del Treball de Recerca.	96
9. Bibliografia.	97
9.1. Webgrafia.	97

1. INTRODUCCIÓ

Emprendre aquest treball ha sigut una tasca complicada des del principi. Vaig començar estant convençuda de què volia fer un treball de recerca sobre matemàtiques, més concretament, d'aritmètica, amb el professor de matemàtiques de l'Institut, Javier Civit. Ja havíem parlat alguna vegada de com podríem enfocar-lo i del que podia posar-me a buscar per començar-lo. Però aleshores, a finals de primer de Batxillerat, em va arribar la notícia de què ell marxaria de l'Institut, i de què jo, havia estat acceptada pel Programa Argó de la UAB (Universitat Autònoma de Barcelona), que consistia en una estada de dues setmanes realitzant unes activitats que proposava cada departament de la universitat.

Jo, em negava a fer el treball de matemàtiques sense el Civit, per això vaig haver de buscar un altre tema per fer-lo, i vaig pensar en relacionar-lo amb la Biologia. Així doncs, al Programa Argó vaig decidir apuntar-me a una activitat en relació amb la Bioinformàtica* i la Genètica per veure si podia aprofitar l'estada pel meu treball.

La meva estada a la UAB va resultar molt interessant i enriquidora, vaig sortir-ne havent après molts conceptes nous i a utilitzar i estar en contacte amb noves eines de treball que no coneixia, tot i així, no veia viable utilitzar-la pel meu Treball de Recerca.

Va ser quan estava mirant la televisió un dissabte avorrida, quan vaig veure una possibilitat de treball interessant amb el qual podia aprofitar l'estada. Estava fent zàping quan vaig caure sobre un documental sobre unes rates una mica lletges que tenien característiques realment excepcionals. La característica que més em va cridar l'atenció va ser, la seva immunitat al càncer. Les rates que vaig descobrir aquella tarda es diuen: farumfers o rates talp, col·loquialment, i científicament *Heterocephalus glaber*.

Després d'haver descobert aquell petit animal, vaig enviar un correu electrònic a la Fran Guerola, per preguntar-li el que en pensava i ella, molt amablement, de seguida em va dir de quedar per parlar-ho.

Vam veure que podia ser un treball molt interessant i que podria sortir realment bé, així que jo, més contenta que una perdiu, ja havia escollit, per fi, a finals d'estiu, el meu tema de treball de recerca.

Per presentar-vos breument el treball, explicaré com he organitzat els apartats.

-Metodologia del treball: En aquesta part explico com he començat la recerca per fer el meu treball, amb qui m'he posat en contacte i les preguntes que m'he plantejat per tal de poder desenvolupar el meu tema. Introdueixo en què consistirà la part pràctica i en què em basaré per fer-la, uns articles d'una distingida revista científica anomenada *Nature*¹.

-Objectius: Exposo els objectius que em marco i espero assolir amb la realització d'aquest treball

-Part teòrica: Exposo la recerca bibliogràfica que he realitzat sobre l'*Heterocephalus glaber* i sobre l'àcid hialurònic. Explico les seves característiques que m'han semblat rellevants i interessants a mode de síntesi de tots els articles i pàgines web² que he llegit.

-Part pràctica: Explico detalladament com he dut a terme la part pràctica del meu treball. Primerament hi ha la instal·lació de les eines bioinformàtiques necessàries, tot seguit d'una recerca sobre el gen que m'interessava. Després realitzo, gràcies als programes instal·lats i d'altres que són disponibles a internet, diverses coses: Estudiar el domini proteic del gen per saber si la mutació que busco, efectivament hi està i posteriorment s'expressarà en el domini de la proteïna per la qual aquest gen codifica. Cercar diferències en les seqüències d'aquesta proteïna en animals diferents i buscar evidències de l'acció de la selecció natural. Finalment, exposo i comento els resultats obtinguts. A més a més he realitzat una entrevista a un investigador especialitzat en el tema per poder afegir l'opinió d'un professional.

¹ Annex nº 8.1.

² Bibliografia nº 9.

-Conclusions: Faig una síntesi dels resultats i la seva interpretació que he aconseguit amb el treball. Responc les preguntes plantejades al principi del treball.

-Glossari: Explico les paraules que apareixen amb un asterisc a la part superior.

-Annexos: Hi poso els articles sobre els quals s'ha basat el meu treball i la meva recerca, així com l'entrevista realitzada a l'investigador en el seu idioma original, el francès. També afegeixo els scripts que he utilitzat per elaborar la part pràctica del treball. Finalment, adjunto un diari en el qual es podrà veure el treball que he anat realitzant durant el temps que he tingut per fer-lo.

-Bibliografia: Hi constaran els llibres i pàgines web que he consultat per fer la recerca bibliogràfica de la part teòrica, i per dur a terme la part pràctica i la discussió dels resultats.

2. METODOLOGIA DEL TREBALL

El primer que vaig fer, seguint la recomanació de la meva tutora, va ser plantejar-me totes les preguntes que se m'acudissin sobre el tema, és a dir, una "pluja de preguntes". Aquestes són les preguntes que m'interessaven, però com en qualsevol treball, s'ha de delimitar una àrea de recerca.

Les preguntes que em vaig plantejar al principi són:

- D'on prové i on viu aquest animal?
- Quines són les seves característiques (fenotípiques i genotípiques) i perquè són així?
- És un animal eixit de la naturalesa o ha estat producte d'alguna font artificial?
- Quins són els seus hàbits de vida i què els fa ser aquests i no d'altres?
- A quins dels altres animals s'assembla més?
- Quant de temps viuen?
- Com ha sigut l'evolució d'aquest animal?
- Quan i com es van descobrir? Estan en perill d'extinció?
- Quin gen és el que fa que aquest animal no pugui patir càncer i en què és diferent del nostre?
- Quina informació conté aquest gen, quina proteïna sintetitza i quina funció duu a terme aquesta?
- Com és el genoma general d'aquests animals (si ha estat descobert per complet)?
- Si no poden patir càncer, els és més fàcil patir altres malalties?

- Aquest gen només l'ajuda per sanar el càncer específicament?
- Pot tenir altres gens que aturin altres malalties que nosaltres, els humans, no podem?
- Perquè és un dels únics animals que no pot sentir el dolor? Què és responsable d'aquest fet?
- Quins beneficis i quins inconvenients li porta la manca del dolor?
- Quina altra resposta física tenen davant d'un problema que a nosaltres el que ens aportaria seria dolor, com s'adonen que alguna cosa està fallant?
- Quins avanços ens podria portar en la investigació de càncer en els humans aquest animal?
- Podríem imitar el gen responsable de la immunologia al càncer en el rata topo?
- El coneixement d'aquest animal és profitós pels humans?
- Actualment s'està investigant com podria ajudar-nos el ratopín?

Davant d'aquesta llarga llista de preguntes, vaig haver d'eliminar-ne les que a mí, personalment m'interessaven menys, les que es relacionaven amb la immunitat al dolor de l'animal.

Per la part teòrica de recerca bibliogràfica he decidit respondre les preguntes següents del llistat (he afegit, més informació complementària que he anat trobant durant la recerca, que m'ha semblat interessant, i que m'ha originat més dubtes i preguntes):

-D'on prové i on viu aquest animal?

-Quines són les seves característiques curioses i perquè són així?

-Quins són els seus hàbits de vida i què els fan ser aquests i no d'altres?

-Com i durant quant de temps viuen?

I, a més a més, llegint l'article de la revista *Nature* i altres articles a diaris d'internet³, he vist que el factor important en la immunitat al càncer del farumfer és l'àcid hialurònic, per tant, faré una recerca bibliogràfica sobre aquest component i n'exposaré els resultats.

Va ser després de la pluja de preguntes i de la primera selecció de les que volia respondre, quan vaig posar-me en contacte amb els qui m'havien portat l'estada a la UAB per sol·licitar-los la seva ajuda per la meva part pràctica. Vaig enviar un correu electrònic a la Marta Coronado, estudiant del doctorat en genètica a la UAB, sota la directiva del doctor en genètica Antonio Barbadilla. Després d'haver-los demanat ajuda, em van acollir de seguida a l'IBB (Institut de Biotecnologia i Biomedicina) en el seu despatx, amb el grup: "bioinformàtica de la diversitat genòmica", on jo havia realitzat anteriorment l'estada. Em van proporcionar un ordinador on podria dur a terme la investigació i vaig disposar de l'ajuda de la Marta durant tot el procediment de la pràctica.

Ella m'ha dirigit la investigació i m'ha ajudat molt a estructurar-la. M'ha facilitat la tasca donant-me les pàgines webs i els programes que havia de descarregar amb els seus scripts^{4*} corresponents, per poder fer la pràctica i explicant-me molts termes que desconeixia.

Per tal de realitzar la pràctica, vam escollir unes determinades preguntes sobre el tema, que són les següents:

-Quin gen és el que fa que aquest animal no pugui patir càncer i en què és diferent del de la resta de mamífers?

³ Adjuntats als annexos nº 8.1.

⁴ Scripts utilitzats durant el treball disponibles als annexos nº 8.3.

- Quina informació conté aquest gen, quina proteïna sintetitza i quina funció duu a terme aquesta?

-Què pot aportar a la humanitat el descobriment de perquè el farumfer no desenvolupa tumors?

Per tant, després d'haver-les escollit amb la Marta, va ajudar-me a decidir què fer a la part pràctica, i vam triar, refer una part d'una investigació científica que va ser publicada a la revista *Nature*⁵ que mostrava quin era el factor responsable de la immunitat de l'animal al càncer, el gen HAS2.

L'article mostra uns descobriments importants i molt interessants, que malauradament no tothom pot gaudir, ja que és un article molt complicat amb termes molts científics que impedeixen la comprensió de les deduccions més generals de la investigació a un cert tipus de públic.

Jo personalment, no he pogut entendre la gran part del que l'article explica i per això vaig decidir que, quan el refés, tindria cura que tots els interessats del meu entorn puguin comprendre'l.

Finalment, vam pensar que seria interessant aportar alguna novetat a l'estudi que es va publicar a la revista. A la Marta se li va ocórrer que podria estudiar com ha actuat la selecció natural sobre el gen. Per això empraré programes específics que m'ajudaran a detectar evidències de l'acció de la selecció natural al gen, aplicant el test de la *Ka/Ks*.

Com també m'interessava molt una altra de les característiques de l'animal, la seva longevitat deguda a que les seves cèl·lules no envelleixen al llarg dels anys, vam buscar un altre article que expliqués el per què i en vam trobar un també de la revista *Nature*⁶ que ho explicava amb detall. No obstant això, a mi, d'aquesta part només m'interessa centrar-me en la possible aplicació d'aquest descobriment en els humans.

Les preguntes que m'he fet sobre aquest tema doncs, són:

⁵ Article disponible als annexos nº 8.1.

⁶ Article disponible als annexos nº 8.1.

-Si hem esbrinat perquè les cèl·lules dels farumfers no envelleixen, podem saber també com fer que les cèl·lules d'altres mamífers no ho facin?

-Si s'aconsegueix fer per a altres mamífers, seria possible aconseguir-ho pels humans?

-Voldria dir això que podríem estar-nos més de 100 anys vivint sense que les nostres cèl·lules mostrin cap tipus d'envelliment i augmentar així, àmpliament, l'esperança i la qualitat de vida?

Per a aquesta part, com he esmentat abans, em posaré en contacte amb un investigador anomenat Emmanuel Compe que treballa en un dels laboratoris més importants del món a Estrasburg, IGBMC (*Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire*), a fi de plantejar-li les meves preguntes i rebre l'opinió d'un professional.

Per tal de realitzar correctament la pràctica, la Marta va elaborar i va proposar-me un guió⁷ de treball que vaig revisar i decidir utilitzar per guiar-me durant el procés d'investigació, però que no vaig seguir al peu de la lletra.

En vista de les preguntes que m'he plantejat que m'han permès pensar i estructurar les meves idees sobre el tema, he formulat les següents hipòtesis:

- **Hi ha una o varies mutacions en la proteïna o enzim que sintetitza l'àcid hialurònic que el fa diferent a la resta d'organismes.**
- **La selecció natural ha actuat fixant aquesta mutació perquè beneficia al farumfer.**
- **Podem utilitzar la mutació en el gen de l'organisme per beneficiar a la humanitat i protegir-nos contra els tumors.**

⁷ Guió disponible als annexos nº 8.2.

3. OBJECTIUS

Un cop ja he comentat i decidit clarament el que faré, em marco els objectius següents:

-Tornar a realitzar una part de la investigació que va ser publicada per la revista *Nature* de títol "*High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat*" que ha sigut realitzat pel Departament de Biologia a la Universitat de Rochester. A fi de dur a terme la investigació utilitzaré uns programes bioinformàtics específics.

-Fer que la pràctica que realitzi fent la investigació pugui ser accessible i de fàcil enteniment pels joves que hi estiguin interessats sense haver de preocupar-se per paraules particularment tècniques i per poder mantenir-se assabentats del tema si ho desitgen.

-Afegir una secció a la investigació que no apareix a l'article que consisteix en detectar com actua la selecció natural sobre el gen responsable de la immunitat al càncer de l'animal.

-Entrevistar un investigador que treballa amb rates i ratolins de laboratori (però no en l'*Heterocephalus glaber*) en un laboratori de genètica, a fi de trobar respostes sobre els possibles avenços que podria proporcionar als humans el descobriment del perquè de la longevitat, del no envelliment de les cèl·lules, i de la resistència contra al càncer, del farumfer.

-Respondre les preguntes seleccionades⁸ que m'he plantejat per tal de realitzar el treball i confirmar o refutar les meves hipòtesis.

⁸ Estan en negreta a l'apartat 2. Metodologia del treball.

4. PART TEÒRICA

He realitzat una recerca bibliogràfica (sobre tot a internet) per tal de respondre les preguntes que m'he plantejat durant la metodologia.

N'exposo els resultats a continuació.

4.1. Resultat de la recerca bibliogràfica

4.1.1. Presentació de l'*Heterocephalus glaber*

La rata talp nua o farumfer, de nom científic *Heterocephalus glaber*, és un rosegador que destaca respecte a la resta d'animals per la seva longevitat, la immunitat que mostra envers el càncer i la seva resistència al dolor.

Gràcies a aquestes característiques úniques que presenta, va ser escollit per la revista "Science" com a "Animal de l'any" el 2013 i ha sigut objecte de nombrosos estudis orientats a esbrinar la cura contra el càncer.

La seva classificació científica, segons la viquipèdia és la següent:

Regne	Animalia
Filum	Chordata
Classe	Mammalia
Ordre	Rodenta
Família	Bathyergidae
Gènere	Heterocephalus
Espècie	H. glaber

Aquest animal és d'aspecte desagradable per la majoria de les persones, ja que, no té pèl, té unes dents molt llargues que li sobresurten del musell, uns ulls de mida petita, i és allargat i arrugat.



Figura 1: Fotografia de la rata talp nua extreta de la pàgina web: www.themarysue.com

Si concretem en les dades, mesura, normalment, entre els 8 i els 20 centímetres de llarg, als que cal afegir la llargària de la cua que pot arribar com a màxim a uns 8 centímetres més.

Presenta els músculs de la mandíbula particularment voluminosos amb quatre incisius forts i afilats, que són capaços de moure's independentment els uns dels altres, facilitant als farumfers l'excavació de túnels sota terra.

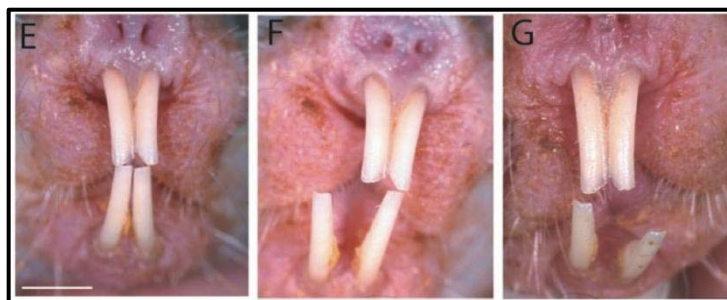


Figura 2: Seqüència de fotografies que mostra el moviment dels incisius del farumfer. Extret de la pàgina web: <https://cuterthanecoli.wordpress.com/2012/03/08/ behold-the-beauty-of-the-naked-mole-rat/>

També podem dir que són pràcticament cecs. Tot i tenir els ulls bé, els hi falla la connexió ull-cervell, és a dir, no són capaços d'utilitzar el sentit de la vista perquè els hi ho impedeix una connexió que no tenen establerta correctament.

Els ulls no són l'únic òrgan que tenen diferent respecte a la resta de rosegadors a conseqüència del seu hàbitat; les seves orelles tenen una obertura molt petita per evitar que hi entri la sorra dels túnels en els quals viuen.

Com he esmentant anteriorment, pràcticament no tenen pèl, només en presenten al musell, el bigoti, que són pèls sensorials* que els permeten ubicar-se en els túnels, al cap, a la cua i entre els dits de les potes. Això els hi dona un aspecte molt particular i diferent del de la resta de rosegadors que són majoritàriament peluts.

La seva pell és d'un color rosa translúcid i és en la seva major part, arrugada.

El farumfer és originari d'Àfrica i habita principalment sota terra a Etiòpia, Kènia i Somàlia. Viu en comunitat en uns túnels subterranis que ell mateix excava i s'alimenta de les arrels i dels tubercles, tant els salvatges com els de les plantacions, i poden resultar una plaga pel conreu d'alguns pagesos.

La seva estructura social, és també una de les característiques que el fa especial, ja que, no és comú en els mamífers, viure en colònies.

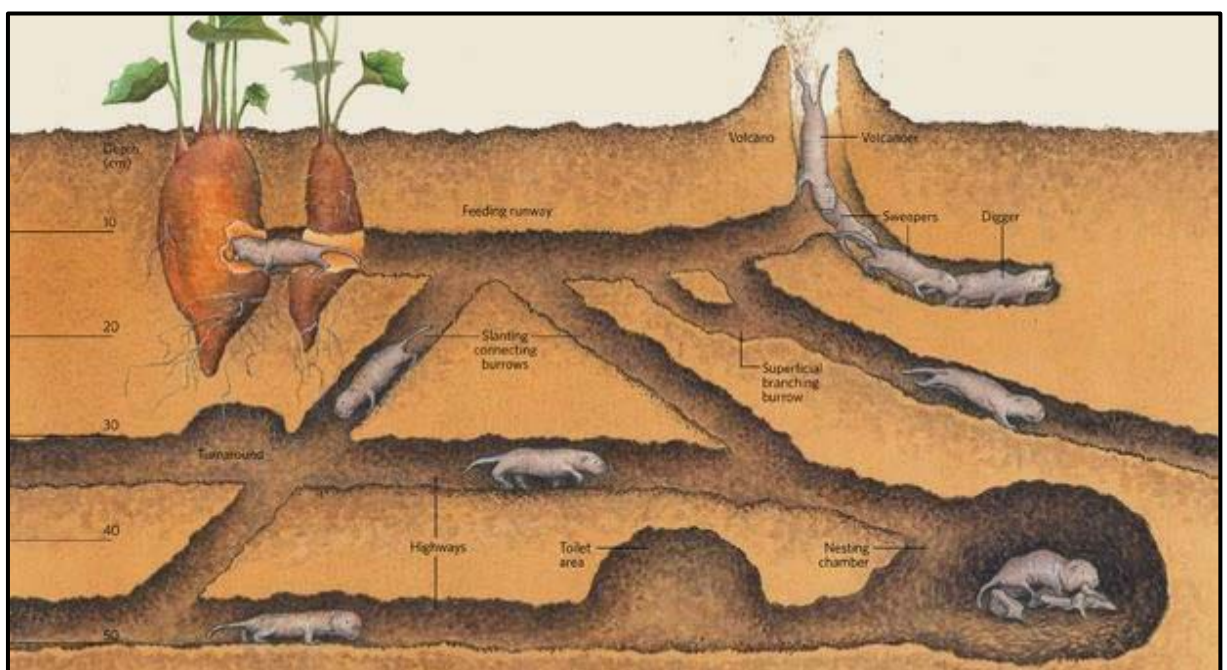


Figura 3 : Dibuix de les colònies en les que habiten els farumfers extreta de la pàgina web: <http://www.thescientist.com/?articles.view/articleNo/32136/title/Underground-Supermodels/>

Els *Heterocephalus glaber* s'organitzen en diversos tipus d'individus segons la funció que cadascun haurà de dur a terme en la colònia, com passa amb les formigues o les abelles. A les colònies dels farumers hi ha una reina, que és l'única femella amb capacitats de reproduir-se. També disposa d'unes vèrtebres especials que la fan més gran i més llarga que la resta de femelles (perquè porten al voltant d'unes 10 cries a cada ventrada). Els altres individus que hi viuen són obrers, soldats, servents o infermers i cries.

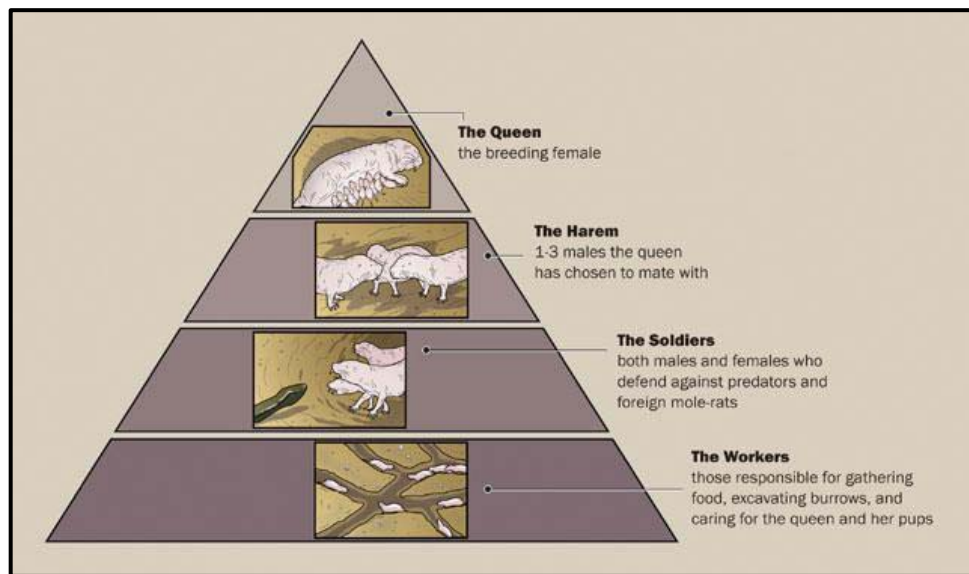


Figura 4: Esquema en piràmide dels diferents membres d'una colònia de farumfer, ordenada de dalt a baix per grau d'importància en aquesta. Imatge extreta de la pàgina web : marsdenton.flavors.me

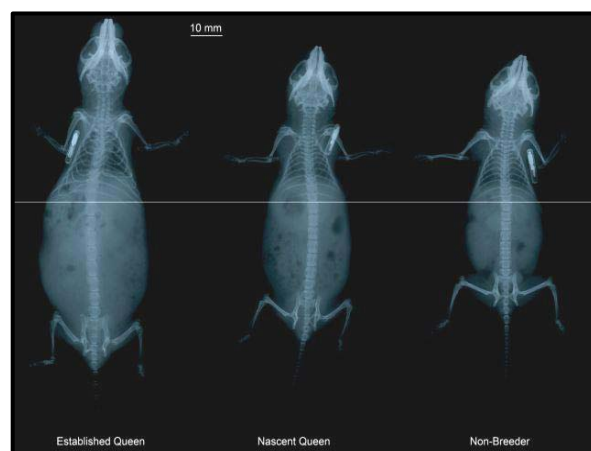


Figura 5: Radiografia de l'esquelet de tres tipus de femelles de farumfer. La primera és una femella reina embarçada, la segona una femella reina, i la tercera una femella normal. Extret de: <http://www.faxitron.com/life-sciences-ndt/files>

Per controlar la natalitat de nous nascuts en la colònia, la reina, inhibeix* sexualment quasi a la totalitat dels individus que hi habiten, a excepció de dos o tres mascles que escull per a què la fecundin, aspergint la seva orina per les parets dels túnels tornant-los estèrils. Cada reina de cada colònia aspergeix les parets amb una substància d'olor única que impregna cada membre de la colònia. Això ajuda a detectar, quan se'n presenten, intrusos, els quals són assassinats pels rosegadors soldats.

En total, a la colònia hi viuen al voltant de 200 membres. Una de les raons per les que viuen tants individus en la mateixa colònia, és per a donar-se calor mutuament, ja què la pell dels farumfers no acumula greix i són incapaços de mantenir la seva temperatura del cos estable (així doncs, viuen en ambients càlids, a prop de l'equador).



Figura 6: Fotografia de farumfers dormint l'un a sobre de l'altre per tal de donar-se calor. Extreta de la web: http://www.independent.co.uk/incoming/article8483681.ece/alternates/w620/Sleeping_Rats.jpg

Tots els individus joves provenen tots de la rata talp reina que s'ha emparellat amb un o dos mascles diferents. Això fa que la diversitat genètica en les colònies sigui molt pobra. Tot i que l'endogàmia* que presenta l'espècie, hauria pogut ser perjudicial per aquesta, la selecció natural no ha actuat en contra de l'espècie, sinó que l'ha mantinguda i ha aconseguit sobreviure.

Un fet curiós, és el que passa a les colònies quan mor la rata talp reina. Quan això es produeix, comença una "lluita" entre les femelles de la colònia per tal

d'ocupar el seu lloc. La primera en aconseguir aparellar-se amb un dels mascles fertilitzants, serà la guanyadora. Així doncs, la reina següent, segueix sent sempre un descendent de la reina anterior, que s'aparella amb un dels mascles que ha estat sempre procurant descendència a la femella reina. Això mostra com clarament, els farumfers es reproduïxen amb individus de la seva mateixa família. Aquest fet serà important per veure com actua la selecció natural amb la preservació de l'espècie.

Una altra de les grans característiques de l'*Heterocephalus glaber*, és la seva capacitat per viure en ambients on l'oxigen és molt escàs. Als túnels en els quals formen la seva colònia només hi ha un 8% d'oxigen, mentre que a la superfície terrestre on viuen la majoria dels mamífers hi ha un 21% d'oxigen en l'aire.

Els animals que normalment viuen en ambients baixos en O₂ mostren danys cerebrals que els perjudiquen durant la seva vida i els fan viure menys temps. Els farumfers, en canvi, són capaços d'estar-se mitja hora en un ambient en què manqui totalment l'oxigen sense rebre cap tipus de lesió cerebral.

A la Universitat de Texas a San Antonio, n'han descobert la causa. Diuen que té a veure amb com les seves cèl·lules cerebrals regulen la ingesta de calci. El biòleg Thomas Park explica que, quan les cèl·lules del cervell es veuen privades d'oxigen, no aconsegueixen regular l'entrada de calci al cervell i fa que es produeixi un excés d'aquest que resulta letal per l'organisme.

Els farumfers tenen l'habilitat de tancar els canals de calci quan es produeix la privació d'oxigen, controlant-ne així l'entrada.

Aquesta capacitat que mostren, els humans acabats de néixer també la tenen. L'única diferència que hi ha entre els humans i els farumfers respecte d'aquesta capacitat, és que nosaltres pocs mesos després de néixer, la perdem, mentre que ells en són dotats durant tota la seva vida.

També es va descobrir, que l'hemoglobina de l'*Heterocephalus glaber* té una major afinitat* amb l'oxigen que la resta de mamífers, això els hi permet capturar fàcilment el poc oxigen que pot haver-hi en el medi on viu.

Una altra característica de les realment espectaculars d'aquest animal, és la seva

longevitat, com hem esmentat abans. Els farumfers viuen al voltant de 30 anys, el que significa que viuen deu vegades més que la resta de rosegadors. I per si no n'hi hagués prou, durant els seus anys de vida no s'aprecia cap tipus d'envelliment a les seves cèl·lules.

Tot i tenir uns telòmers* excessivament curts, i produir telomerasa* en excés, cosa que normalment afecta negativament a la funció que duu a terme, el farumfer aconsegueix mantenir-los intactes durant la seva vida, és a dir, els seus telòmers no es deterioren, contràriament a la resta de mamífers, incloent-ne els humans. Això fa que les seves cèl·lules no envelleixin i això els ajuda a viure més temps i més sanament.

També s'ha descobert que una de les parts del seu ARN ribosòmic* o ARNr, anomenada ARNr 28S* presenta una rara escissió en dos fragments de mides desiguals, fet que no succeeix en la resta de mamífers.

Com que l'ARN ribosòmic és l'encarregat de sintetitzar les proteïnes en les cèl·lules, d'acord amb la seqüència que li proporciona l'ARN missatger* o ARNm, qualsevol canvi en la seva estructura pot influir en la maquinària de producció de proteïnes en l'animal.

Segons els investigadors, l'estructura anormal que presenta l'ARN 28S augmenta la fidelitat (o disminueix la taxa d'errors) en el procés de traducció de proteïnes, és a dir, les sintetitza quasi sempre sense cap error, permetent que totes realitzin correctament la funció que han de dur a terme. Això podria estar relacionat o podria estar contribuint, en la longevitat que presenten els farumfers, ja que sempre està produint proteïnes pràcticament sense cap error ni mutació, que realitzen la funció que han de realitzar.

Finalment, la característica que més impressiona d'aquest petit rosegador, és la seva immunitat al càncer. S'han estat realitzant nombrosos estudis (que encara no s'han finalitzat) sobre aquest fenomen exclusiu i únic d'aquest animal, ja que és l'únic animal conegut en tot el planeta terra en no desenvolupar cap tipus de tumor al llarg de la seva vida.

Les investigacions que han sigut més completes i han donat uns resultats més coherents i avançats han sigut les publicades a la revista *Nature* sota el títol de: *"High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked*

mole rat”, que han estat realitzades pel Departament de Biologia de la Universitat de Rochester a Nova York.

Segons aquest article, el gen que confereix al farumfer la capacitat de no desenvolupar càncer al llarg de la seva vida, és el gen HAS2, que sintetitza àcid hialurònic*. Aquesta substància viscosa és present en les cèl·lules de tots els mamífers, però en l'*Heterocephalus glaber*, és de pes molecular molt més elevat.

La part pràctica del meu treball consistirà, en part, en veure exactament per què el gen HAS2 dels farumfers sintetitza per un àcid hialurònic més llarg i pesat, i es basarà, quasi en la seva totalitat, en aquest article de la revista *Nature*.

4.1.2. Presentació de l'àcid hialurònic:

L'àcid hialurònic és un polisacàrid, un glicosaminoglicà no sulfatat d'alt pes molecular que es troba en la matriu extracel·lular de tots els teixits animals, però és especialment abundant en els teixits connectiu, epitel·lial i nerviós.

És una molècula extremadament llarga amb una gran capacitat d'hidratació que aporta als teixits resistència a pressions mecàniques i lubricació.

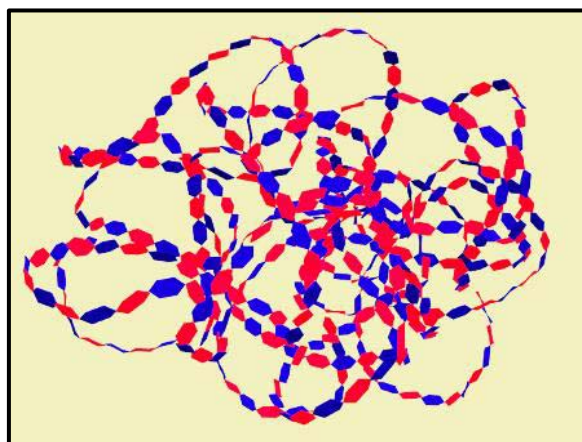


Figura 7: Esquema que indica l'ampli volum que ocupen les cadenes extremadament llargues d'una molècula d'àcid hialurònic.

L'àcid hialurònic està format per parells de disacàrids, D-glucurònic* i N-acetil glucosamina*, units mitjançant enllaços alterns: (1-3)-beta-D-N-acetil glucosamina i (1-4)-beta-D-glucurònic⁹. Normalment, en condicions aquoses (el medi en el qual trobem la molècula) adopta una organització plegada i globular. El trobem a la matriu, dissolt en forma de sal (hialuronat).

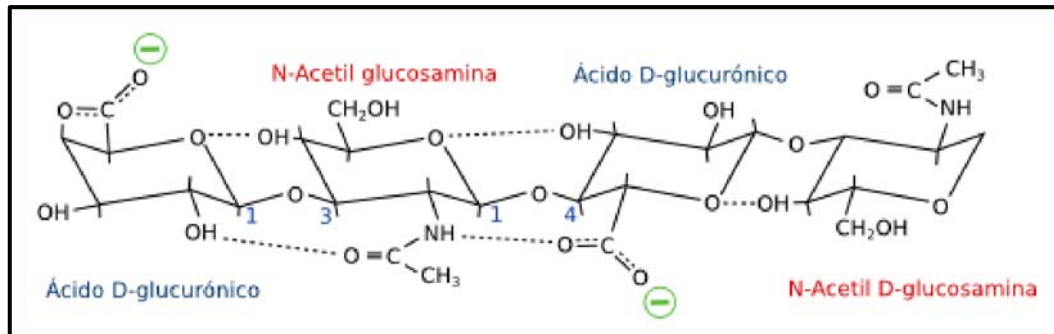


Figura 8: Esquema en el que es mostren els enllaços entre els disacàrids i que ens mostra l'estructura desplegada de l'àcid hialurònic. Els números en blau indiquen els enllaços tipus beta esmentats anteriorment. Extret de la pàgina web: <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/imagenes/2-hialuronico-enlaces2.png>

Els enllaços de l'àcid hialurònic solen desfer-se i refer-se al llarg del temps, així doncs, aquest compost no és molt estable. Però l'àcid hialurònic del farumfer és molt més estable i no està en constant moviment. Aquest fet els ajuda a lluitar contra els tumors que apareixen al seu cos. L'àcid hialurònic marca aquestes cèl·lules que s'estan dividint sense control, i indica al sistema immunitari que se n'ha de produir l'apoptosi*

L'àcid hialurònic posseix moltes càrregues negatives en la seva estructura molecular que tenen tendència a formar enllaços amb les molècules d'aigua del medi en el qual es troba. Per tant, al poder associar-se fàcilment amb les molècules d'H₂O té una gran capacitat d'hidratació. Així doncs, pot formar un gran espai aquós al seu interior, i hidratar bé el teixit en el que es troba. És per aquest motiu, que s'utilitza l'àcid hialurònic en cremes injeccions o tractaments per rejuvenir la pell.

⁹ Els enllaços es podran veure a la figura .



Figura 10: Càpsules per rejuvenir la pell.
 Extret de la pàgina web :
<http://www.sanissima.com/Hialuronico-Onagra-EPAPLUS-60perles>

La seva síntesi és diferent als de la resta de glicosaminoglicans, ja que es sintetitza a la membrana plasmàtica en comptes de a l'aparell de Golgi. Els enzims que el sintetitzen són de membrana, i n'hi han tres, s'anomenen sintetases de l'àcid hialurònic : HAS1, HAS2 i HAS3. Tot i que els tres enzims sintetitzen àcid hialurònic, el HAS2 és el que sintetitza les cadenes més llargues.

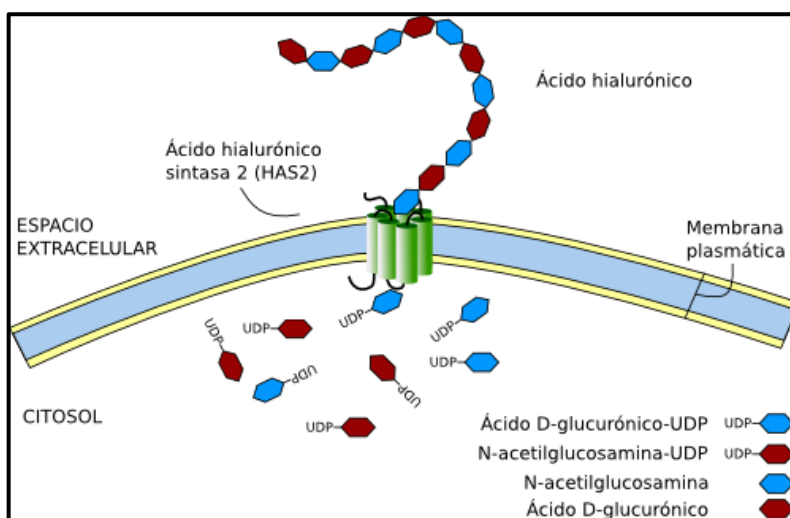


Figura 9: Esquema de la síntesi d'àcid hialurònic en la membrana cel·lular per l'enzim HAS2. Extret de la pàgina web:
<http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/imagenes/2-hialuronico-sintasa.png>

Una altra particularitat de l'àcid hialurònic és que es troba en abundància als ossos i articulacions, formant part del líquid sinovial* i augmentant-ne la

viscositat i ajudar a lubricar les articulacions, sobretot els genolls. És per això, que s'injecta àcid hialurònic als individus que pateixen d'artritis* als genolls per tal de lubricar-la i ajudar a què es protegeixi del dolor local.



Figura 11: Injecció intraarticular en pacients amb artritis de genoll. Extreta de la pàgina web: <http://www.doctorlopezcapape.com/img/traumatologia/Acido-hialuronico2.thumb.jpg>

5. PART PRÀCTICA

5.1. Procediment

5.1.1. Instal·lació dels programes adients:

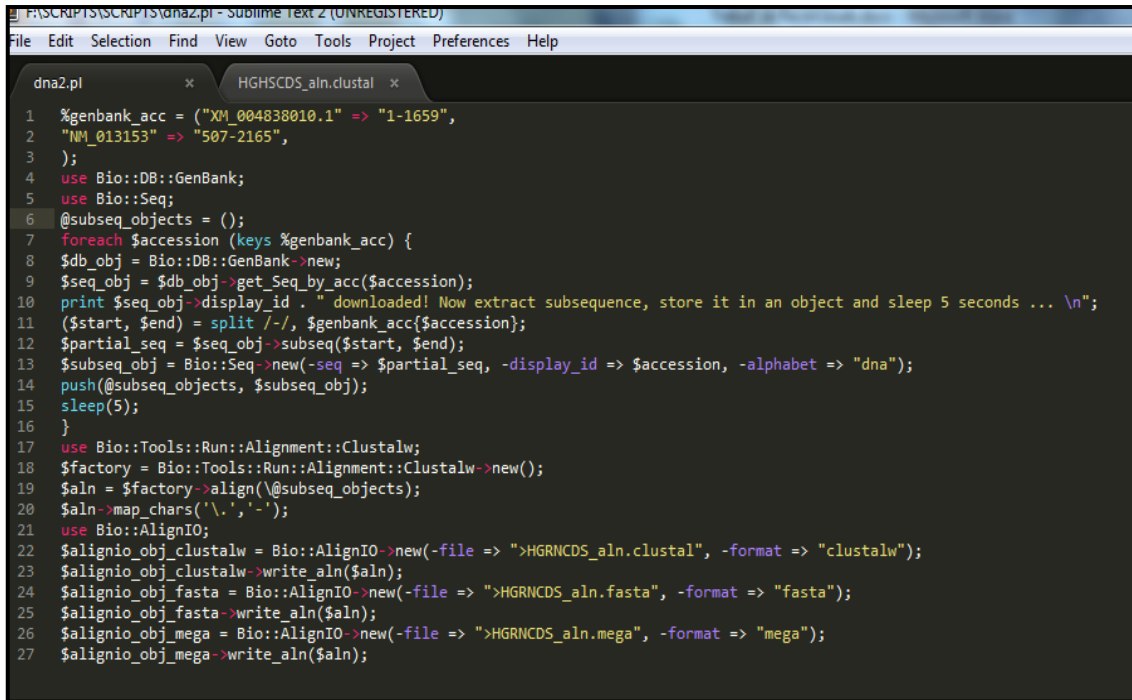
Per poder començar la pràctica, és important disposar dels programes bioinformàtics necessaris que voldrem emprar posteriorment. Així doncs, hem d'habilitar el nostre ordinador instal·lant aquests programes que estan disponibles a internet i a l'abast de tothom.

Els primers programes que instal·larem seran utilitzats per obtenir i descarregar les seqüències proteiques i del gen d'interès, i per l'alineament múltiple d'aquestes seqüències.

Primer de tot, necessitem el Strawberry Perl, que és una distribució del llenguatge de programació Perl per Windows. El Perl (Practical Extraction and Report Language) és un llenguatge de programació* que va ser dissenyat per Larry Wall el 1987. És un dels més fàcils per introduir-se a la bioinformàtica, ja que és molt pràctic i complet.

Per descarregar el Strawberry Perl, només caldrà buscar-lo a internet i seguir els passos que ens indiquen per la instal·lació. El que ens interessa no és tenir el Strawberry Perl en si, sinó tenir el BioPerl, que només pot aconseguir-se un cop havent descarregat el Strawberry Perl. El BioPerl és una col·lecció de mòduls de Perl que faciliten el desenvolupament de scripts* en Perl per aplicacions a la bioinformàtica. Per instal·lar-lo, caldrà anar a inici, i seguir uns passos determinats, senzills, que surten explicats a internet.

Un cop tinguem BioPerl, per facilitar el visionament dels scripts que emprarem, descarregarem el programa Sublime Text. Aquest programa que també té una instal·lació fàcil via internet, ens mostrarà els nostres scripts així:



```
1 %genbank_acc = ("XM_004838010.1" => "1-1659",
2 "NM_013153" => "507-2165",
3 );
4 use Bio::DB::GenBank;
5 use Bio::Seq;
6 @subseq_objects = ();
7 foreach $accession (keys %genbank_acc) {
8 $db_obj = Bio::DB::GenBank->new;
9 $seq_obj = $db_obj->get_seq_by_acc($accession);
10 print $seq_obj->display_id . " downloaded! Now extract subsequence, store it in an object and sleep 5 seconds ... \n";
11 ($start, $end) = split /-/, $genbank_acc{$accession};
12 $partial_seq = $seq_obj->subseq($start, $end);
13 $subseq_obj = Bio::Seq->new(-seq => $partial_seq, -display_id => $accession, -alphabet => "dna");
14 push(@subseq_objects, $subseq_obj);
15 sleep(5);
16 }
17 use Bio::Tools::Run::Alignment::Clustalw;
18 $factory = Bio::Tools::Run::Alignment::Clustalw->new();
19 $aln = $factory->align(\@subseq_objects);
20 $aln->map_chars('\.', '-');
21 use Bio::AlignIO;
22 $alignio_obj_clustalw = Bio::AlignIO->new(-file => ">HGRNCDS_aln.clustalw", -format => "clustalw");
23 $alignio_obj_clustalw->write_aln($aln);
24 $alignio_obj_fasta = Bio::AlignIO->new(-file => ">HGRNCDS_aln.fasta", -format => "fasta");
25 $alignio_obj_fasta->write_aln($aln);
26 $alignio_obj_mega = Bio::AlignIO->new(-file => ">HGRNCDS_aln.mega", -format => "mega");
27 $alignio_obj_mega->write_aln($aln);
```

Figura 12: Visualització d'un dels scripts utilitzats per la pràctica amb el programa Sublime Text.

A la imatge veiem un dels scripts amb els que he treballat, l'únic que fa el Sublime Text, és diferenciar mitjançant colors, les diferents funcions de cada ordre que hem introduït al programa perquè l'executi, i tenir-ho tot més organitzat.

Per poder realitzar l'última part de la pràctica, la detecció de la selecció natural, haurem de descarregar el programa DnaSP (<http://www.ub.edu/dnasp/>) que ens permetrà detectar evidències de l'acció de la selecció natural, aplicant el test de la Ka/Ks¹⁰.

Un cop ja tenim tots aquests programes instal·lats, podem procedir amb la pràctica.

¹⁰ Explicació del test en l'apartat 4.6. Detecció de la selecció natural.

5.1.2. Gen i proteïna HAS2

Als articles que he pogut trobar sobre l'*Heterocephalus glaber* he vist que el gen causant de la seva immunitat al càncer és el gen HAS2 (Hyaluronan synthase 2).

Aquest gen codifica per un enzim que s'encarrega de sintetitzar una proteïna integral de la membrana que s'anomena igual que el gen, enzim HAS2. És aquest enzim el que sintetitza l'àcid hialurònic.

El gen HAS2 en els farumfers mesura 1782 bp (parells de bases nitrogenades*) i sintetitza per una proteïna de 552 aminoàcids.

Estudiarem posteriorment el domini proteic del gen i n'exposarem els resultats.

```
1 atgcattgtg agaggtttct atgtatcctg agaataattg gaaccacgct ttttggagtc
61 tctcttctcc ttggaatcac agctgcttat atcgttggct accagtttat ccaaacggac
121 aattactatt tctcttttgg attatatggt gcctttttag catcacatct catcatccaa
181 agcctattht ccttttttga acacaggaaa atgaaaaaat ctctagaaac ccccatthaag
241 ttgaacaaaa ctggtgctct ttgcatcgct gcatatcaag aagaccaga ctacttacga
301 aaatgtttgc aatctgtgaa aaggctcacc taccocggga ttaaggttgt catggtcata
361 gatgggaact cggatgatga cctgtacatg atggacatct tcagogaagt catgggcagg
421 gacaagtcag ccacttacat ctggaaaaaa aacttccacg aaaagggctc tggtgagacg
481 gatgagtcac ataaagagag ctcacagcac gtgacacagt tggcttctgc cagtaaaagt
541 gtgtgcatca tgcaaaaagt ggggtgaaaa cgagaagtca tgtacacagc cttccgagcc
601 ctgggacgaa gtgtggatta tgtgcagggt tgtgactccg ataccatgct ggaccctgcc
661 tcatctgtgg agatgggtgaa agtttttagaa gaagaccca tgggttgagg agttgggggg
721 gatgtccaga ttttaacaa gtatgattcc tggatctctt tcctcagcag tgtgagatac
781 tggatggcct ttaatataga aaggcctgt cagtcgtatt ttgggtgtgt ccagtgcac
841 agtggacctc tgggaatgta cagaaactcc ctgctgcatg agtttgtgga agactggtac
901 agtcaagaat tcatgggcaa ccagtgtagt tttggagatg acaggcacct aacaaatcgg
961 gtgctgagtc tgggctatgc cacaaaatac acagctcggg ccaagtgcct tactgaaaca
1021 ccaatcgaat atctcagatg gttgaaccag cagaccctgt ggagcaagtc ctacttccga
1081 gagtggctgt acaatgcaat gtggttccac aagcatcact tgtggatgac ctatgaagca
1141 gtoatcactg gatttttccc tttctttctc attgccacag taatccagct cttctacagg
1201 gggaaaattt ggaacatcct tctcttcttg ctaactgtcc agctggtagg gctcataaaa
1261 tcatcttttg ccagctgcct cagaggaaac atcatcatgg tctttatgtc tctctactca
1321 gtgttgata tgtcaagttt acttctctgcc aaaatgtttg caattgcaac aataaaciaa
1381 gctgggtggg gcacatccgg aaggaaaacc attgttgta acttcatagg actcatccca
1441 gtgtcagttt ggtttacaat tctctgggt ggtgtgattt tcaccattta taaggaatct
1501 aaaaagccat tttctgaatc caaacagaca gttttaattg ttggaacatt gctctatgca
1561 tgctattggg tcatgctggt gacactgtac gtggttctca tcaataagtg tggcaggcgg
1621 aagaaaggac agcagtatga catgggtgctg gacgtatgag cgtatctggt ttggcatctg
1681 cagtacact cccctgactc cctctgggg ctgtacagtt tgtggcctct gtgccaccaa
1741 ggagatacat cactgctgct gcaacttgaa caaagacact tc
```

Figura 13: Gen HAS2 complet de l'*Heterocephalus glaber*. Extret de la bas de dades del NCBI.

5.1.3. Seleccionar gens i organismes candidats

Mitjançant la base de dades UniProt elaboro una taula amb informació sobre on està emmagatzemada la seqüència de la proteïna o del gen en els diferents mamífers que he triat. La taula constarà del nom de l'organisme, el nom de la proteïna, el nom de l'entrada, l'entrada, i, finalment, la longitud en aminoàcids de la proteïna.

Taula de proteïnes i organismes:

Organisme	Nom de la proteïna	Nom de l'entrada	Entrada	Longitud de la proteïna
Heterocephalus glaber (Rata talp nua)	Hyaluronan synthase 2	HYAS2_HETGA	G5AY81	552
Homo sapiens (Humà)	Hyaluronan synthase 2	HYAS2_HUMAN	Q92819	552
Mus musculus (Ratolí)	Hyaluronan synthase 2	HYAS2_MOUSE	P70312	552
Rattus norvegicus (Rata)	Hyaluronan synthase 2	HYAS2_RAT	O35776	552
Bos taurus (Vaca o bou)	Hyaluronan synthase 2	HYAS2_BOVIN	O97711	552
Sus scrofa (Porc)	Hyaluronan synthase 2	F1S290_PIG	F1S290	552
Pan troglodytes (Chimpanzé)	Hyaluronan synthase 2	H2QWN3_PANTR	H2QWN3	552

Utilitzo la base de dades de gens del NCBI (National Center for Biotechnology Information), segons l'enllaç: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> . A la taula que elaboraré apareixeran els mateixos organismes que a la de les proteïnes, però amb les columnes següents: Organisme, gen, nom de l'entrada, longitud del mRNA en parells de bases nitrogenades i finalment la part codificant del gen, és a dir, només els exons*.

Taula de gens i organismes:

Organisme	Gen	Nom de l'entrada	Longitud del mRNA	Part codificant
Heterocephalus glaber (Rata talp nua)	HAS2	XM_004838010.1	1782 bp	1-1659
Homo sapiens (Humà)	HAS2	NM_005328	3275 bp	539-2197
Mus musculus (Ratolí)	Has2	NM_008216	4262 bp	554-2212
Rattus norvegicus (Rata)	Has2	NM_013153	4172 bp	507-2165
Bos taurus (Vaca o bou)	HAS2	NM_174079	2946 bp	545-2203
Sus scrofa (Porc)	HAS2	NM_214053	2990 bp	568-2226
Pan troglodytes (Chimpanzé)	HAS2	XM_528222	4221 bp	572-2230

Els mamífers que he triat posar en les taules són els que he trobat disponibles a les bases de dades. Volia posar-ne molts per a què es veiés que el canvi que apareixerà en la seqüència de la proteïna HAS2, apareix només en el farumfer.

5.1.4. Estudi del domini proteic del gen

Els dominis proteics són aquelles seqüències d'aminoàcids que poden plegar-se de manera estable formant una estructura tridimensional compacta que permet a la proteïna la realització d'una funció determinada. Així doncs, les proteïnes realitzen les seves funcions gràcies als dominis funcionals que contenen en la seva seqüència aminoacídica.

Les proteïnes poden contenir diversos dominis funcionals diferents, i un mateix domini pot aparèixer en una varietat de diferents proteïnes que realitzen una funció particular. Per tant, si detectem la presència d'un determinat domini funcional dins de la seqüència d'una proteïna, això pot ajudar-nos a saber quina funció realitza.

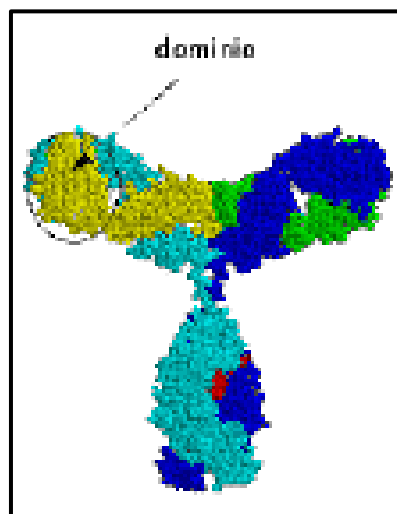


Figura 14: Imatge on veiem el domini d'una proteïna plegada. Extreta del google imatges.

A mi particularment, m'interessa mirar el domini proteic del gen HAS2 per així poder veure si les mutacions que detectaré en formen part o no. Existeixen diferents programes per a detectar dominis funcionals a seqüències proteiques. Aquests programes cerquen fragments d'aminoàcids amb característiques semblants als d'uns models coneguts que estan emmagatzemats en bases de

dades*. El programa que utilitzaré jo és InterProScan¹¹, que em permetrà establir els dominis que té la proteïna i la seva funció.

Per establir el domini proteic de la proteïna amb aquest programa, només hauré de buscar-lo a internet mitjançant l'enllaç: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> i introduir-hi la seqüència aminoacídica en els espais adients per a què el programa em torni com a resposta el seu domini proteic o funcional.

5.1.5. Diferències entre les seqüències proteiques

Un dels objectius principals d'aquesta part pràctica és, com he esmentat abans, la comparació de les seqüències proteiques d'un mateix i determinat gen en diferents organismes, en aquest cas, el més important serà comparar la seqüència de l'enzim que sintetitza àcid hialurònic de la rata talp nua amb, la dels organismes que apareixen a les *taules d'organismes*.

Com he esmentat abans, faré la comparació de proteïnes utilitzant BioPerl, un programa informàtic que he descarregat anteriorment. Fem servir un *script específic* que un cop l'executem ens descarregarà les seqüències de les proteïnes mitjançant els codis d'entrada que apareixen a la *taula de proteïnes i organismes* que nosaltres li introduïm, en tres formats (*clustal*, *fasta* i *mega*). Utilitzarem només el que sigui més clar, que en aquest cas és el *clustal*. El format *clustal* vindrà donat amb el nom de l'arxiu seguit d'un punt i la terminació *clustal* => «Nom arxiu».clustal

El que hauré de fer és obrir-lo al Sublime Text i mirar en quins aminoàcids difereix la proteïna HAS2 de la rata talp respecte dels altres mamífers.

5.1.6. Detecció de la selecció natural

Com sabem, les proteïnes evolucionen, ja que els gens que les codifiquen es troben sotmesos a mutacions. Les mutacions són alteracions o canvis en l'ADN i són la matèria primera de l'evolució. A causa de l'acció de la selecció natural o bé de tendències aleatòries, com podria ser la deriva genètica* o altres factors de l'atzar que en el passat van seleccionar els individus supervivents de determinades espècies, les mutacions augmenten de freqüència i s'estenen en la població.

Per poder entendre si el nostre gen d'estudi ha estat sota l'acció de la selecció natural, utilitzarem les seqüències codificants, ja que podem distingir dos tipus de mutacions: les mutacions sinònimes i les no sinònimes. Les mutacions sinònimes són aquelles que no produeixen un canvi en la seqüència d'aminoàcids a les proteïnes, mentre que les no sinònimes, sí que provoquen un canvi. Per tant, les mutacions no sinònimes tindran un efecte més important en la proteïna, que podrà ser positiu (una nova funció; o la nova versió resulta més avantatjosa) o negatiu (la proteïna no es pot sintetitzar per la presència d'un nou codó stop al mig de la seqüència codificant, per exemple).

Prenent com a referència la taxa de substitucions no sinònimes (K_a), podem inferir si la selecció natural n'està afavorint la fixació (selecció positiva) o bé l'està obstaculitzant (selecció negativa). És a dir, un excés de mutacions no sinònimes, que tenen un efecte important en la proteïna, només es podria entendre si l'efecte que té és molt positiu i per tant, la selecció l'afavoreix, i n'hi ha un excés. Si veiem el contrari, vol dir que la selecció impedeix la fixació, perquè les mutacions tenen un efecte negatiu.

El coeficient ω , que relaciona les taxes de substitució sinònimes (K_a) i no sinònimes (K_s) mitjançant l'equació $\omega = K_a/K_s$ permet calcular la pressió selectiva a escala de proteïna. Si la selecció no té efecte en l'eficàcia biològica, les

substitucions no sinònimes es fixaran amb la mateixa taxa que les mutacions sinònimes, $K_a = K_s$, resultant una $\omega = 1$.

Si les mutacions no sinònimes són deletèries, la selecció purificadora reduirà la seva taxa de fixació, amb la qual cosa $K_a < K_s$ i tindrem una $\omega < 1$. Si les mutacions no sinònimes són afavorides per la selecció positiva, aquestes es fixaran a una taxa més elevada que les substitucions sinònimes, resultants en $K_a > K_s$ i $\omega > 1$. Per tant, un increment significatiu en la taxa de no sinònimes sobre les sinònimes ens està indicant que hi ha evidència en les proteïnes d'adaptació evolutiva.

Un esquema per entendre-ho més clarament seria:

BENEFICIOSA (s'acumulen)	DELETÈRIA (s'eliminen)	NEUTRA
$\frac{K_A}{K_S} > 1$	$\frac{K_A}{K_S} < 1$	$\frac{K_A}{K_S} \approx 1$

Figura 15: Esquema que explica les ratio de la K_a/K_s . Facilitat per la Marta Coronado, extret dels seus apunts.

El programa DnaSP que hem instal·lat abans ens permet fer el càlcul de la K_a/K_s en la seqüència codificant sencera i per finestres, que ens permeten veure d'una manera més acurada si en alguna regió concreta tenim evidències de selecció.

Limitacions

Encara que el test és un bon indicador de la pressió selectiva a nivell de seqüència, els canvis evolutius sovint poden tenir lloc en la regió reguladora d'un gen que afecta els nivells, temps o ubicació de l'expressió gènica. Aquest test no detectarà aquest tipus de canvis, només calcularà la pressió selectiva dins de regions codificants de proteïnes.

El mètode K_a/K_s requereix un senyal bastant fort per tal de detectar la selecció.

Possiblement, a l'haver utilitzat poques dades, poques seqüències dels organismes, els nostres resultats no siguin del tot significatius.

Per aconseguir fer el test, he d'obrir l'alineament de seqüències del gen HAS2 en format Fasta, que prèviament he descarregat amb un script específic, i l'ajuda del BioPerl, amb el programa DnaSP.

5.2. Resultats de la part pràctica

5.2.1. Domini proteic del gen HAS2

La longitud de la proteïna, tal com hem indicat a la *taula d'organismes i proteïnes* és de 552 aminoàcids. És de la família de les "Hyaluronan synthase". El seu domini proteic va de l'aminoàcid 82 fins al 411.

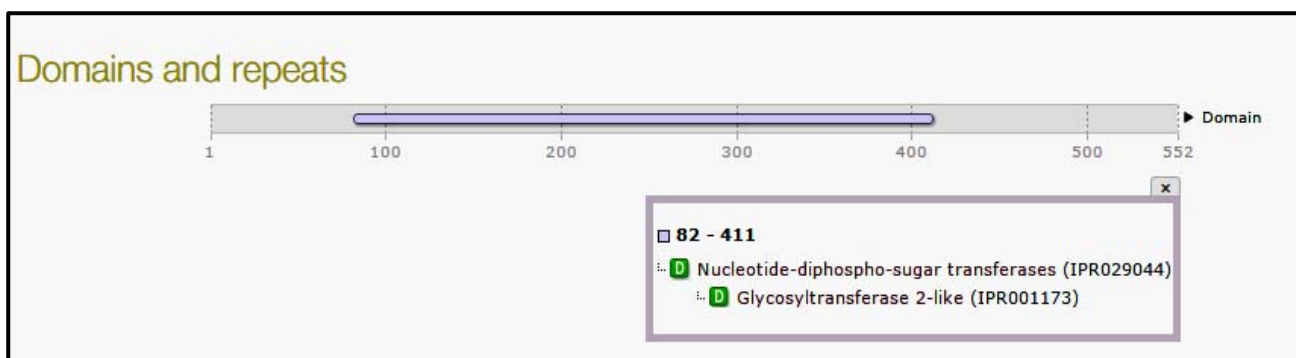


Figura 16: Extret de la pàgina web InterProScan que ens mostra el domini proteic de la proteïna HAS2.

5.2.2. Diferències a les seqüències proteïques de la proteïna HAS2 entre els organismes que apareixen a la taula d'organismes i proteïnes

Veiem els canvis emmarcats en uns requadres de diferents colors (els requadres els he fet jo amb el programa per ordinador Paint per a que es vegin més clarament els canvis.

El programa per a mostrar-nos els canvis, a la part inferior de les diferents seqüències alineades, posa un o dos punts sota la posició en

què canvia una lletra de les seqüències, i si no es manifesta cap canvi, hi posa un asterisc).

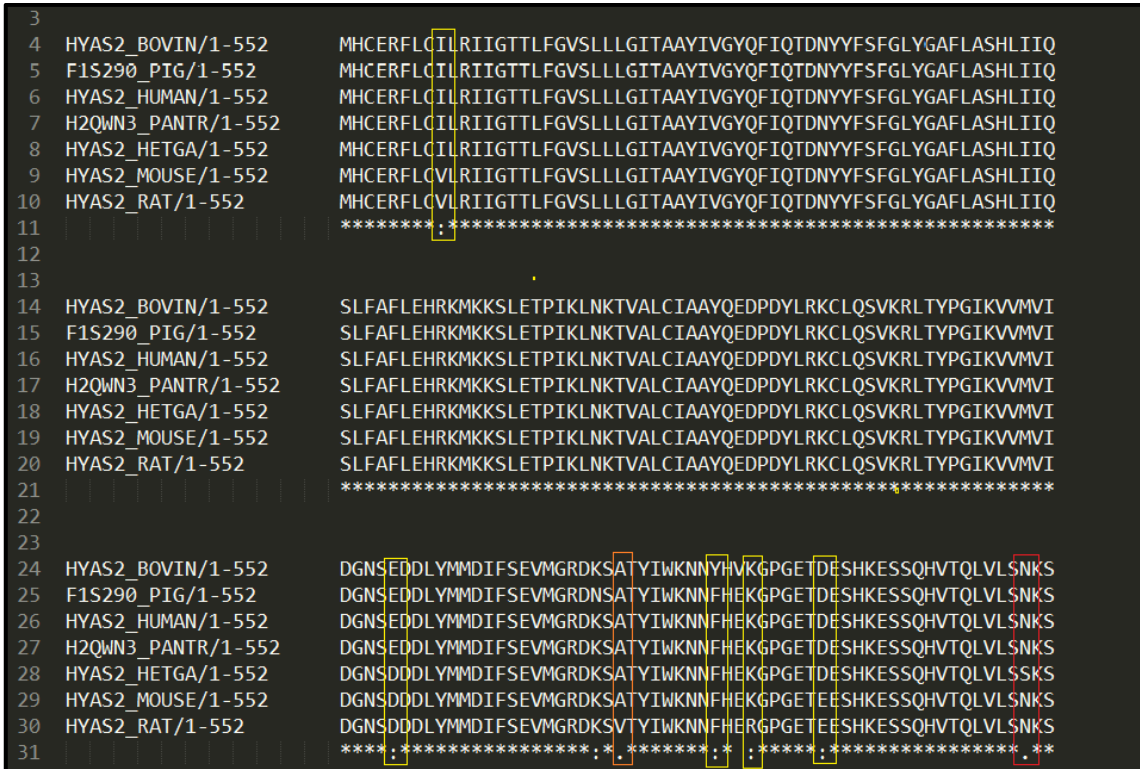


Figura 17: Fotografia de les alineacions de seqüències proteiques de la proteïna HAS2 en els diferents organismes seleccionats.

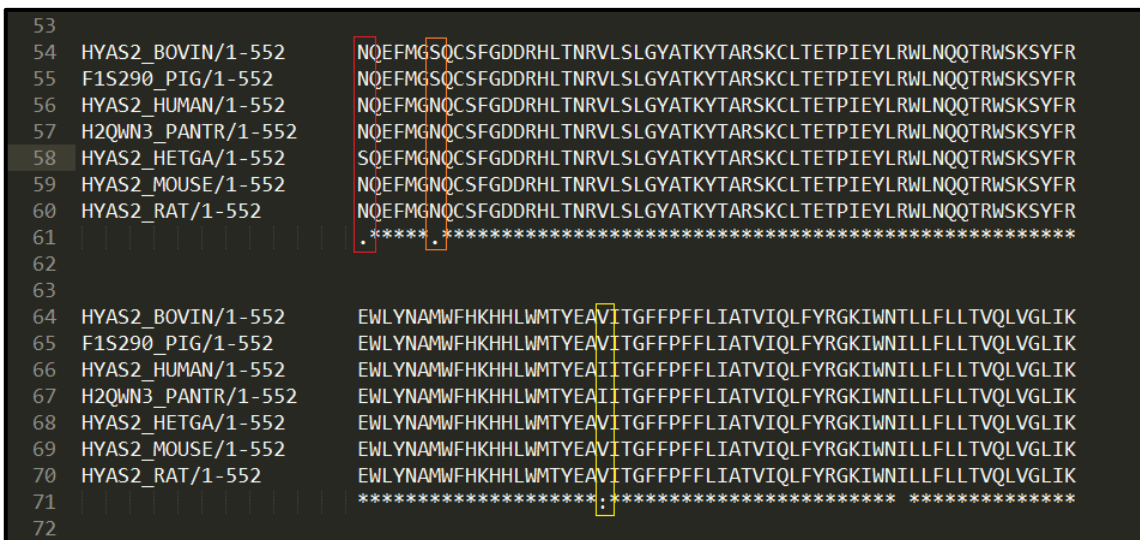


Figura 18: Fotografia 2 de les alineacions de seqüències proteiques de la proteïna HAS2 en els diferents organismes seleccionats.

5.2.3. Detecció de la selecció natural

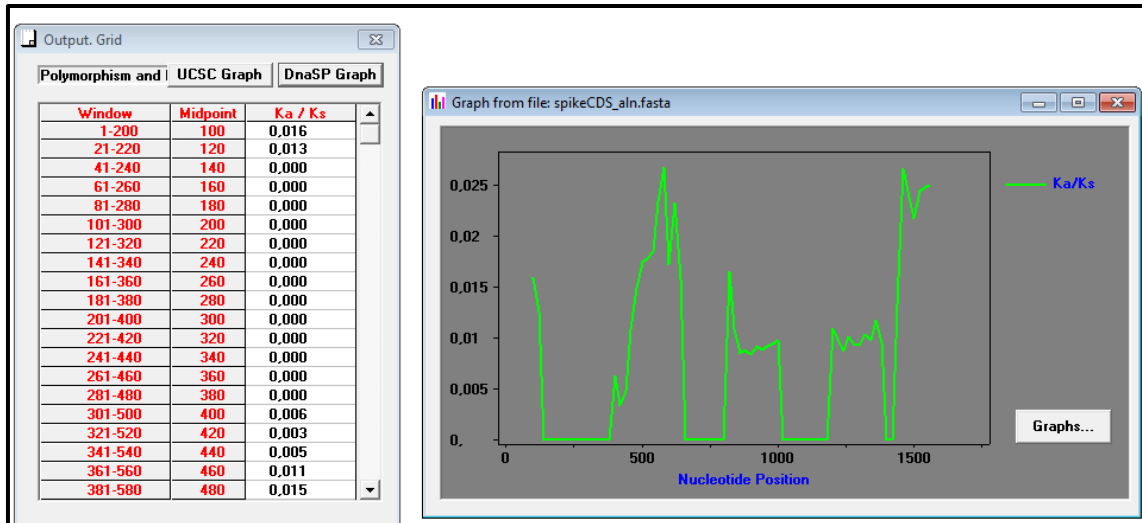


Figura 19: Extret del programa DnaSP on veiem si la selecció natural ha actuat en la seqüència de l'*Heterocephalus Glaber* (Rata talp nua) respecte la del *Mus Musculus* (Ratolí de

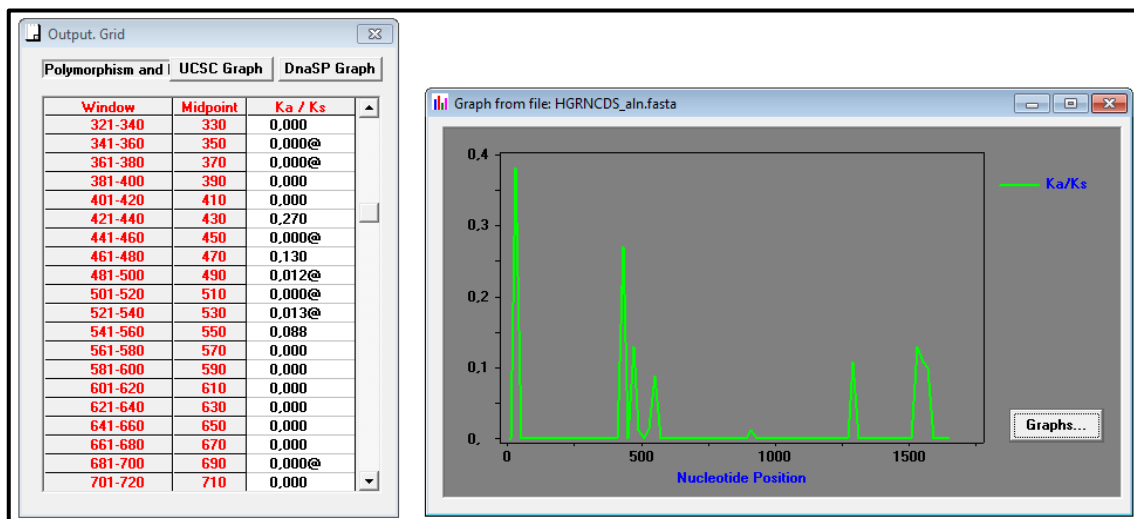


Figura 20 : Extret del programa DnaSP on veiem si la selecció natural ha actuat en la seqüència de l'*Heterocephalus Glaber* (Rata talp nua) respecte la de la *Ratus Norvegicus* (Rata)

5.3. Discussió dels resultats

Els dos grans resultats que obtenim després de l'estudi, són a la comparació de la proteïna en els diferents organismes i en la detecció de la selecció natural. Ho dividirem per tant, en dos grans blocs.

5.3.1. Comparació de la proteïna HAS 2

Observem que els canvis importants (indicats a les fotografies en un requadre de color vermell) tenen lloc en els aminoàcids que ocupen les posicions 178 i 301. Per tant, les diferències que presenta la seqüència de la proteïna HAS2 en l'*Heterocephalus Glaber*, apareixen en la posició de dos aminoàcids que pertanyen al domini proteic de la proteïna.

Tot i que hi ha dos llocs on es manifesta un canvi, aquest és el mateix en les dues posicions. La seqüència proteica de l'organisme té una "S" (correspon a l'aminoàcid anomenat Serina) en comptes d'una "N" (correspon a l'aminoàcid anomenat Asparagina).

Els altres canvis que el programa ha detectat en les seqüències o són poc importants, ja que no canvien la funció de la proteïna perquè l'aminoàcid que canvia té les mateixes propietats bioquímiques que el que presenten els altres organismes (assenyalats en un requadre groc). O bé, no interessen perquè no es produeixen en la seqüència de la rata talp nua que és la seqüència important per la pràctica (assenyalats en un requadre taronja).

Es produeix un canvi d'un aminoàcid amida, l'Asparagina, per un aminoàcid alcohol·lic, la Serina.

Un cop identificat el canvi, quan observem l'àcid hialurònic sintetitzat per l'enzim HAS2 ens adonem que el de l'*Heterocephalus glaber* és més llarg, té un pes molecular més elevat i és sintetitzat en molta més quantitat que en la resta d'animals.

Com que l'única diferència significativa que hem observat en la comparació de l'enzim és aquest canvi aminoacídic* d'una asparagina per una serina, podem dir que aquesta mutació és la responsable, d'alguna forma, de fabricar aquest àcid hialurònic diferent.

Per poder elaborar una hipòtesi sobre el perquè de l'efecte d'aquest canvi, hauríem de buscar les propietats dels aminoàcids:

- L'Asparagina: és codificada pels codons AAU y AAC.

La seva fórmula simplificada és: **C₄H₈N₂O₃**

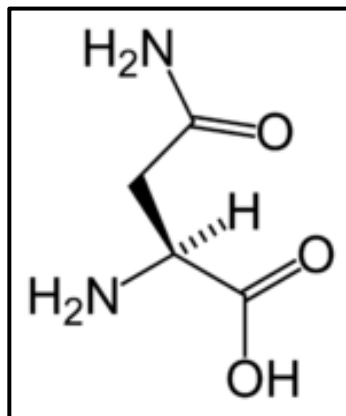


Figura 21: Estructura tridimensional de la Asparagina. Extreta de la pàgina web: <http://es.wikipedia.org/wiki/Asparagina>

Dintre de les propietats d'aquest aminoàcid hi trobem que col·labora en la síntesi de les glucoproteïnes i que el seu dèficit pot provocar alteracions metabòliques. Aquests dos fets ens poden ser interessants per comprendre perquè el canvi aminoacídic detectat té com a conseqüència l'allargament de l'àcid hialurònic i la síntesi en major quantitat d'aquest.

- La Serina: és codificada pels codons: UAA AAU

La seva fórmula simplificada és: **C₃H₇NO₃**

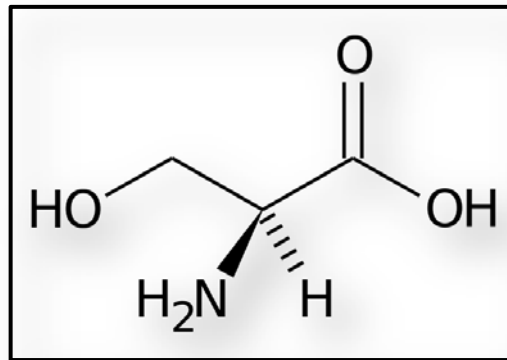


Figura 22 : Estructura tridimensional de la Serina. Extreta de la pàgina web: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aminoacido_serina_formula.svg

Per tant aquest aminoàcid té un carboni menys que el primer, és una mica més curt.

S'observa que les proteïnes o enzims que tenen aquest aminoàcid tenen aquestes propietats: són un important hidratant de la pell, són importants per al funcionament de l'ARN i ADN, són essencials per al correcte manteniment d'un sistema immunològic saludable i el seu dèficit pot provocar alteracions en la textura de la pell i trastorn dels triglicèrids

Mirant les propietats i les funcions dels aminoàcids, no puc elaborar una hipòtesi sobre el perquè de l'efecte de la mutació. S'hauria de veure com actua realment l'aminoàcid canviat in vivo*.

5.3.2. Detecció de la selecció natural

Per fer l'estudi de com ha actuat la selecció natural sobre el gen HAS2 he utilitzat el *Mus musculus* i la *Rattus norvegicus* per comparar-les amb l'*Heterocephalus glaber*, perquè són espècies pròximes a aquest, i tenien el mateix gen d'origen.

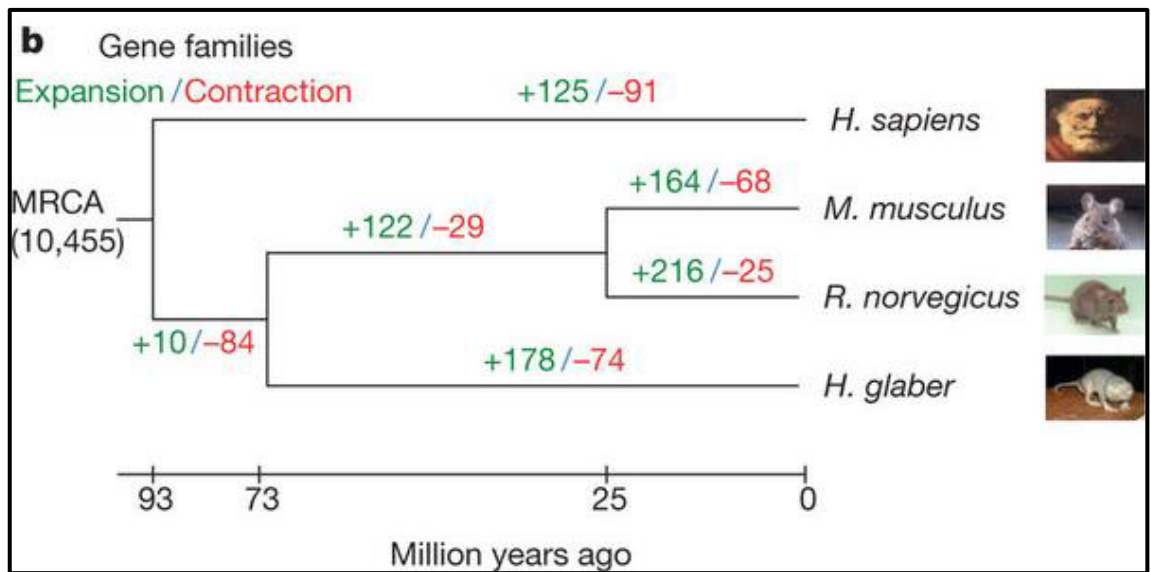


Figura 23: Arbre filogenètic que explica l'expansió i la contracció en el gen d'una família. Els números designen el nombre de gens de la família que s'han extés (verd) i retractat (vermell) des de que les diferents espècies van separar-se de l'organisme antecessor. Esquema extret de l'article de la revista Nature : "Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat".

A

En les dues gràfiques i taules que he obtingut gràcies al programa DnaSP per detectar l'evidència o no de selecció natural, la ratio de la Ka/Ks està entre el 0 i el 0,5 aproximadament.

Això vol dir que les mutacions que s'han anat originant al llarg dels anys han sigut, majoritàriament, mutacions sinònimes, és a dir, canvis que no causen cap canvi en el funcionament de la proteïna.

En estar la ratio entre el 0 i el 0,5, vol dir que la selecció natural selecciona les mutacions que es produïxen en el gen, negativament, és a dir, evita que s'acumulin i tendeix a eliminar-les. El gen HAS2 és un gen que no admet canvis en la seva composició, perquè la seva funció en resultaria canviada.

Tot hi haver obtingut un resultat, per a que fos més fiable, hauria d'haver utilitzat més seqüències de rates talp, però a la base de dades UniProt, només n'hi ha una seqüenciada.

Al mirar la meua hipòtesi, m'adono que tenia raó en una part, la selecció natural, en el passat ha fixat la mutació trobada al gen HAS2 dels farumfers. Però no he predit, que ara, la selecció natural, actua negativament sobre les mutacions. Les elimina, perquè no vol alterar la funció del gen.

5.3.3. Entrevista amb un investigador de l'IGBMC

Per a obtenir una opinió professional sobre el tema i els resultats obtinguts, he decidit fer una entrevista a Emmanuel Compe, investigador de l'IGBMC que conec personalment des que sóc petita.

Li he realitzat una entrevista via internet, ja que viu a Estrasburg i era l'única manera possible de deixar constància de la vericitat de l'entrevista.

Aquesta, consisteix en preguntes que estan destinades a discutir els resultats de la part pràctica del meu treball. La deixo a continuació:

-Estic realitzant un treball de recerca sobre l'únic animal del món que no pot tenir càncer, i els beneficis que aportaria a la humanitat, el fet de conèixer com fa per no patir-ne. He sol·licitat la seva ajuda per rebre l'opinió d'un professional sobre el tema, a fi de respondre a les preguntes que m'he plantejat durant l'elaboració del meu treball.

Li explico, hi ha una mutació en el gen HAS2 que sintetitza per un enzim que ell, a la seva vegada, sintetitza àcid hialurònic. Aquesta mutació, canvia una N (Asparagina) per una S (Serina), i fa, que l'àcid hialurònic sintetitzat sigui de major pes molecular que el de la resta d'organismes.

Vostè pensa que es podria, en un ratolí o una rata, modificar el gen HAS2, de forma que fos idèntic al de l'heterocephalus glaber?

Aquest tipus de tècnica s'utilitza amb molta freqüència en ratolins (la rata és una mica més difícil de manipular genèticament). Això es coneix sota el concepte de ratolí transgènic "knock-in", que no s'ha de confondre amb els models "knock-out" en què els gens d'interès ja no s'expressen. En el cas dels ratolins knock-in, l'objectiu és introduir una mutació en el gen d'interès mitjançant la recombinació homòloga*. Així es podria aconseguir fàcilment un ratolí portador de les dues mutacions que presenta el farumfer.

Si mirem l'alineament múltiple de les seqüències d'aquestes dues espècies, el gen sembla estar molt ben conservat d'una espècie a l'altra, la qual cosa augmenta les possibilitats d'aconseguir l'èxit a la hora de mutar el gen del ratolí. Però compte, aquesta tècnica d'organismes transgènics, encara que funcioni bé, demana temps. De fet, hauran de passar dos o tres anys abans d'obtenir els primers animals mutants!

Cal que sàpigues que avui dia existeixen molts models de ratolins transgènics que porten mutacions implicades en diverses malalties genètiques en els éssers humans. Aquests animals són generats amb l'objectiu de veure quines són les conseqüències de la mutació en tot l'organisme i en cada òrgan específicament. També has de tenir en compte que molts anàlisis no es fan amb animals, sinó que es fan a partir de cèl·lules cultivades, ja que són molt més fàcils de

manipular. A més a més es poden modificar fàcilment genèticament (es triguen pocs mesos en observar-se els resultats) i es pot controlar el medi d'incubació com es desitja i sotmetre les cèl·lules a tots els tractaments que es vulgui.

En el teu cas, seria interessant veure com les cèl·lules humanes o com els ratolins mutants sintetitzen àcid hialurònic en comparació amb cèl·lules aïllades del farumfer, i així poder demostrar que les mutacions influeixen directament sobre la capacitat del gen HAS2 per sintetitzar àcid hialurònic. També podríem veure si les cèl·lules mutades són capaços o no d'aglomerar-se convenientment.

L'animal transgènic, adquiriria la capacitat de sintetitzar aquest àcid hialurònic de major pes molecular?

Si aquestes mutacions són realment la causa de la síntesi d'un àcid hialurònic amb més pes molecular en *Heterocephalus glaber*, aleshores el ratolí mutat també serà capaç de sintetitzar aquest àcid hialurònic. Funcionaria perquè hauríem les mutacions en els al·lels corresponents.

Una altra idea interessant seria la d'expressar fortament el gen HAS2 de la rata talp en cèl·lules murines o humanes i veure si aquesta sobreexpressió és suficient per produir un àcid hialurònic de més massa molecular.

Així doncs, podria ser una possible forma de curar el càncer, que no aportaria cap efecte negatiu a cap espècie a la que se li produís la mutació?

Primerament no es correcte parlar de " el càncer" perquè no n'hi ha únicament un, els càncers són extremadament diversos i d'origen multifactorial. La pregunta correcta seria si l'animal és capaç de protegir contra totes les formes de càncer. A aquesta pregunta és difícil de respondre! Aquest seria tot l'interès d'investigar un animal d'aquest tipus : poder establir a partir d'un animal model d'aquest tipus, com és la mutació i si és suficient per canviar l'àcid hialurònic i fer que ocupi un paper "protector" de l'organisme contra els tumors.

Creu que el fet de modificar el gen HAS2 afectaria negativament al funcionament interior del ratolí?

És difícil respondre a aquesta pregunta. S'ha de recordar que aquest augment de la massa molecular de l'àcid hialurònic permet una major flexibilitat a la pell de les rates talp, permetent que es mogui millor pel món subterrani. No podem excloure la possibilitat que la mutació del mateix lloc a la mateixa proteïna en el ratolí, provoqués un efecte diferent. Per respondre a la pregunta, no hi ha altra alternativa que l'experimentació ...

Creu que si funciona en ratolins pot arribar a funcionar en altres organismes, i fins i tot en humans?

Altres animals són molt utilitzats per dur a terme estudis genètics. Com per exemple la *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*) o el cuc nematode (*Caenorhabditis elegans*). Aquests animals són fàcils de manipular genèticament.

Per als homes, el problema és una mica més complicat !!! En primer lloc, avui dia, segueix sent tècnicament impossible. És impossible canviar un gen en totes les cèl·lules que formen part d'un ésser humà. Una altra alternativa seria l'ús de cèl·lules mare, que podrien ser modificades genèticament i utilitzar-les per tal de generar un nou ésser humà, és a dir, generar un clon mutat humà! Aquests enfocaments del tema no poden realitzar-se perquè estan prohibits per raons ètiques òbvies!

Creu vostè que si la investigació fos realitzable, es podria aconseguir la manera de trobar un tractament efectiu contra el càncer?

És cert que aquest treball suggereix que hi ha raons per creure que l'àcid hialurònic pot ser eficaç per als éssers humans en la lluita contra el càncer. Aquesta molècula s'utilitza ja en cremes antiarrugues o per alleujar el dolor de les injeccions dels pacients que pateixen d'artritis al genoll. Llavors, per què

no imaginar-nos que aquesta molècula pugui donar lloc a l'elaboració de nous tractaments locals contra certs tipus de càncer de la pell, per exemple? Però, és important que sàpigues que hi han diferents tipus de càncers i que els seus corresponents orígens són realment complexos. Per a què l'àcid hialurònic es reveli ser "LA SOLUCIÓ" per la curació de tumors, s'hauran de realitzar nombrosos estudis.

També he vist, en un article, que els telòmers de l'heterocephalus glaber són més curts que els de la resta dels organismes, i que produeix telomerasa en excés, però que tot i així aconsegueix mantenir els telòmers intactes i per això les seves cèl·lules no envelleixen.

Com creu que és això possible?

Sembla ser, que l'activitat de la telomerasa està augmentada en les cèl·lules mare dels farumfers.

Cal que sàpigues, que l'envelliment de les cèl·lules no està lligat únicament a la longitud dels telòmers. S'haurien de realitzar molts més estudis per tal de saber com l'animal és capaç de viure una vida espectacularment llarga, com per exemple, hauríem d'estudiar molt minuciosament tot el seu genoma per veure si d'altres mutacions genètiques podrien estar relacionades amb això. També s'haurien d'analitzar altres mecanismes com els processos de reparacions de l'ADN, l'activitat mitocondrial, etc.

Creu que l'home podria beneficiar-se d'alguna manera si sapigués exactament com les cèl·lules de la rata talp són capaces d'evitar l'envelliment?

El fet que aquest animal ens pugui proporcionar idees clau per comprendre com aconseguir la longevitat és indiscutible, però s'hauria d'estudiar més a fons.

Podríem llavors, viure més temps i millor?

Per aplicar a l'home els resultats obtinguts a partir de la investigació de la rata talp nua es necessitarà molt de temps... Però efectivament, ens podria mostrar alternatives que ens portin a solucions per a què poguem viure més i millor.

6. CONCLUSIONS

Un cop terminades tant la part teòrica, com la pràctica, redacto les conclusions que he deduït gràcies a la recerca que he realitzat.

1. És possible entendre un article científic complicat i fins i tot refer-ne un si es disposa de les eines bioinformàtiques adequades.
2. Durant la part pràctica, quan refeia una part de l'investigació que apareix a l'article, he detectat el mateix canvi que els autors de l'article, dues mutacions al gen HAS2 a les posicions 178 i 301, per tant, formen part del domini proteic i es manifestaran.
3. Les mutacions consisteixen en el canvi de la Serina per l'Asparagina a la proteïna o enzim HAS2. Això fa que aquest sintetitzi per una molècula d'àcid hialurònic més extensa que les que no pateixen la mutació. Per tant, l'àcid hialurònic dels mamífers que he seleccionat a la taules de proteïnes i gens per tal de fer les comparacions, és més curt i té un pes molecular menor que la de l'*Heterocephalus glaber*.
4. Aquest canvi d'aminoàcids, explica que l'àcid hialurònic actui de manera diferent en la rata talp nua, aconsegueix protegir-los contra el càncer induint la cèl·lula tumoral a l'apoptosi, però aquesta no és la funció principal de l'àcid, només ve com un "efecte secundari", ja que la propietat ve d'una mutació en la proteïna que normalment devia estar destinada per realitzar altres funcions.

5. No puc explicar com la mutació genera aquest "efecte secundari", ni perquè sintetitza aquest àcid hialurònic diferent, en molta més quantitat.

6. La selecció natural intervé negativament en la conservació de les mutacions que es produeixen a la proteïna (enzim) HAS2, perquè el gen que la codifica no accepta canvis en la seva seqüència, així doncs, s'intenta protegir la seqüència al màxim dels polimorfismes* per preservar la funció que duu a terme en l'animal.

7. En el món de la investigació, es veu al farumfer com un molt bon animal model per tal d'aconseguir algun dia la cura contra els tumors. Tot i que es té esperança, encara situen aquest possible fet lluny en el temps.

8. Seria possible crear un ésser humà que fos immune a tots els tipus de càncer a partir de cèl·lules mare a les que hauríem de modificar el genoma, concretament, el gen HAS2 introduint-hi les dues mutacions que s'han detectat durant l'estudi. L'inconvenient és que ens trobaríem amb problemes ètics i morals, ja que actualment està prohibit i mal vist la clonació o mutació d'éssers humans.

9. La rata talp nua ens pot mostrar alternatives que ens portin a solucions per a què poguem viure més i millor (gràcies al coneixement de com funcionen els seus telòmers i la seva telomerasa), però per aplicar a l'home els resultats obtinguts de la investigació, es necessitarà molt de temps.

10.Finalment, argumentant el meu títol: sí, la rata talp nua ens ajuda en la lluita contra el càncer, ja que ens està donant a conèixer nombrosos mecanismes sobre la possibilitat de com eliminar tumors. Potser, no és possible aplicar-ho ara en humans, però ens ajuda a comprendre certs aspectes del càncer, i a mantenir-nos amb esperances pel futur.

7. GLOSSARI

-Definicions extretes de glossaris de genètica i de l'IEC (Institut d'Estudis Catalans)

A

- **Àcid glucurònic (D-glucurònic):** àcid carboxílic d'estructura similar a la de la glucosa. La seva fórmula química és $C_6H_{10}O_7$. És comú en les cadenes de carbohidrats de proteoglicans i forma part de les secrecions mucoses, glucocàlix, matriu intracel·lular d'animals.
- **Afinitat electrònica:** intercanvi d'energia quan s'afegeix un electró a un àtom neutre per formar un ió negatiu. Aquesta propietat només es pot mesurar en un àtom en estat gasós.
- **Apoptosi:** forma de mort cel·lular programada en els organismes pluricel·lulars.
- **ARN ribosòmic:** tipus d'ARN sintetitzat als nuclèols per l'ARN polimerasa I, i és a més la part central dels ribosomes, l'òrganul fabricant de les proteïnes a totes les cèl·lules vives. La funció de l'ARNr és proporcionar un mecanisme per a decodificar l'RNA missatger a aminoàcids i interaccionar amb l'RNA transferència durant el procés de traducció proporcionant l'activitat peptidil transferasa.
 - ARNr28S:** Subunitat de l'ARN ribosòmic que sedimenta a un coeficient igual a 28.
- **ARN missatger:** molècula d'ARN que serveix de model químic per a crear un producte proteic. L'ARNm és transcrit a partir d'una plantilla d'ADN i porta informació codificada fins a les regions on se sintetitzen les proteïnes: els ribosomes.
- **Artritis:** Inflamació articular.

B

- **Base de dades:** conjunt de dades organitzat de manera específica permetent l'accés a la informació de forma fàcil i ràpida. En trobem normalment a internet.
- **Base nitrogenada:** component d'un nucleòtid de l'ADN o ARN. N'hi han 5; adenina (A), citosina (C), guanina (G), Timina (T), uracil (U).
- **Bioinformàtica :** aplicació de les tecnologies de la computació i la informació per l'anàlisi biològic.

C

- **Canvi aminoacídic:** Canvi dels aminoàcids d'una proteïna originat per una mutació al gen o un error de traducció de l'ARN missatger.

D

- **Deriva genètica:** Fluctuacions en les freqüències gèniques produïdes a l'atzar, més evidents en poblacions aïllades i petites.

E

- **Endogàmia:** Heterogàmia en què els gàmetes provenen d'una soca comuna o d'individus emparentats.
 - **Exó:** Fragment d'un ARN premissatger que sobreviu al procés d'acoblament per formar part de l'ARN missatger madur. Els exons conformen la regió codificant del gen.
-

I

- **Inhibir:** Detenir o restringir (la funció d'un òrgan, d'una activitat fisiològica o psicològica, d'una reacció química, etc.).
- **In vivo:** Expressió llatina que vol dir " que te lloc dintre r'un organisme".

L

- **Llenguatge de programació:** llenguatge formal dotat de semàntica que es pot utilitzar per controlar el comportament d'una màquina, en particular, un ordinador, per realitzar tasques específiques.

N

- **N-acetilglucosamina:** monosacàrid derivat de la glucosa. És una amida entre glucosamina i àcid acètic. Té la fórmula molecular de $C_8H_{15}NO_6$, una massa molar de 221.21 g/mol i és significatiu en diversos sistemes biològics.

P

- **Pèls sensorials:** Pèls que serveixen per sentir el contacte amb les coses.
- **Polimorfisme :** existència de múltiples al·lels d'un determinat gen dins una població.
- **Polisacàrid:** Polímer format per cadenes molt llargues de monosacàrids o ramificats. Són anomenats també glicans.

S

- **Script:** són programes , usualment petits o simples , per a realitzar generalment tasques molt específiques. Els scripts són un conjunt d'instruccions generalment emmagatzemades en un arxiu de text que han de ser interpretats línia a línia en temps real per a la seva execució

T

- **Telomerasa:** enzim que afegeix una seqüència específica d'ADN que es repeteix ("TTAGGG" en tots els vertebrats) a l'extrem 3 'de les cadenes d'ADN en les regions dels telòmers, presents als extrems dels cromosomes eucariotes.
- **Telòmer:** Extrem del cromosoma, dotat de la propietat d'adherir-se a l'embolcall nuclear.

8. ANNEXOS

8.1. Articles

Article 1: *"High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat"*. Pàg 53-58

Article 2: *"Genome sequencing reveals insights into psycology and longevity of the naked mole rat"*. Pàg 59-63

Article 3: *"El único animal immune al cáncer revela su secreto"*. Pàg 64-67

Article 4: *"La rata topo desnuda muestra que el ácido hialurónico puede ser una nueva vía para combatir el cáncer"*. Pàg 68-69

High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat

Xiao Tian^{1*}, Jorge Azpurua^{1*}, Christopher Hine^{1†*}, Amita Vaidya¹, Max Myakishev-Rempel¹, Julia Ablueva¹, Zhiyong Mao^{1,2}, Eviatar Nevo³, Vera Gorbunova¹ & Andrei Seluanov¹

The naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) displays exceptional longevity, with a maximum lifespan exceeding 30 years^{1–3}. This is the longest reported lifespan for a rodent species and is especially striking considering the small body mass of the naked mole rat. In comparison, a similarly sized house mouse has a maximum lifespan of 4 years^{4,5}. In addition to their longevity, naked mole rats show an unusual resistance to cancer. Multi-year observations of large naked mole-rat colonies did not detect a single incidence of cancer^{2,6}. Here we identify a mechanism responsible for the naked mole rat's cancer resistance. We found that naked mole-rat fibroblasts secrete extremely high-molecular-mass hyaluronan (HA), which is over five times larger than human or mouse HA. This high-molecular-mass HA accumulates abundantly in naked mole-rat tissues owing to the decreased activity of HA-degrading enzymes and a unique sequence of hyaluronan synthase 2 (*HAS2*). Furthermore, the naked mole-rat cells are more sensitive to HA signalling, as they have a higher affinity to HA compared with mouse or human cells. Perturbation of the signalling pathways sufficient for malignant transformation of mouse fibroblasts fails to transform naked mole-rat cells. However, once high-molecular-mass HA is removed by either knocking down *HAS2* or overexpressing the HA-degrading enzyme, *HYAL2*, naked mole-rat cells become susceptible to malignant transformation and readily form tumours in mice. We speculate that naked mole rats have evolved a higher concentration of HA in the skin to provide skin elasticity needed for life in underground tunnels. This trait may have then been co-opted to provide cancer resistance and longevity to this species.

Mice and rats are standard animal models for cancer research due in part to their short lifespan and high incidence of cancer. However, these traits indicate that mice and rats have fewer anticancer mechanisms, and novel tumour resistance mechanisms are less likely to be discovered using these models. Here we focused our research on a small rodent, the naked mole rat, which in contrast to mice and rats is long-lived and cancer resistant.

Our previous studies identified a novel anticancer mechanism in the naked mole rat, termed early contact inhibition (ECI)⁷. Contact inhibition is a process of arresting cell growth when cells come in to contact with each other or the extracellular matrix. Contact inhibition is a powerful anticancer mechanism that is lost in cancer cells⁸. Naked mole-rat cells arrest at a much lower density than mouse cells, and the loss of ECI makes cells more susceptible to malignant transformation⁷. However, the signals triggering ECI in naked mole rats remained unknown.

While culturing multiple lines of naked mole-rat fibroblasts we noticed that the culture media became very viscous after a few days. Viscosity measurements confirmed that the media conditioned by the naked mole-rat cells was more viscous than the media conditioned by human, guinea-pig or mouse cells (Fig. 1a). We included the guinea-pig because it is phylogenetically closer to the naked mole rat than the mouse. We identified the viscous 'substance' secreted by the naked

mole-rat fibroblasts as high-molecular-mass HA (HMM-HA). Treatment with hyaluronidase (HAase), which specifically digests HA, reduced the media viscosity to background levels (Fig. 1a). Naked mole-rat embryonic fibroblasts, which do not display ECI, did not increase viscosity of the culture media (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1).

HA is an unbranched disaccharide glucuronic acid/*N*-acetylglucosamine polymer and is one of the main components of the extracellular matrix⁹. Biological responses triggered by HA depend on the HA polymer length. HMM-HA represses mitogenic signalling and has anti-inflammatory properties¹⁰, whereas low-molecular-mass HA promotes proliferation and inflammation¹¹.

Analysis of HA from tissue culture media using pulse-field electrophoresis showed that the HA secreted by naked mole-rat cells has a molecular mass of 6–12 MDa, whereas mouse and guinea-pig HA range from 0.5 to 3 MDa (Fig. 1b); human HA has a molecular mass of 0.5–2 MDa¹². Naked mole-rat embryonic fibroblasts did not secrete HMM-HA (Fig. 1b).

Notably, a mutated clone NMR SF Mut (mutated naked mole-rat skin fibroblasts), which spontaneously lost the ECI phenotype and p16^{INK4a} expression⁷, still produced HMM-HA (Fig. 1a, b), indicating that the physical presence of HMM-HA is not sufficient for the ECI phenotype; rather, the intact signalling pathway leading from HMM-HA to induction of p16^{INK4a} is required. These experiments establish HMM-HA as the extracellular signal that triggers ECI.

In vertebrate cells, HA is produced by HA synthases HAS1, HAS2 and HAS3 that differ in tissue distribution and the size of HA produced¹³. Naked mole-rat skin fibroblasts overexpress HAS2, the enzyme responsible for the synthesis of HMM-HA, in comparison with mouse and human fibroblasts (Fig. 1c). Naked mole-rat embryonic fibroblasts, which do not secrete HMM-HA, did not show increased levels of HAS2. The levels of HAS1 and HAS3 were similar between mouse, human and naked mole-rat cells (Fig. 1c). Collectively, these results show that naked mole-rat cells, which display ECI, secrete HA of exceptionally high molecular mass.

Hyaluronan synthases are highly conserved in vertebrates. The HAS2 protein has 98.7% identity and 100% similarity between human and mouse. We cloned and sequenced HAS2 complementary DNA from the naked mole rat and compared it to other mammalian *Has2* genes (Fig. 1d). Two asparagines that are 100% conserved among mammals were replaced with serines in the naked mole-rat HAS2. This change occurs in no other mammalian *Has2* genes deposited in GenBank, including the close relative of the naked mole rat, the guinea-pig. HAS2 contains seven putative transmembrane domains and a cytoplasmic loop¹⁴. The conserved regions carrying asparagine to serine substitutions correspond to the cytoplasmic loop containing the enzyme's active site. These unique amino acid changes may be responsible for the high processivity of the naked mole-rat HAS2. Indeed, when the cDNA for the naked mole-rat HAS2 was overexpressed in human HEK293 cells, they began secreting HMM-HA (Fig. 2a).

¹Department of Biology, University of Rochester, Rochester, New York 14627, USA. ²School of Life Science and Technology, Tongji University, 1239 Siping Road, Shanghai 200092, China. ³Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel. [†]Present address: Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts 02115, USA.

*These authors contributed equally to this work.

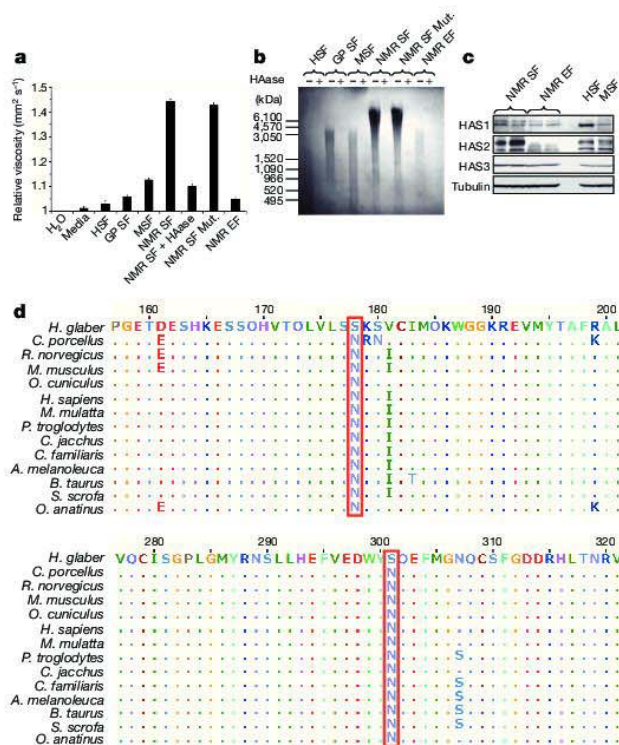


Figure 1 | Naked mole-rat cells secrete HA of exceptionally high molecular mass. **a**, Naked mole-rat cells make the culture media viscous. The viscosity of water, media or media conditioned with human skin (HSF), guinea-pig skin (GP SF), mouse skin (MSF) or naked mole-rat skin (NMR SF) fibroblasts for 20 days is shown. The NMR SF + HAase bar shows naked mole-rat conditioned media digested with HAase to specifically digest HA. NMR SF Mut are naked mole-rat skin fibroblasts that spontaneously lost the ECI phenotype⁷. NMR EF are naked mole-rat embryonic fibroblasts that do not show ECI. The experiment was repeated three times; error bars show s.d. **b**, Purified HA separated on pulse-field gel. Each sample was either run intact or pre-digested with HAase. The experiment was repeated five times, using both skin and lung fibroblasts (Supplementary Fig. 9), and a representative gel is shown. **c**, Western blot showing the levels of HA synthetases in naked mole-rat adult skin fibroblasts, naked mole-rat embryonic fibroblasts, human skin fibroblasts or mouse skin fibroblasts. **d**, Conserved catalytic domain of mammalian HAS2 proteins. The top sequence is the naked mole-rat HAS2. Dots indicate amino acids identical to the naked mole-rat sequence. The two amino acid changes unique to the naked mole rat are indicated by red boxes.

We then examined whether naked mole-rat tissues contain high levels of HA in comparison to mouse and guinea-pig. Tissue sections were stained with alcian blue, and control samples were treated with HAase before staining to show that the staining is specific to HA. Naked mole-rat skin, heart, brain and kidney were highly enriched for HA (Fig. 2b and Supplementary Fig. 2). Furthermore, the HA extracted from naked mole-rat tissues had a higher molecular mass than HA from mouse tissues (Supplementary Fig. 3). These results indicate that production of HMM-HA by naked mole-rat cells is not an artefact of tissue culture, but a unique *in vivo* property of this species.

HA levels are regulated by HA-degrading enzymes, HAases¹⁵. We measured HAase activity in naked mole-rat, mouse and human cells by quantifying HA degradation after incubation with these cells. HAase activity of the naked mole-rat cells was much lower than that of human, mouse or guinea-pig cells (Fig. 2c). Similarly, HAase activity was lower in the naked mole-rat tissues than in the mouse tissues (Fig. 2d). These results indicate that two mechanisms contribute to the accumulation of HMM-HA in the naked mole-rat: more robust synthesis and slower degradation.

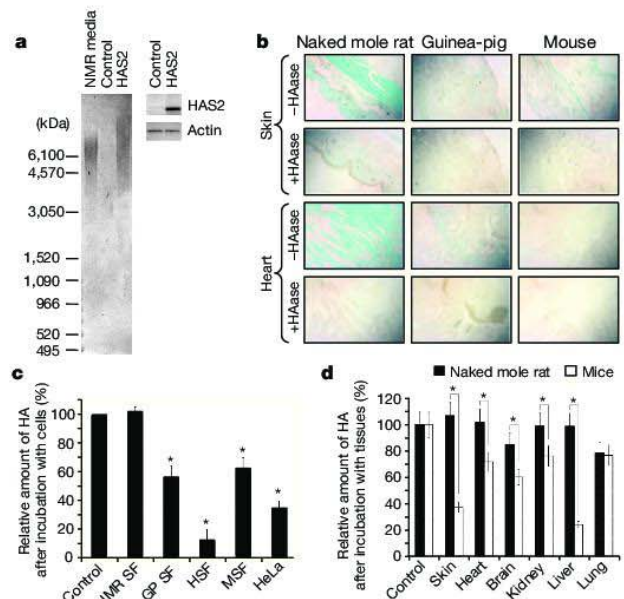


Figure 2 | Naked mole-rat tissues contain high levels of HA. **a**, Naked mole-rat HAS2 overexpressed in human HEK293 cells secretes HMM-HA. The small panel on the right shows immunoblot with anti HAS2 antibodies on whole-cell extracts from the control and HAS2-transfected cells. **b**, Tissues from the naked mole rat, mouse and guinea-pig stained with alcian blue. The control samples treated with HAase do not show blue staining, demonstrating that the staining is specific to HA. Staining was performed on three different animals and representative skin and heart images are shown at $\times 40$ magnification. Brain and kidney are shown in Supplementary Fig. 2. **c**, Naked mole-rat fibroblasts have low HAase activity. Naked mole-rat skin fibroblasts (NMR SF), guinea-pig skin fibroblasts (GP SF), human skin fibroblasts (HSF), mouse skin fibroblasts (MSF) or HeLa cells were incubated with the media containing HMM-HA for 4 days. The levels of HA were then analysed by pulse-field gel. Control samples were incubated in the absence of cells. The experiments were repeated four times (all samples except guinea-pig), and three times for guinea-pig; error bars show s.d.; asterisk indicates $P < 0.01$ by *t*-test. **d**, Naked mole-rat tissues have low HAase activity. Media containing HMM-HA was incubated with corresponding tissue fragments from naked mole rats or mice for 6 h and HA levels analysed by pulse-field gel. The experiments were repeated three times and error bars show s.d.; asterisk indicates $P < 0.05$ by *t*-test.

We previously demonstrated that ECI contributes to cancer resistance of the naked mole rat by arresting cell cycle via the induction of p16^{INK4a} (ref. 7). To determine the role of HMM-HA in ECI we cultured naked mole-rat fibroblasts in the presence of bacterial HAase. Enzymatic digestion of HMM-HA abrogated the ECI phenotype and caused naked mole-rat cells to grow to complete confluence (Fig. 3a, b). Upon subsequent removal of HAase from the culture media, a fraction of cells detached from the plate and died by apoptosis (Supplementary Fig. 4), whereas the remaining cells re-acquired the ECI phenotype (Fig. 3c).

CD44 is a major HA receptor in human and mouse cells^{9,11,16}. To confirm that HA signalling triggers ECI via the CD44 receptor we cultured naked mole-rat cells in the presence of a CD44-blocking antibody. Naked mole-rat cells grown with CD44 antibodies reached a higher cell density (Fig. 3b), indicating that the ECI signal from HMM-HA is in part transmitted via the CD44 receptor.

We then used a flow cytometric assay to measure the affinity of the naked mole-rat cells to fluorescently labelled HA. Naked mole-rat cells displayed a twofold higher affinity to HA than mouse or human cells (Fig. 3d); this higher affinity can contribute to higher sensitivity of naked mole-rat cells to HA signalling.

On the cytoplasmic face, the CD44 receptor interacts with NF2 (merlin), which mediates contact inhibition¹⁷. The phosphorylated,

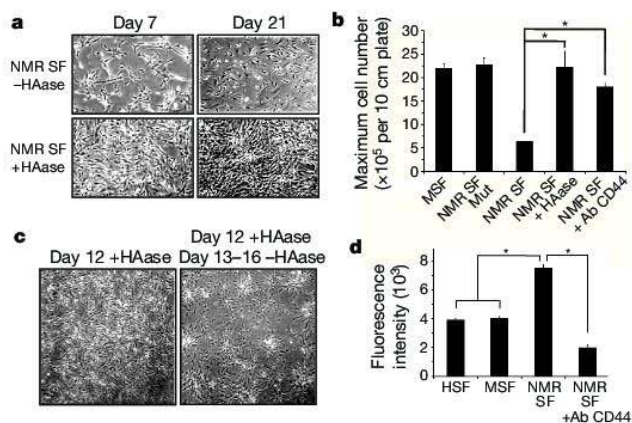


Figure 3 | HMM-HA is required for ECI. **a**, Naked mole-rat cells (NMR SF) grown in the presence of HAase do not display ECI and proliferate to high cell density. **b**, Quantification of cell growth, showing the maximum cell number per plate achieved under the indicated growth conditions. The last bar shows naked mole-rat cells grown in the presence of CD44-blocking antibody. The experiments were repeated four times (except the last bar, which was repeated three times) and error bars show s.d.; asterisk indicates $P < 0.001$ by t -test. **c**, Naked mole-rat cells were grown in the presence of HAase for 12 days, then HAase was removed. **d**, Naked mole-rat cells show the highest affinity to HA. Cells were incubated with fluorescein-labelled HA, and the average fluorescence was plotted. Experiment was repeated four times; error bars are s.e.m.; asterisk indicates $P < 0.001$ by t -test. Cells were photographed at $\times 40$ magnification.

growth-promoting form of NF2 was present in naked mole-rat cells grown in the presence of HAase, whereas cells cultured without HAase contained mainly the unphosphorylated growth-inhibitory form of NF2 (Supplementary Fig. 5). We previously showed that ECI is associated with induction of p16^{INK4a}, whereas the NMR SF Mut cells that do not display ECI have lost p16^{INK4a} expression⁷. Accordingly, naked mole-rat cells grown in the presence of HAase showed reduced levels of p16^{INK4a} (Supplementary Fig. 5). Collectively, these results establish that ECI is controlled by the HA-CD44-NF2 pathway.

We then tested the role of HMM-HA in the resistance of naked mole-rat cells to malignant transformation in a soft agar assay. SV40 large T antigen (SV40 LT) is a viral oncoprotein that binds and inactivates p53 and pRb. The mutant derivative LTK1 (K1) inactivates only p53, whereas LT(Δ 434-444) (Δ 434) inactivates only pRb and its family members¹⁸. A combination of H-Ras V12 and SV40 LT is sufficient to transform mouse fibroblasts¹⁹, but, as we showed earlier, it is not sufficient to confer anchorage-independent growth to naked mole-rat cells⁷. To test the role of HMM-HA in the naked mole-rat's resistance to transformation, we transfected naked mole-rat fibroblasts with H-Ras V12 combined with SV40 LT or its mutants K1 or Δ 434 and cultured them in soft agar in the presence of HAase. Under these conditions, cells transfected with H-Ras V12 and SV40 LT, or H-Ras V12 and Δ 434, formed robust colonies (Fig. 4a). Similarly, naked mole-rat cells cultured in the presence of CD44-blocking antibody formed colonies in soft agar (Supplementary Fig. 6). These results demonstrate that if HMM-HA is degraded by HAase or HA signalling is blocked by a CD44 antibody, naked mole-rat cells become susceptible to anchorage-independent growth triggered by H-Ras V12 and SV40 LT. In embryonic naked mole-rat fibroblasts, which do not secrete HMM-HA, H-Ras V12 and SV40 LT or Δ 434 were sufficient to trigger anchorage-independent growth (Supplementary Fig. 6).

We then generated H-Ras V12- and SV40 LT-expressing naked mole-rat cells, in which HMM-HA was abolished by either integrating short hairpin RNA (shRNA) targeting *HAS2* (Supplementary Fig. 7a) or overexpressing an HA-degrading enzyme HYAL2 (Supplementary Fig. 7b). These cells no longer increased the viscosity of their culture

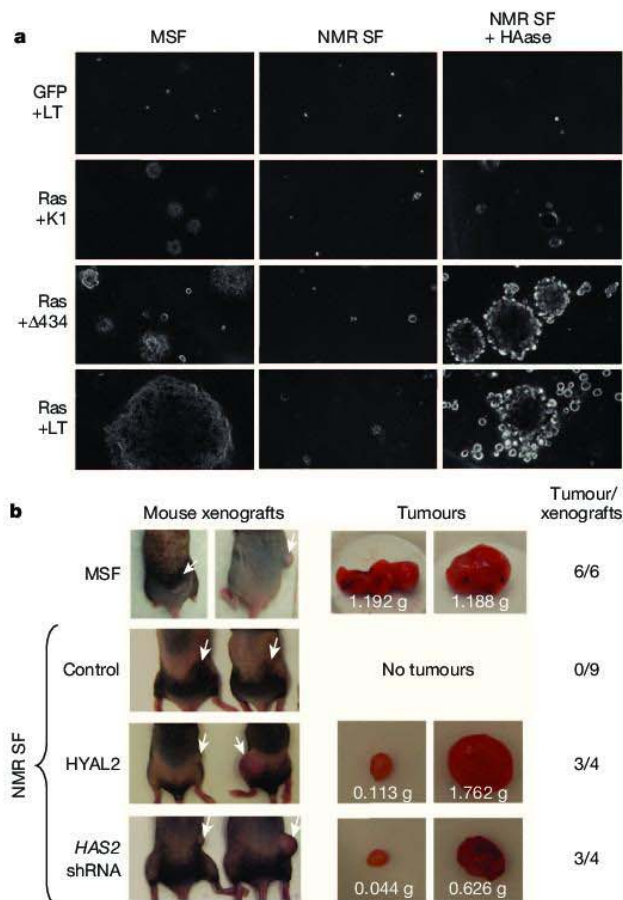


Figure 4 | Removal of HMM-HA makes naked mole-rat cells susceptible to malignant transformation. **a**, Soft agar assays of anchorage-independent growth. Mouse (MSF) or naked mole-rat (NMR SF) cells were transfected with vectors encoding SV40 LT (LT) or its mutant derivatives K1 or Δ 434, and H-Ras V12 (Ras), and plated in soft agar. Cells were cultured with or without HAase. The image shows colonies after 3 weeks of growth at $\times 200$ original magnification. The experiment was repeated three times. **b**, Mouse xenograft experiment with naked mole-rat cells in which HMM-HA was abolished. NIH-III immunodeficient mice were injected with mouse (MSF) cells expressing SV40LT and H-Ras V12 as a positive control, or naked mole-rat (NMR SF) cells expressing SV40LT and H-Ras V12 and either control shRNA, HYAL2 cDNA, or shRNA targeting *HAS2*. All xenografts with mouse cells formed large tumours. Xenografts with naked mole-rat cells expressing control shRNA did not form tumours, whereas naked mole-rat cells overexpressing HYAL2 or *HAS2* shRNA formed tumours in mice. The images show xenograft sites (arrows) and representative tumours. The number of xenografts resulting in tumour formation per the total number of xenografts with each cell type is shown on the right.

media (Supplementary Fig. 7c) and readily formed colonies in soft agar (Supplementary Fig. 8). To confirm that HMM-HA inhibits tumour formation *in vivo*, we performed xenograft experiments with naked mole-rat cells containing a knockdown of *HAS2*, or overexpressing HYAL2 (Fig. 4b). In the positive control, mouse cells expressing H-Ras V12 and SV40 LT readily formed tumours in mice. Naked mole-rat cells expressing H-Ras V12 and SV40 LT did not form tumours, consistent with an earlier report²⁰. Notably, naked mole-rat cells expressing H-Ras V12 and SV40 LT and shRNA to *HAS2* or overexpressing HYAL2 formed tumours in mice. This experiment establishes HMM-HA, produced by *HAS2*, as a key component responsible for the elevated cancer resistance of the naked mole rat.

The HMM-HA in the naked mole rat could have evolved as an adaptation to a subterranean lifestyle to provide flexible skin needed

to squeeze through underground tunnels. Interestingly, we found that cells of a different subterranean rodent, the blind mole rat, which is phylogenetically closer to mice and rats than to the naked mole rat, also secreted HMM-HA (Supplementary Fig. 9). In summary, our results demonstrate that extremely HMM-HA, its binding to the CD44 receptor, and lower HAase activity have a key role in mediating the cancer resistance of the naked mole rat. Using naked mole-rat HMM-HA in the clinic or targeting HYAL2, or the HA-CD44 signalling pathway, opens new avenues for cancer prevention and life extension.

METHODS SUMMARY

All animal experiments were approved and performed in accordance with guidelines set up by the University of Rochester Committee on Animal Resources. Naked mole rats were from the University of Rochester colonies. C57BL/6 mice and NIH III nude mice were purchased from Charles River Labs. Non-albino guinea-pigs were obtained from Elm Hill Labs. Cells and tissues were obtained from at least three different animals. Fibroblasts were isolated from lung and underarm skin. All cell lines were used at early passage (<12–15 population doublings).

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Received 15 June 2012; accepted 30 April 2013.

Published online 19 June; corrected online 17 July 2013 (see full-text HTML version for details).

1. Buffenstein, R. & Jarvis, J. U. The naked mole rat—a new record for the oldest living rodent. *Sci. Aging Knowl. Environ.* **2002**, pe7 (2002).
2. Buffenstein, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B* **178**, 439–445 (2008).
3. Kim, E. B. *et al.* Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* **479**, 223–227 (2011).
4. Turturro, A. *et al.* Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *J. Gerontol. A* **54**, B492–B501 (1999).
5. de Magalhães, J. P., Costa, J. & Toussaint, O. HAGR: the Human Ageing Genomic Resources. *Nucleic Acids Res.* **33**, D537–D543 (2005).
6. Delaney, M. A., Nagy, L., Kinsel, M. J. & Treuting, P. M. Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): A retrospective survey of lesions in a zoo population. *Vet. Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1177/0300985812471543> (2013).
7. Seluanov, A. *et al.* Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 19352–19357 (2009).
8. Abercrombie, M. Contact inhibition and malignancy. *Nature* **281**, 259–262 (1979).
9. Toole, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer* **4**, 528–539 (2004).
10. Kothapalli, D. *et al.* Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **176**, 535–544 (2007).
11. Puré, E. & Assoian, R. K. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell. Signal.* **21**, 651–655 (2009).
12. Holmes, M. W., Bayliss, M. T. & Muir, H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* **250**, 435–441 (1988).
13. Jiang, D., Liang, J. & Noble, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 435–461 (2007).
14. Watanabe, K. & Yamaguchi, Y. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **271**, 22945–22948 (1996).
15. Stern, R. & Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem. Rev.* **106**, 818–839 (2006).
16. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 33–45 (2003).
17. Morrison, H. *et al.* The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* **15**, 968–980 (2001).
18. Hahn, W. C. *et al.* Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2111–2123 (2002).
19. Rangarajan, A., Hong, S. J., Gifford, A. & Weinberg, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **6**, 171–183 (2004).
20. Liang, S., Mele, J., Wu, Y., Buffenstein, R. & Hornsby, P. J. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Aging Cell* **9**, 626–635 (2010).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements This work was supported by the grants from the US National Institutes of Health and Ellison Medical Foundation to V.G. We thank M. Van Meter for critically reading the manuscript.

Author Contributions X.T. performed HA analysis, HAase assays, soft agar assays, and generated cells for xenograft experiments; J.A. performed immunoblots and cloning and analysis of HAS2; C.H. identified HA, performed tissue staining, and soft agar assays; A.V. performed xenografts; M.-M.R. performed HA affinity assays; J.A. purified HA; Z.M. performed experiments with HAS2 expression; E.N. provided essential materials; X.T., J.A., C.H., A.S. and V.G. designed the study and analysed data; A.S. and V.G. wrote the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.G. (vera.gorbunova@rochester.edu) or A.S. (andrei.seluanov@rochester.edu).

METHODS

Animals. All animal experiments were approved and performed in accordance with guidelines set up by the University of Rochester Committee on Animal Resources. Naked mole rats were from the University of Rochester colonies. C57BL/6 mice and NIH III nude mice (NIH-Lyst bg-JFoxn1nu Btk xid) were purchased from Charles River Labs. Non-albino guinea-pigs were obtained from Elm Hill Labs. Cells and tissues were obtained from at least three different animals.

Cell culture. Primary mouse, guinea-pig, blind mole-rat and naked mole-rat cells were isolated from lung and underarm skin. Cells were obtained from five naked mole rats, three mice, three guinea-pigs, and three blind mole rats. The growth characteristics, and HA secretion, did not differ between the cell lines from different animals, therefore we performed the experiments on three skin cell lines from three animals. All cell lines were used at early passage (<12–15 PDs). Human primary skin fibroblasts HCA2 were a gift from O. Pereira-Smith. Embryonic naked mole-rat fibroblasts were isolated from eight mid-gestation embryos.

Mouse, human, guinea-pig and blind mole-rat cells were cultured at 37 °C, 5% CO₂, 3% O₂; naked mole-rat cells were cultured at 32 °C, 5% CO₂, 3% O₂ on treated polystyrene culture dishes (Corning) in EMEM media (ATCC) supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco), non-essential amino acids, sodium pyruvate, 100 units ml⁻¹ penicillin, and 100 µg ml⁻¹ streptomycin (Gibco).

Viscosity assay. To determine relative kinematic viscosity, 3 ml of distilled H₂O, unused complete EMEM media, or media conditioned with naked mole-rat, mouse, or human cells were run through a 0.6-mm capillary Ostwald viscometer (Barnstead International) at 22 °C and timed for the passage of the media or distilled H₂O through the capillary. For HAase control, naked mole-rat media was treated with hyaluronidase 1 U ml⁻¹ HAase from *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma-Aldrich). The relative viscosity of unused and conditioned media was determined by comparing times required to pass through the capillary to that of distilled H₂O. Samples were run three times to determine an average relative viscosity.

Cell growth analysis. To measure cell proliferation and the confluent density, cells were seeded on 60-mm gridded plates (Corning). Three 2 × 2 mm squares were marked on each plate and the number of cells in those squares was counted each day for 20 days. For cell growth in the presence of HAase, 24 h post plating the media was changed to media containing 3 U ml⁻¹ HAase (Sigma). Media was then replaced with fresh media containing the enzyme every 48 h. Images of the squares were taken using SPOT Advanced (Diagnostic Instruments) and analysed using the colony counting program on ImageQuant TL (GE). The average count of the three squares for each day was multiplied by 458.33 to give the total cell count per 10-cm plate. Cell count data were analysed using Microsoft Excel.

To calculate maximum cell number, cells were collected from the confluent plates and counted using Z2 Coulter counter (Beckman Coulter). Every sample was counted three times and the averages were used to calculate the maximum cell number from at least three independent experiments.

HA analysis by pulse-field gel electrophoresis. HA was purified from conditioned media (typically at day 20) by first treating 2 ml of conditioned media with 500 µg of proteinase K (Roche) at 50 °C for 45 min to remove proteins. Samples were then precipitated by adding 2 ml of 100% ethanol. The pellet was dissolved in 500 µl TE Buffer and incubated overnight at 4 °C. The following day, aliquots were removed and control samples treated with 1 U ml⁻¹ of HAase from *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma-Aldrich). Twenty-five microlitres of each sample was mixed with 5 µl 4M sucrose loading solution and loaded to a 0.4% pulse-field SeaKem Gold agarose gel (Cambrex). Ten microlitres of HA molecular size markers—HiLadder (~500 kDa to ~1,500 kDa) and Mega-HA Ladder (1,500 kDa to 6,000 kDa) (from Hyalose)—were run to determine the size of HA from each sample. Samples were run overnight at 4 °C at 75 V with a 1–10 running ratio in TBE buffer using CHEF-DRII system (Bio-Rad). The gel was next stained in a method adapted from ref. 21. Briefly, the gel was placed in a 0.005% (w/v) Stains-All (Sigma-Aldrich) in 50% ethanol solution overnight. To de-stain, the gel was placed in distilled H₂O for 18 h in the dark and then placed under ambient light in distilled H₂O for 1 h to complete the final de-staining stages and then photographed under white light. The amount of HA was quantified by counting pixels using Image J software.

HA extraction from tissues. Tissues were excised immediately after killing the animals and weighed. Tissues were chopped and the same amount of tissues were digested at 50 °C overnight in the digestion buffer containing 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS and 0.1 mg ml⁻¹ proteinase K (Roche). Then 27 mM MgCl₂ was added to chelate EDTA and Pefabloc SC was added to inhibit proteinase K. 500 units of benzonase endonuclease (Sigma-Aldrich) was added to remove nucleic acid. The complete digestion of DNA and RNA was confirmed by running the agarose gel and staining with ethidium bromide (Bio-Rad). Total polysaccharide extraction was performed by phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation. Finally, corresponding volume (100 µl/100 mg) of 10 mM Tris-Cl (pH 8.5) was added to dissolve the pellet.

Expression of naked mole-rat HAS2 gene in human cells. HEK293 cells were transfected with an expression vector containing HAS2 under the CMV promoter and allowed to express HAS2 for 2 days, after which HA secreted into the media was analysed by pulse-field gel. Control cells were transfected with a GFP expression vector.

HAase activity assay. Culture media containing HMM-HA secreted by naked mole-rat cells was mixed 1:1 with fresh media and incubated with 2 × 10⁵ naked mole-rat fibroblasts, human diploid fibroblasts, mouse fibroblasts, or HeLa cells for 4 days. Then the media was collected, HA was extracted and analysed on a pulse-field gel as described above. HA levels before and after incubation were compared as a measure of HAase activity. For analysis of tissues, corresponding tissues were chopped into 1-mm cubes and washed twice with PBS. HMM-HA containing media was incubated with equal amounts (by weight) of tissue fragments of each tissue type for 6 h and HA levels were analysed as above.

Antibodies. The following antibodies were used: HAS1 (ab104864 Abcam), HAS2 (sc-66916 Santa Cruz), HAS3 (sc-66917 Santa Cruz), α-tubulin (ab4074 Abcam), CD44 (monoclonal mouse IgG_{2A} clone 2C5, catalogue no. BBA10, R&D Systems), NF2/merlin (ab30329 Abcam), p16 (ab14244 Abcam), HYAL2 (ab68608 Abcam).

Tissue staining. HA detection in tissues was done as follows. Tissue samples from young animals (3-year-old naked mole rats, 3–5-month-old mice, 1-year-old guinea-pigs) were fixed in 10% buffered neutral formalin, embedded in paraffin and quadruple sections cut at 5 µm were mounted on glass slides. Slides were deparaffinized and hydrated in distilled H₂O. They were then placed in Coplin jars containing 40 ml of hyaluronidase digestion solution (40 U hyaluronidase from *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma) in 40 ml of PBS) for the samples to be digested or in 40 ml of PBS for the non-digested samples. The jars were microwaved for 1 min at 60 W and then transferred to a 37 °C oven for 1 h. The slides were rinsed four times in distilled H₂O, followed by three rinses with 3% acetic acid. Next, slides were placed in new Coplin jars containing 1.0% filtered alcian blue solution at pH 2.5 (alcian blue 8GX, C.I. 74240 (Leica)) in 3% acetic acid and microwaved at 60 W for 3 min followed by an additional 5 min incubation in the hot 1.0% alcian blue solution. Slides were rinsed three times in distilled H₂O, dehydrated in graded alcohols and rinsed three times in xylene. Images were taken by light microscopy.

Naked mole-rat cell growth assays with CD44 antibody. Naked mole-rat cells were seeded 50 cells per square onto cell-culture-treated 6-cm polystyrene gridded tissue culture plates (Corning). Twenty-four hours after plating, the media was changed to contain 5 µg ml⁻¹ of CD44 specific antibody (monoclonal mouse IgG_{2A} clone 2C5, catalogue no. BBA10, R&D Systems) or no antibody control. Media was changed every 24 h and images were taken daily using SPOT Advanced imaging software (Diagnostic Instruments). Images from three different squares from two independent plates were counted from both the CD44 antibody treated or control groups.

HA affinity assay. Naked mole-rat and mouse cells were collected at subconfluent exponential phase. One-hundred-thousand (10⁵) cells of each type were incubated for 45 min on ice in 210 µl PBS containing 1.5% fetal calf serum and 35 µg ml⁻¹ fluorescein-labelled HA (fluorescein-labelled HA from bovine trachea, sc-221733, Santa Cruz Biotech). Five-thousand cells from each replicate were analysed by FACS. The experiment was repeated four times.

Transfections. Naked mole-rat skin fibroblasts were seeded at 2 × 10⁵ cells per 100 mm plate 7 days before transfection. Mouse skin fibroblasts were seeded at 5 × 10⁵ cells per 100-mm plate 2 days before transfection. For transfection, cells were collected, counted and 10⁶ cells were transfected with 5 µg of plasmid DNA using Amaxa Nucleofactor II on program U-020 and solution NHDF (Amaxa). After transfection, cells were seeded at 2 × 10⁵ live cells per 10-cm plate for apoptosis analysis and 7 × 10⁴ live cells per 6-cm grid plates (Corning) for cell growth analysis in the same media as stated above. Media was replaced 24 h after transfection to remove dead cells due to electroporation.

Anchorage-independent soft agar growth assay. One million mouse, naked mole-rat wild-type and naked mole-rat mutant exponentially growing skin fibroblast cells were transfected by Amaxa with the following plasmid DNA mixtures: 5 µg pEGFP-N1 (Clontech) and 5 µg pSG5 large T (Addgene 9053), 5 µg pRas-V12 (Clontech) and 5 µg pSG5 large T, 5 µg pRas-V12 and 5 µg pSG5 large T K1 (Addgene 9055), or 5 µg pRas-V12 and 5 µg pSG5 large T Δ434–444 (Addgene 9054). After transfection, cells were seeded and allowed to recover for 24 h on 10-cm treated polystyrene plates (Corning) in ×1 minimum essential medium, Eagle with Earle's balances salt solution supplemented with 15% fetal calf serum and antibiotics (Gibco). The following day, a 2-ml final solution of 0.5% Difco Agar Noble (BD Bioscience) and ×1 media mixture was poured into 6-cm treated polystyrene plates (Corning) and allowed to solidify in incubators at 37 °C. After harvesting and counting cells transfected 24 h previously, 50 to 50,000 cells were serially diluted and re-suspended in 1 ml of ×2 media. This cell suspension was then quickly mixed with 1 ml 0.7% liquid Difco Agar Noble, making a final

0.35% agar/×1 media solution, and seeded on top of the solidified 0.5%/×1 media. Plates were incubated at 32 °C, 5% CO₂, and 3% O₂ for 24 h before the addition of 1 ml of EMEM media with or without HAase from *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma) at 3 U ml⁻¹. To test the effect of CD44 antibody, 5 µg ml⁻¹ of CD44 antibody (BBA10, R&D Systems) was added and changed daily. Cells were grown for 6 weeks, with the removal of old liquid EMEM media and the addition of 1 ml of new EMEM with or without 3 U ml⁻¹ HAase every 48 h to ensure efficient digestion of HMM-HA. Plates were monitored every 48 h and photographed at week 3 (mouse cells) and week 6 (naked mole-rat cells) after plating at ×200 on a Nikon TS100 phase contract microscope using SPOT software (Diagnostic Instruments).

shRNA-mediated HAS knockdown and HYAL2 overexpression. shRNAs were designed by Integrated DNA Technology (IDT) with shRNA Design Tool: 5'-GATCCGCCAGCTGCCTCAGAGGAATTCAGAGATTCCTCTGAGGCAGCTGGCTTTTTTGGAAA-3'; 5'-AGCTTTTCCAAAAAGCCAGCTGCCTCAGAGGAATCTCTTGAATTCCTCTGAGGCAGCTGGCG-3'. The corresponding 63-bp DNA oligonucleotides harbouring the 19-mer hairpin sequence, loop sequence, polythymidine tract (U6 terminator), BamHI and HindIII restriction site overhangs were designed according to the user manual of pSilencer 2.1-U6 neo kit (Life Technologies) and chemically synthesized by IDT. The complementary oligonucleotides were annealed and ligated to the pre-cut pSilencer2.1-U6 neo vector using the rapid DNA ligation kit (Roche). Following transformation into Top10 competent cells (Life Technologies), successful ligation was confirmed using restriction digestion and DNA sequencing with M13F primer (5'-GTAAAACGACGGCCA GT-3').

Human HYAL2 cDNA was amplified from pCMV6-HYAL2 (sc117754 OriGene) using the primers 5'-CCGGAATTCCGCCACCATGCGGGCAGGCCACAGCC CACCG-3' and 5'-ATAAGAATGCGGCGCCTACAAGGTCCAGGTAAGGCCAGGGC-3' (restriction enzyme sites are shown in italics) and cloned into pEGFP-N1-neo plasmid to replace the EGFP fragment using EcoRI and NotI restriction enzymes.

Transfection grade plasmids were prepared with EndoFree plasmid maxi kit (Qiagen) and linearized with ScaI. One microgram of linearized plasmid was transfected into ~1 × 10⁶ cells by Nucleofector (Amaxa) with U20 program, followed by G418 selection at 1 mg ml⁻¹ for 2 weeks. Clones that stably expressed the shRNA were picked and expanded to characterize the knockdown efficiency. Clones with highest levels of HAS knockdown efficiency or the best HYAL2 expression were used for the *in vivo* xenograft assay.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from cells at 80% confluence (2 days after splitting) using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was generated using SuperScriptIII reverse transcriptase (Life Technologies) with Oligo(dT)18 primer. First-strand cDNA was amplified using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche; 04913850001) with corresponding primers in which QuantumRNA β-actin internal standards (Life Technologies) were used as reference. Quantitative PCR was conducted with Applied Biosystems 7300 real-time PCR systems at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The standard curves for the quantitative PCR were set using 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 and 1/256 µl cDNA generated with RNA from NSF-LT-RAS cells. qPCR primers: HAS2-forward: 5'-GAAAAGGGTCTGGTGAGACGGATGAG-3'; HAS2-reverse: 5'-TTCACCATCTCCACAGATGAGGCAGG-3'.

Tumour xenograft assay. NIH-III nude mice (CrI:NIH-LySt^{bg-j} Foxn1^{nu}Btk^{xid}) were purchased from Charles river Laboratories Inc. Seven-week-old female mice were used to establish xenografts. For each injection, 4 × 10⁶ cells were collected and re-suspended in 100 µl of ice-cold 20% matrigel (BD Bioscience) in PBS (Gibco). This 100-µl solution was injected subcutaneously close to the base of the external ear or into the flank just in front of the hind legs with a 22-gauge needle. Transplantations of MSF-LT-Ras cells were allowed to grow for 2–3 weeks, whereas xenografts with NMR cells were allowed to grow for 65 days before death. Tumours were excised and size and weight were recorded. The mice were dissected and tumour metastasis was examined for each organ.

21. Lee, H. G. & Cowman, M. K. An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. *Anal. Biochem.* **219**, 278–287 (1994).

Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat

Eun Bae Kim^{1*}, Xiaodong Fang^{2*}, Alexey A. Fushan^{1*}, Zhiyong Huang^{2*}, Alexei V. Lobanov³, Lijuan Han², Stefano M. Marino³, Xiaoqing Sun², Anton A. Turanov³, Pengcheng Yang², Sun Hee Yim³, Xiang Zhao², Marina V. Kasaikina³, Nina Stoletzki³, Chunfang Peng², Paz Polak³, Zhiqiang Xiong², Adam Kiezun³, Yabing Zhu², Yuanxin Chen², Gregory V. Kryukov^{3,4}, Qiang Zhang², Leonid Peshkin⁵, Lan Yang², Roderick T. Bronson⁶, Rochelle Buffenstein⁷, Bo Wang², Changlei Han², Qiye Li², Li Chen², Wei Zhao², Shamil R. Sunyaev^{3,4}, Thomas J. Park⁸, Guojie Zhang², Jun Wang^{2,9,10} & Vadim N. Gladyshev^{1,3,4}

The naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) is a strictly subterranean, extraordinarily long-lived eusocial mammal¹. Although it is the size of a mouse, its maximum lifespan exceeds 30 years, making this animal the longest-living rodent. Naked mole rats show negligible senescence, no age-related increase in mortality, and high fecundity until death². In addition to delayed ageing, they are resistant to both spontaneous cancer and experimentally induced tumorigenesis^{3,4}. Naked mole rats pose a challenge to the theories that link ageing, cancer and redox homeostasis. Although characterized by significant oxidative stress⁵, the naked mole rat proteome does not show age-related susceptibility to oxidative damage or increased ubiquitination⁶. Naked mole rats naturally reside in large colonies with a single breeding female, the 'queen', who suppresses the sexual maturity of her subordinates⁷. They also live in full darkness, at low oxygen and high carbon dioxide concentrations⁸, and are unable to sustain thermogenesis⁹ nor feel certain types of pain^{10,11}. Here we report the sequencing and analysis of the naked mole rat genome, which reveals unique genome features and molecular adaptations consistent with cancer resistance, poikilothermy, hairlessness and insensitivity to low oxygen, and altered visual function, circadian rhythms and taste sensing. This information provides insights into the naked mole rat's exceptional longevity and ability to live in hostile conditions, in the dark and at low oxygen. The extreme traits of the naked mole rat, together with the reported genome and transcriptome information, offer opportunities for understanding ageing and advancing other areas of biological and biomedical research.

We applied a whole-genome shotgun strategy to sequence the genome of an individual male naked mole rat (NMR) (Table 1 and Supplementary Tables 1–3). The sequencing depth of 98.6% of the

genome assembly was more than 20-fold (Supplementary Figs 1–4). The mitochondrial genome was also assembled. Approximately 25% of the NMR genome was represented by transposon-derived repeats, which is lower than in other mammals (40% in human, 37% in mouse, and 35% in rat genomes) (Supplementary Tables 4 and 5, Supplementary Figs 5–7). The predicted NMR gene set included 22,561 genes (Table 1 and Supplementary Table 6), which is comparable to other mammals (22,389 in human, 23,317 in mouse, and 22,841 in rat). Of these, 21,394 (94.8%) genes were transcribed (based on the RNA-seq data for seven organs). More than 98% of NMR genes could be functionally annotated using homology approaches (Supplementary Table 7), and the quality of predicted genes was comparable to that of well-annotated mammalian genomes (Supplementary Tables 6 and 8 and Supplementary Fig. 8).

Most of the NMR genome (93%) showed synteny to human, mouse or rat genomes (Supplementary Table 9), and pairwise comparisons suggested a relatively low rate of NMR genome rearrangements after the split from the murid common ancestor. We defined common synteny blocks in human, mouse, rat and NMR genomes and identified segmental duplications and lineage-specific insertions and deletions (Supplementary Tables 10 and 11 and Supplementary Fig. 9). By analysing single-copy orthologous groups, we constructed a phylogenetic tree involving the NMR and other mammals (Fig. 1). As expected, the NMR placed within rodents and its ancestor split from the ancestor of rats and mice approximately 73 million years ago, whereas the ancestor of NMR, mouse and rat split from rabbit approximately 86 million years ago. Thus, in spite of some exceptional traits, the overall properties of the NMR genome appeared to be similar to those of other mammals.

Lineage-specific gene family expansions may be associated with the emergence of specific functions and physiology. Compared to other mammals, the NMR showed a moderate number of gene families under expansion and contraction (Fig. 1b), including 96 NMR lineage-specific gene families (Fig. 2). Analysis of syntenic regions identified 750 gained and 320 lost NMR genes (Supplementary Tables 12–14). At least 75.5% of genes gained showed evidence of transcription, and the lost genes were enriched for ribosome and nucleoside biosynthesis functions (Supplementary Table 15). We also identified 244 pseudogenes, containing 183 frameshift and 119 premature termination events (Supplementary Tables 16 and 17). Functional categories enriched for pseudogenes included olfactory receptor activity (GO:0004984, $P < 0.001$, Fisher's exact test, 36 genes), visual perception (GO:0007601, $P = 0.015$, *CRB1*, *CRYBB3*, *GNAT2*, *GRK7*, *GUCA1B* and *PDE6H*), spermatogenesis

Table 1 | Global statistics of the NMR genome

Sequencing	Insert size (bp)	Total data (Gb)	Sequence coverage (fold)
Paired end libraries	170–800	126.52	47
	2–20 × 10 ³	120.66	45
	Total	247.18	92
Assembly	N50 (kb)	Longest (kb)	Size (Gb)
Contigs	19.3	179	2.45
Scaffolds	1,585	7,787	2.66
Annotation	Number	Total length (Mb)	Percentage of the genome
Repeats	3,090,116	666.7	25
Genes	22,561	722.3	27.1
CDS	181,641	32.5	1.2

¹Department of Bioinspired Science, Ewha Womans University, Seoul, 120-750, Korea. ²BGI-Shenzhen, Shenzhen, 518083, China. ³Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁴Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, Massachusetts 02142, USA. ⁵Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁶Rodent Histopathology Laboratory, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁷Department of Physiology and The Sam and Ann Barshop Institute for Longevity and Aging Studies, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas 78245, USA. ⁸Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60607, USA. ⁹Novo Nordisk Foundation Center for Basic Metabolic Research, University of Copenhagen, Copenhagen, DK-2200 Copenhagen N, Denmark. ¹⁰Department of Biology, University of Copenhagen, Copenhagen, DK-2200 Copenhagen N, Denmark.

*These authors contributed equally to this work.

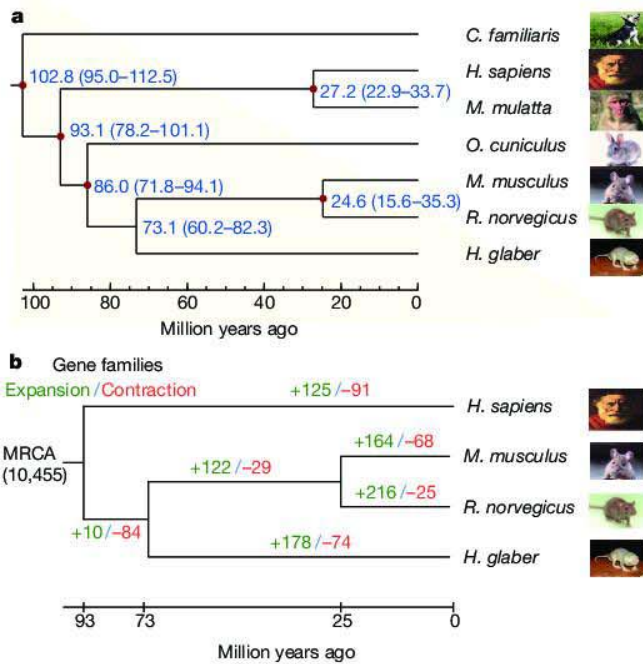


Figure 1 | Relationship of the NMR to other mammals. **a**, Estimation of the time of divergence (with error range shown in parentheses) of the NMR and six other mammals based on orthology relationship. Distances are shown in millions of years. **b**, Expansion and contraction in gene families. Numbers designate the number of gene families that have expanded (green) and contracted (red) since the split from the common ancestor. The most recent common ancestor (MCRA) has 10,455 gene families.

(GO:0007283, $P = 0.044$, *ADAM29*, *ADC*, *CCIN*, *CCT6B*, *DEDD*, *OAZ3* and *SHBG*), and possibly RING domain (*SM00184*, $P = 0.142$, *CNOT4*, *KCNRG*, *RNF5*, *TRIM17*, *TRIML1* and *ZSWIM2*). The enrichment in the visual perception category appears to underlie the evolution of poor vision in the NMR, whereas many RING-domain-containing proteins act as ubiquitin ligases¹². The levels of ubiquitinated proteins in NMRs are lower than in mice and, unlike those in mice, do not change significantly with age⁶.

Identification of genes that have undergone positive selection in the NMR lineage can provide useful pointers to the evolution of its unique

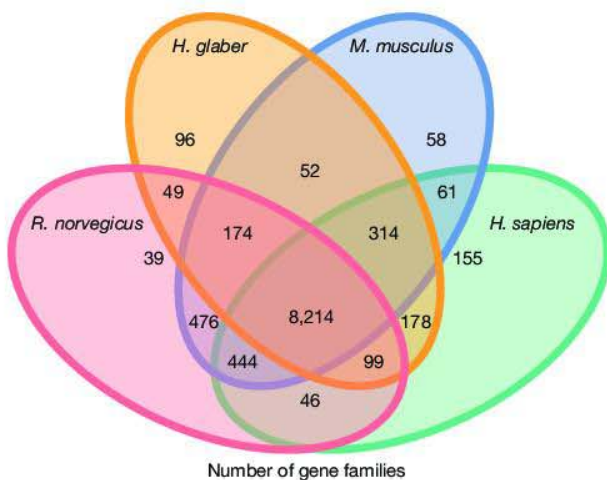


Figure 2 | Common and unique NMR gene families. This Venn diagram shows unique and overlapping gene families in the NMR (*H. glaber*), rat (*R. norvegicus*), mouse (*M. musculus*) and human (*H. sapiens*).

traits. 45 genes (0.4%) were identified as positively selected in the NMR lineage at the false discovery rate of 0.01 and 141 genes (1.2%) at the false discovery rate of 0.05 (Supplementary Table 18). 12 out of the 45 genes (corresponding to the false discovery rate of 0.01) passed a strict manual inspection for alignment quality. In comparison, 0.7% of genes were predicted to be positively selected in the human lineage from high-quality alignments and using Rom correction for multiple testing¹³. Interestingly, our set included *TEP1*, encoding a telomerase component, and *TERF1*, a telomeric repeat binding factor identified at the false discovery rate of 0.05 (Supplementary Fig. 10). The *TERF1* gene product is one of six proteins contributing to the shelterin complex, which shapes and protects telomeres¹⁴ and has been proposed to regulate telomere length¹⁵.

To gain further insights into biological processes that underlie the exceptional traits of the NMR, we identified 39 NMR proteins containing 45 amino acid residues unique among orthologues present in 36 vertebrate genomes (Supplementary Table 19). This gene set included cyclin E1 (*CCNE1*), uncoupling protein 1 (*UCP1*) and γ -crystallin (*CRYGS*), which are associated with the G1/S transition during the cell cycle, thermogenesis and visual function, respectively. Other noteworthy genes were *APEX1*, a multifunctional DNA repair enzyme, *RFC1*, replication factor C, and *TOP2A*, a DNA topoisomerase that controls the topologic states of DNA during transcription. This set also contained eight genes designated as cancer-related¹⁶. Finally, *TOP2A*, along with *TEP1* and *TERF1* from the set of positively selected genes, are part of a five-protein complex of alternate lengthening of telomere pathway¹⁷. Overall, these analyses point to altered telomerase function in the NMR, which may be related to its evolution of extended lifespan and cancer resistance.

We also identified 1.87 million heterozygous single-nucleotide polymorphisms (SNPs). This results in an estimated nucleotide diversity (mean per nucleotide heterozygosity) of 7×10^{-4} , which is much lower than in mouse and rat populations and is comparable to the nucleotide diversity observed in humans. Transition nucleotide changes were observed twice as often as transversions, indicating that variant calls reproduce the expected properties of natural variation in other mammals. This low level of nucleotide diversity may reflect a low effective size of NMR population, but may also be due to a high level of inbreeding, a reduced mutation rate or high efficiency of the repair systems. The variation of diversity along the genome was consistent with inbreeding in the NMR population. In protein-coding regions of the genome, our analysis identified 10,951 non-synonymous and 8,616 synonymous SNPs. Their ratio is much higher than in other studied organisms, including human, which appears to signal relaxation of purifying selection in the NMR, potentially as a consequence of reduced effective population size. Finally, we analysed the context dependency of NMR SNPs (Supplementary Fig. 11). Relative rates of nucleotide changes and nucleotide context dependencies were similar to those observed in human polymorphism, with the exception of a relative reduction of SNPs due to CpG mutations. This was caused by a combination of the relatively low CpG density in the NMR genome and a higher fraction of CpG dinucleotides within CpG islands compared to the human genome. CpG density was only 0.19 of that expected on the basis of the GC content, which is lower than in human, dog and panda genomes, but is similar to the mouse genome. However, in comparison to mouse, a higher fraction of CpG dinucleotides was concentrated in CpG islands. CpG dinucleotides within CpG islands contribute less to genetic variation because of their lower methylation rate and possibly also due to selection.

Long lifespan is a key feature of the NMR. To study ageing and longevity, we obtained RNA-seq data for brain, liver and kidney of newborn, young adult (4-year-old) and old adult (20-year-old) NMRs (Supplementary Table 20). In contrast to other mammals, few genes showed differential expression between 4- and 20-year-old NMRs, especially in the brain (Supplementary Tables 21–23). A recent study identified 33 underexpressed and 21 overexpressed genes in the human brain during ageing¹⁸. Of these, 32 genes did not show

consistent expression changes with ageing in NMRs, including 30 genes that had stable expression and two genes that changed in the opposite direction compared to human brain (Supplementary Table 21). For example, *CYP46A1* and *SMAD3* were downregulated in the human brain, but showed elevated expression in the NMR brain. The product of the *CYP46A1* gene is a mediator of cholesterol homeostasis that influences the tendency of A β to aggregate. The product of *SMAD3* is a modulator of TGF- β signalling, playing a role in cancer development by slowing down the rate of cell proliferation. Elevated expression of *SMAD3* in the NMR during ageing may help optimize the rate of cell death, protecting NMRs from cancer.

A previous meta-analysis of age-related gene expression in mice, rats and humans revealed 56 consistently overexpressed and 17 under-expressed genes¹⁹. However, many of these genes did not show the same expression changes, suggesting that different regulatory mechanisms may underlie NMR longevity (Supplementary Tables 22 and 23). For example, genes related to degradation of macromolecules, such as *GSTA1*, *DERL1* and *GNS*, were not upregulated with age in NMRs. We also found that genes encoding mitochondrial proteins (*NDUFB11*, *ATP5G3* and *UQCRCQ*) were not downregulated, consistent with stable maintenance of mitochondrial function during ageing. It is also of interest that *TERT* (telomerase reverse transcriptase) showed stable expression regardless of age (Supplementary Fig. 12). This finding is consistent with the role of the telomerase complex, highlighted by positive selection on *TEP1* and *TERF1*. Overall, transcriptome and sequence data revealed different (compared to humans, mice and rats) patterns of NMR genes, which may underlie longevity mechanisms in this animal.

Non-shivering thermogenesis is a major heat production process in mammals that mainly depends on the action of *UCP1*, one of the 39 vertebrate genes that changed uniquely in the NMR (Supplementary Table 19). *UCP1* featured changes in amino acids Gln 146, Arg263, Trp 264 and Thr 303, with the latter two residues being subject to positive selection ($P < 0.05$, likelihood ratio test for the branch-site model, $n = 30$) and Arg 263 and Trp 264 located in the conserved nucleotide binding motif (Fig. 3a). With Arg–Trp instead of the rigid Gly–Pro in the key regulatory site, *UCP1* is expected to lose the tight regulation by purine nucleotides as inhibitors and fatty acids as activators (Fig. 3b and c). The same loop also features two positively

charged Lys residues followed by a negatively charged residue (also a unique combination), that should markedly affect the local electrostatic potential of *UCP1*. In addition, Gln 146 replaced a conserved His involved in proton transport, and the same mutation was shown to decrease proton conductance of *UCP1* fivefold²⁰. Thr 303 is located in the carboxy-terminal motif (RqTxDCxT) required for binding purine nucleotides²¹. Taken together, these observations indicate a tight association of *UCP1* function with the unique thermoregulation of the NMR²².

In mammals, switches between light and dark periods affect synthesis of the hormone melatonin, which modulates sleep and circadian rhythms. NMRs live in a naturally dark habitat and their pineal glands, where melatonin is synthesized, are atrophied²³, but we found that the genes involved in melatonin synthesis (*TPH1*, *TPH2*, *DDC*, *AANAT* and *ASMT*) are intact. Interestingly, the expression of genes involved in the final two steps of melatonin synthesis was very low (*AANAT*) or undetectable (*ASMT*) in the NMR brain regardless of age (Supplementary Table 24 and Supplementary Fig. 13). Moreover, two major mammalian melatonin receptors (*MTNR1A* and *MTNR1B*, encoding MT₁ and MT₂, respectively) were inactivated by mutations that introduce premature stop signals (Supplementary Fig. 14). Synteny analyses showed that these pseudogenes corresponded to mouse *MTNR1A* and *MTNR1B*. Although melatonin signalling appears to be disrupted in the NMR, its circadian rhythms were maintained in terms of locomotor activity and body temperature when exposed to periodic light/dark changes²⁴. Our finding is consistent with a previous report that MT₁/MT₂ knockout mice maintained essentially normal circadian rhythms²⁵. These mice also showed decreased insulin secretion²⁵. Likewise, our transcriptome analysis of the NMR revealed decreased expression of genes involved in insulin/IGF-1 signalling in the liver compared to mice (Supplementary Fig. 15).

To explain the extraordinary resistance of the NMR to cancer³, a two-tier protective mechanism involving contact inhibition mediated by p16^{Ink4a} and p27^{Kip1} was proposed⁴. The involvement of p16^{Ink4a} is unusual, since humans and mice show only contact inhibition mediated by p27^{Kip1}. We analysed the gene locus and the transcriptome reads corresponding to tumour suppressors p16^{Ink4a} and p19^{Arf}. As in mice, the p16^{Ink4a} transcript consists of three exons (Supplementary Fig. 16). However, sequence similarity in the last exon is low, and two early stop codons in the second exon were predicted to result in a shorter, 14-kDa protein (Supplementary Fig. 17). The four ankyrin repeats were, however, intact and Thr69, a residue important for CDK6 binding, was conserved, so the function of the protein may be partially preserved (Supplementary Fig. 18). The p19^{Arf} transcript consists of two exons, but four stop codons in the second exon should lead to a shorter, 10-kDa protein (Supplementary Figs 19–21).

The NMR is also unique in that its skin and cutaneous C-fibres lack the neuropeptide Substance P, making this animal insensitive to certain types of pain^{10,11}. Our analysis revealed the presence of intact *TAC1* encoding Substance P. However, the NMR had a deletion in the core promoter region highly conserved among mammals (Supplementary Fig. 22). Thus, this neurotransmitter appears to be functional but may be under unique regulation.

We further examined the molecular basis for poor visual function and small eyes in the NMR. Of the four vertebrate opsin genes (*RHO*, *OPN1LW*, *OPN1MW* and *OPN1SW*), two (*OPN1LW* and *OPN1MW*) were missing (Table 2); this distinguishes the NMR from other rodents with dichromatic colour vision, such as mice, rats and guinea pigs. However, the NMR has intact *RHO* (rhodopsin) and *OPN4* (melanopsin), supporting the presence of rod-dominated retinae and the capacity to distinguish light/dark cues. Of about 200 genes associated with visual perception (GO:0007601) in humans and mice, almost 10% were inactivated or missing in the NMR (Table 2 and Supplementary Fig. 23). These mammalian genes participate in crystallin formation, phototransduction in the retina, retinal development, dark adaptation, night blindness and colour vision. For at least ten of these

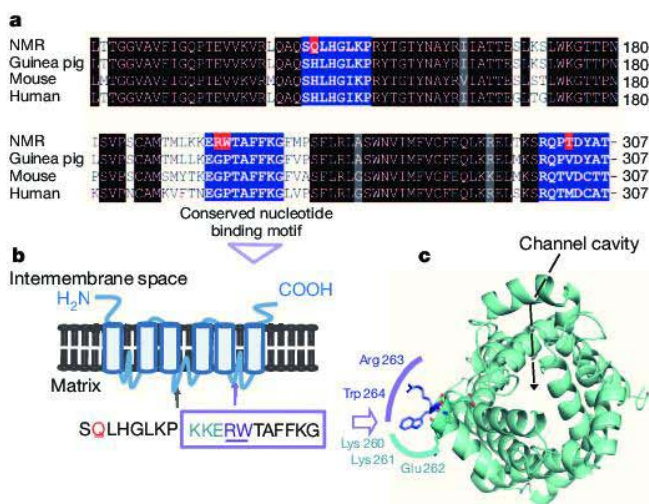


Figure 3 | Unique changes in UCP1 sequences and their roles in thermoregulation. **a**, Alignment of mammalian UCP1 sequences. Amino acids unique to the NMR are highlighted in red, and conserved motifs in blue. **b**, Topology of UCP1. Regions affected in the NMR are highlighted. **c**, Structural model of UCP1. Location of the channel and the nucleotide-binding loop with altered sequences in the NMR are shown.

Table 2 | Visual perception genes that are inactivated or are missing in the NMR genome

Gene	Inactivation event	Time of gene loss	ω_0 (average)	ω_1 (other)	ω_2 (NMR)	P-value
<i>RBP3</i>	F	NMR	0.121	0.085	0.232	1.187E-11
<i>ARR3</i>	F/S	NMR	0.420	0.260	0.912	6.263E-06
<i>PDE6C</i>	F	NMR	0.171	0.139	0.316	0.0001
<i>GUCA1B</i>	F	NMR	0.083	0.056	0.217	0.001
<i>GJA10</i>	F/S	NMR	0.308	0.248	0.524	0.002
<i>GUCY2E</i>	F	NMR	0.124	0.105	0.182	0.002
<i>CRYBA4</i>	S	NMR	0.055	0.036	0.123	0.001
<i>GNAT2</i>	F	NMR	0.055	0.039	0.108	0.017
<i>SLC24A1</i>	F	NMR	0.389	0.355	0.517	0.035
<i>CRYBB3</i>	S	NMR	0.071	0.048	0.122	0.037
<i>RP1L1</i>	S	NMR	0.448	0.424	0.513	0.186
<i>GRK7</i>	F	NMR	0.154	0.135	0.201	0.335
<i>PDE6H</i>	F	NMR	0.091	0.082	0.127	0.648
<i>EYS</i>	F/S	Ancestor	-	-	-	-
<i>GUCA1C</i>	F	Ancestor	-	-	-	-
<i>OPN1LW</i>	L	NMR	-	-	-	-
<i>OPN1MW</i>	L	NMR	-	-	-	-
<i>PRCD</i>	L	NMR	-	-	-	-
<i>RD3</i>	L	NMR	-	-	-	-

F, frameshift; S, premature stop codon; L, complete loss detected with synteny information. Ancestor/NMR indicates that the gene was lost in a rodent ancestor or the NMR, respectively. The rate ratio ω of non-synonymous to synonymous substitutions was calculated by using human, mouse, rat and NMR sequences. ω_0 is the average ratio in all branches, ω_1 is the average ratio in non-NMR branches, and ω_2 is the ratio in the NMR branch. A small P-value indicates that the two-ratio model fits the data better than the one-ratio model.

genes, we observed relaxation of the functional constrain on NMR sequences by estimating the ratio of non-synonymous to synonymous substitutions, which corroborated the dysfunction of these genes. Inactivation of *CRYBA4*, a microphthalmia-related gene, may be associated with the small-sized eyes, whereas inactivation of *CRYBA4* and *CRYBB3* and a NMR-specific mutation in *CRYGS* (Supplementary Table 19) may be associated with abnormal eye morphology²⁶. Thus, while some genes responsible for vision are preserved in the NMR, its poor visual function may be explained by deterioration of genes coding for various critical components of the visual system.

Further analysis revealed substantial divergence of the NMR nuclear receptor corepressor Hairless from other mammalian orthologues and the presence of amino acid replacements associated with the hairless phenotype, which is consistent with the lack of fur in NMRs (Supplementary Fig. 24). In addition, we found substantial sequence variation in the sweet taste receptor and lack of many bitter taste receptors common to other mammals (Supplementary Fig. 25 and 26). In particular, the NMR appears to lack the phenylthiocarbamide taste, a dominant genetic trait in humans, as well as several other common bitter tastes.

Air in NMR burrows is low in O₂ (~8%) and high in CO₂ (>10%) owing to many animals sharing a limited air supply and poor gas exchange through soil²⁷. To cope with the low O₂ conditions, the NMR has developed adaptive circulatory (altered haemoglobin oxygen affinity) and metabolic functions, reducing metabolic rate and slowing down development^{1,8,28,29}. To obtain insights into this adaptation, we examined gene expression changes in several tissues of NMR subjected to 8% O₂ for one week (Supplementary Tables 25-31 and Supplementary Fig. 27-30). Many changes associated with energy metabolism and redox control were observed. Sequence analysis of NMR hypoxia-induced factor 1 α (HIF1 α) revealed a T407I exchange unique among mammals and located in the VHL-binding domain. Under normal oxygen conditions, VHL mediates ubiquitin-dependent degradation of HIF1 α . In addition, NMR VHL harbours V166I exchange at a functionally important site. These amino acid changes are consistent with relaxation of ubiquitin-dependent degradation of HIF1 α , and, thus, with adaptation to low oxygen conditions.

To summarize, sequencing and analysis of the NMR genome revealed numerous insights into the biology of this remarkable animal. In addition, this genome and the associated data sets offer the research

communities working in ageing, cancer, eusociality and many other areas a rich resource that can be mined in numerous ways to uncover the molecular bases for the extraordinary traits of this most unusual mammal. In turn, this information provides unprecedented opportunities for addressing some of the most challenging questions in biology and medicine, such as mechanisms of ageing, the role of genetic makeup in regulating lifespan, adaptations to extreme environments, hypoxia tolerance, thermogenesis, resistance to cancer, circadian rhythms, sexual development and hormonal regulation.

METHODS SUMMARY

The NMR genome was sequenced on the Illumina HiSeq 2000 platform. The sequenced individual male NMR was from a captive breeding colony located at the University of Illinois, Chicago. The genome was assembled using SOAPdenovo. We obtained 2.5 Gb (gigabase pairs) contig sequences with N50 19.3 kb (kilobase pairs) and N90 4.7 kb, and 2.7 Gb scaffold sequences with N50 1.6 Mb (megabase pairs) and N90 0.3 Mb. (The N50 (or N90) contig size is the length of the smallest contig S in the sorted list of all contigs where the cumulative length from the largest contig to contig S is at least 50% (or 90%) of the total assembly length.) RNA-seq data (ageing and low O₂ experiments) were for animals from the same colony. See Supplementary Information for data analysis and additional details.

Received 14 June; accepted 5 September 2011.

Published online 12 October 2011.

- Edrey, Y. H., Park, T. J., Kang, H., Biney, A. & Buffenstein, R. Endocrine function and neurobiology of the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Exp. Gerontol.* **46**, 116–123 (2011).
- Buffenstein, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B* **178**, 439–445 (2008).
- Liang, S., Mele, J., Wu, Y., Buffenstein, R. & Hornsby, P. J. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Aging Cell* **9**, 626–635 (2010).
- Seluanov, A. et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 19352–19357 (2009).
- Andziak, B. et al. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* **5**, 463–471 (2006).
- Pérez, V. I. et al. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 3059–3064 (2009).
- Jarvis, J. U. M. Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science* **212**, 571–573 (1981).
- Larson, J. & Park, T. J. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *Neuroreport* **20**, 1634–1637 (2009).
- Buffenstein, R., Woodley, R., Thomadakis, C., Daly, T. J. & Gray, D. A. Cold-induced changes in thyroid function in a poikilothermic mammal, the naked mole-rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R149–R155 (2001).
- Park, T. J. et al. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *PLoS Biol.* **6**, e13 (2008).
- Smith, E. S., Blass, G. R., Lewin, G. R. & Park, T. J. Absence of histamine-induced itch in the African naked mole-rat and “rescue” by Substance P. *Mol. Pain* **6**, 29 (2010).
- Deshais, R. J. & Joazeiro, C. A. P. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399–434 (2009).
- Schneider, A. et al. Estimates of positive Darwinian selection are inflated by errors in sequencing, annotation, and alignment. *Genome Biol. Evol.* **1**, 114–118 (2009).
- de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100–2110 (2005).
- van Steensel, B. & Lange, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740–743 (1997).
- Higgins, M. E. et al. CancerGenes: a gene selection resource for cancer genome projects. *Nucleic Acids Res.* **35**, D721–D726 (2007).
- Bhattacharyya, S. et al. Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase IIA associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* **284**, 14966–14977 (2009).
- Hong, M. G., Myers, A. J., Magnusson, P. K. E. & Prince, J. A. Transcriptome-wide assessment of human brain and lymphocyte senescence. *PLoS ONE* **3**, e3024 (2008).
- de Magalhães, J. P., Curado, J. & Church, G. M. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* **25**, 875–881 (2009).
- Bienengraeber, M., Ehtay, K. S. & Klingenberg, M. H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry* **37**, 3–8 (1998).
- Porter, R. K. Uncoupling protein 1: a short-circuit in the chemiosmotic process. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 457–461 (2008).

22. Woodley, R. & Buffenstein, R. Thermogenic changes with chronic cold exposure in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **133**, 827–834 (2002).
23. Quay, W. B. Pineal atrophy and other neuroendocrine and circumventricular features of the naked mole-rat, *Heterocephalus glaber* (Rüppell), a fossorial, equatorial rodent. *J. Neural Transm.* **52**, 107–115 (1981).
24. Riccio, A. P. & Goldman, B. D. Circadian rhythms of locomotor activity in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Physiol. Behav.* **71**, 1–13 (2000).
25. Mühlbauer, E., Gross, E., Labucay, K., Wolgast, S. & Peschke, E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur. J. Pharmacol.* **606**, 61–71 (2009).
26. Nikitina, N. V. *et al.* Postnatal development of the eye in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Anat. Rec. A* **277A**, 317–337 (2004).
27. Bennett, N. C. & Faulkes, C. G. *African Mole-Rats: Ecology and Eusociality* (Cambridge University Press, 2000).
28. McNab, B. K. The influence of body size on the energetics and distribution of fossorial and burrowing mammals. *Ecology* **60**, 1010–1021 (1979).
29. Johansen, K., Lykkeboe, G., Weber, R. E. & Maloiy, G. M. Blood respiratory properties in the naked mole rat *Heterocephalus glaber*, a mammal of low body temperature. *Respir. Physiol.* **28**, 303–314 (1976).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank P. C. LaVinka for help in preparing NMR tissues and N. Estolga for help in preparing the manuscript. We acknowledge financial support from the WCU Program (R31-2008-000-10010-0), the NIH (AG038004, AG021518 and CA080946), the Shenzhen Municipal Government (ZYC200903240077A), the

National Natural Science Foundation of China (30725008) and the National Science Foundation (0744979).

Author Contributions V.N.G. conceived the study. T.J.P. carried out animal work. A.A.T., M.V.K. and S.H.Y. prepared samples. X.F., Z.H., L.H., X.S., P.Y., X.Z., C.P., Z.X., Y.Z., Y.C., Q.Z., L.Y., B.W., C.H., Q.L., L.C., W.Z., G.Z. and J.W. performed genome sequencing and assembly. X.F., G.Z. and J.W. supervised genome sequencing and assembly. E.B.K., X.F., A.A.F., Z.H., A.V.L., S.M.M., L.P., G.Z. and V.N.G. performed genome and transcriptome analyses. Z.H., N.S., P.P., A.K. and S.R.S. carried out genetic analyses. G.V.K., R.T.B. and R.B. discussed the data. All authors contributed to data interpretation. V.N.G. wrote the paper with significant contributions from E.B.K., X.F., A.A.F., Z.H., S.R.S. and G.Z., and input from all authors.

Author Information The NMR whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number AFSB00000000. The version described in this paper is the first version, AFSB01000000. The mitochondrial sequence has been deposited at GenBank under the accession number JN242813. All short-read data have been deposited into the Short Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under the accession number SRA030468. Raw sequencing data of the transcriptome have been deposited in the Gene Expression Omnibus with the accession number GSE30337. Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. This paper is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial-Share Alike licence, and is freely available to all readers at www.nature.com/nature. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of this article at www.nature.com/nature. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.Z. (zhanggj@genomics.org.cn), J.W. (wangj@genomics.org.cn) or V.N.G. (vgladyshev@rics.bwh.harvard.edu).

esmateria.com

El único animal inmune al cáncer revela su secreto

by Nuño Domínguez • June 19, 2013 • 5 min read • [original](#)

El ratopín rasurado, un roedor de África, no sufre tumores gracias a una variante del ácido hialurónico, la misma molécula que ya se usa en inyecciones antiarrugas en humanos, según un estudio



Un ratopín rasurado. / Brandon Vick/ U. Rochester

Es uno de los mamíferos más raros del mundo y posiblemente uno de los más feos, pero todos deberíamos envidiarle. Es el ratopín rasurado, un roedor sin pelo que vive bajo tierra en las sabanas de África, se organiza en colonias como las hormigas, nunca bebe agua y, sobre todo, es el único animal conocido que no sufre cáncer. Un reducido grupo de investigadores de varios países estudia a esta criatura capaz de vivir hasta 30 años, un récord absoluto entre roedores, en busca de nuevas claves para alargar la vida de los humanos.

Hoy, un equipo de investigadores de EEUU explica por fin por qué este animal es inmune al cáncer. Es gracias a una sustancia llamada ácido hialurónico y que es bien conocida por los humanos, pues ya se usa, por ejemplo, para borrar los efectos del paso del tiempo con inyecciones que corrigen las arrugas. La clave, dicen, es que el ratopín aprovecha esta sustancia mucho mejor que el resto de mamíferos, “hasta los límites de lo posible”.

“Este animal nos va a enseñar cómo ser inmunes al cáncer”, asegura a *Materia* **Andrei Seluanov**, investigador de la Universidad de Rochester (EEUU) y coautor del estudio que describe en *Nature* el nuevo hallazgo. El ratopín ya nos había enseñado muchas otras cosas. El *Heterocephalus glaber* es el único mamífero que vive como los insectos sociales, con una reina todopoderosa a la que sirven obreros y soldados que no dudarían en matar a cualquier ratopín ajeno a la colonia. Además de su sorprendente longevidad y ausencia de cáncer, este animal es también insensible al dolor que causa el ácido en la piel.

Aplicación en humanos

“Mis estudiantes dicen que es como una salchicha con dientes”, bromea Seluanov. Este investigador ruso lleva estudiando a estos roedores desde hace casi una década. Los animales corretean en su laboratorio de urna a urna a través de túneles mantenidos a la temperatura y humedad exactas del subsuelo africano: 32 grados. Los datos acumulados por otros equipos, basados en el estudio de 1.500 ratopines durante 25 años, indican que sólo uno desarrolló cáncer, explica Seluanov. Es algo nunca visto. “El 95% de los ratones de laboratorio desarrollan cáncer y, en libertad, la tasa es del 75% porque los roedores son especialmente vulnerables a esta enfermedad”. Por eso el el ratopín, o rata topo calva, que vive 10 veces más que los ratones convencionales y no tiene cáncer, es un animal extraordinario.

“Mis estudiantes dicen que es como una salchicha con dientes”

Seluanov, junto a investigadores en China e Israel, ha encontrado por fin el compuesto responsable de la inmunidad de este animal a los tumores que acorralan al resto de mamíferos. Se trata de una sustancia viscosa que aisló en su laboratorio y que se conoce como ácido hialurónico. Es una cadena con átomos de carbono e hidrógeno que producen la mayoría de las células del cuerpo y que ayuda, entre otras cosas, a controlar el crecimiento de los órganos hasta su tamaño adecuado. Al contrario que el ácido hialurónico que producen los ratones y los humanos, la variante del ratopín es una cadena mucho más grande y larga. El gran tamaño de esta molécula es fundamental para conferir protección ante el cáncer”, explica Seluanov.

Hasta ahora se sabía que esa sustancia viscosa era la responsable de darle al ratopín la prodigiosa elasticidad de su piel para reptar por los túneles. Ahora, Seluanov demuestra que la misma molécula es también responsable de bloquear el desarrollo de tumores. El estudio muestra que si se elimina el ácido hialurónico de ratopín, las células comienzan a dividirse sin control generando tumores.

“Estoy bastante seguro de que encontraremos la forma de aplicar este descubrimiento para tratar el cáncer en humanos”

Una vez desvelado el secreto del ratopín, queda por ver si se puede aplicar para lograr que los humanos vivan más de 100 años sin cáncer. Es algo que llevará mucho tiempo, aunque hay ventajas, como por ejemplo que el ácido hialurónico ya se usa en tratamientos. “La variante de esta sustancia producida en células evita, por ejemplo, que los huesos de la rodilla rocen unos con otros y ya se usa en pacientes con artritis”, explica Seluanov. “El compuesto también es un sustituto del botox y se inyecta bajo la piel para quitar las arrugas”, añade. Ahora su equipo va a crear ratones transgénicos que producirán ácido hialurónico de ratopín. Si todo va bien, después habría que probar si también funciona en células humanas y buscar dianas terapéuticas para aumentar la producción de este ácido. “Estoy bastante seguro de que encontraremos la forma de aplicar este descubrimiento para tratar el cáncer en humanos”, asegura Seluanov.

“Es un trabajo muy interesante, como todos los estudios previos realizados en este modelo animal”, opina [Carlos López-Otín](#), bioquímico de la Universidad de Oviedo y experto en la investigación de las claves del envejecimiento, en su caso basado en [enfermedades humanas](#) de senectud prematura. Su equipo, explica, quiso participar en la [secuenciación del genoma](#) de este roedor, aunque al final no lo logró y fueron otros equipos los que lo hicieron en 2011. “Se abre ahora un camino largo pero muy interesante hacia la validación en otras especies, incluso en humanos, de la idea de que la modulación de la ruta bioquímica del ácido hialurónico puede tener efectos semejantes a los observados en este atípico y extraordinario roedor”, señala.

‘Ácido hialurónico, de los cosméticos al cáncer’

En este trabajo se describe que los ratopines rasurados tienen unos niveles anormalmente altos de un componente habitual de la matriz extracelular, concretamente el ácido hialurónico polimerizado, que es una especie de malla flexible y resistente que fabrican las células de todos los tejidos a su alrededor. El ratopín rasurado es un pequeño mamífero subterráneo que no tiene pelo y, por lo tanto, al faltarle esta protección de la piel, no es raro que haya desarrollado como adaptación una piel excepcionalmente flexible y resistente a la abrasión. Es decir, se trata de una adaptación evolutiva que sustituye la falta de pelo por una piel extra-resistente. En este sentido, es importante recordar que el ácido hialurónico es, junto con el colágeno, el componente más importante de muchos cosméticos que mejoran la elasticidad de la piel y se usa en las inyecciones tópicas para eliminar arrugas.

Más inesperada es la observación de que el exceso de ácido hialurónico polimerizado parece ser el responsable de que el ratopín rasurado y sus células sean también excepcionalmente resistentes al cáncer. La relación entre el ácido hialurónico y el cáncer es muy compleja. Hay muchos estudios en los que las células cancerosas se benefician de tener una rica malla de ácido hialurónico a su alrededor, pero también

hay estudios, aunque menos, que dicen lo contrario. Es muy posible que los efectos dependan de muchas otras variables, como el componente inflamatorio, que también es sensible al ácido hialurónico y que puede tener un efecto positivo o negativo sobre el cáncer. En resumen, se lleva muchos años trabajando sobre cómo tratar el cáncer a través del ácido hialurónico, tanto destruyéndolo como reforzándolo, y todo este esfuerzo aún no ha dado frutos claros. El trabajo que ahora se publica en *Nature* sobre el ratopín rasurado sin duda reactivará el interés en la conexión entre ácido hialurónico y el cáncer.

Manuel Serrano, investigador del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas en el grupo de supresión tumoral

REFERENCIA

'High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat' doi:10.1038/nature12234

Original URL:

<http://esmateria.com/2013/06/19/el-unico-animal-inmune-al-cancer-revela-su-secreto/>

La rata topo muestra que el ácido hialurónico puede ser una nueva vía para combatir el cáncer



- La rata topo no padece cáncer porque sus tejidos son ricos en ácido hialurónico.
- Los científicos que lo han descubierto probarán ahora a inyectar este ácido en ratones que no lo producen y posteriormente en personas.
- Es el mismo ácido que ya se usa en la fabricación de cremas y máscaras faciales.

ECO  Actividad social **63** %    0 

  51 |  114 |  4 |  |  |  |  | 

EUROPA PRESS. 21.06.2013 - 11:57h

La [rata topo desnuda](#) no es el roedor más bonito de la naturaleza, pero sí un animal único. Es lampiña, pequeña, subterránea y, **pese a vivir unos 30 años, nunca sufre cáncer**. La razón está en que sus tejidos son muy ricos en ácido hialurónico –el mismo ácido que ya se usa en la fabricación de cremas y máscaras faciales–.

A esa conclusión han llegado dos investigadores de la [Universidad de Rochester](#) (Estados Unidos), que es esa sustancia química la que hace que la rata topo desnuda no tenga cáncer. El hallazgo **podría conducir a nuevos tratamientos contra el cáncer**.

El ácido hialurónico (HA) se encuentra en altas concentraciones en la piel de ratas topo desnudas y los biólogos especulan que los roedores desarrollaron niveles altos de HA en la piel para adaptarse a la vida en los túneles subterráneos.

Hay evidencia indirecta de que el HMW-HA funcionaría en las personas

El grupo de investigación de Andrei Seluanov y Vera Gorbunova, cuyo estudio publica *Nature*, descubrió que estos roedores están **protegidos contra el cáncer debido a que sus tejidos** son muy ricos en ácido hialurónico de alto peso molecular (HMW-HA).

"Hay evidencia indirecta de que el HMW-HA funcionaría en las personas. Se usa **en las inyecciones antiarrugas y para aliviar el dolor de artritis** en las articulaciones de la rodilla, sin efectos adversos. Nuestra esperanza es que también puede inducir una respuesta contra el **cáncer**", comenta Seluanov.

El enfoque de los biólogos del HMW-HA comenzó después de que se dieron cuenta de que **una sustancia pegajosa en el cultivo la rata topo desnuda** estaba obstruyendo las bombas de vacío y los tubos mientras que, a diferencia del cultivo de la rata topo desnuda, otros medios con células de humanos, ratones y conejillos de Indias no eran viscosos. Así, los investigadores identificaron la sustancia HMW-HA, lo que los llevó a probar su posible papel en la resistencia al cáncer de la rata topo desnuda.

En esta rata, el gen HAS2, responsable del ácido hialurónico, es diferente del de otros animales

A continuación, vieron que cuando se retira el HMW-HA, las células se convierten en susceptibles a los tumores, lo que confirma que **el producto químico desempeña un papel en la resistencia de las ratas topo desnudas al cáncer**. El equipo de Rochester también identificó un gen, llamado HAS2, responsable de HMW-HA en la rata topo desnuda, que era diferente de HAS2 en todos los demás animales.

Además las ratas topo desnudas son muy lentas en el reciclaje del HMW-HA, lo que contribuye a la acumulación de la sustancia en los tejidos de los animales. El **siguiente paso será probar la eficacia de HMW-HA en ratones** y, si la prueba sale bien, Seluanov y Gorbunova esperan probar el producto químico en las células humanas.

La investigación futura de Gorbunova y Seluanov se centrará en la determinación de si el HMW-HA de ratas topo desnudas puede tener valor clínico, ya sea **para el tratamiento o la prevención del cáncer** en los seres humanos.

8.2. Guió de la part pràctica

Treball de Recerca
Zoé Meini



Proposta de projecte d'investigació

Durant un període de 2 mesos (aproximadament unes 20 h de treball al laboratori), Zoé Meini portarà a terme un petit projecte d'investigació pel seu treball de recerca. El projecte el realitzarà al grup de **Bioinformàtica de la diversitat genòmica**, situat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), en el campus de la Universitat Autònoma de Barcelona.

La tutela estarà a càrrec de Marta Coronado, actual estudiant de doctorat. Es vetllarà que la instància sigui profitosa i pugui dur a terme els seus objectius dintre del termini. Així mateix, s'assegura que en el laboratori tindrà un espai de treball adequat amb totes les eines necessàries per dur a terme la recerca.

El tema de la investigació serà: "**La rata talp nua i la immunitat al càncer.**".

La rata talp nua (*Heterocephalus glaber*) no es caracteritza per ser el rosegador més bonic. El que el fa realment fascinant i ha cridat més l'atenció a tota la comunitat científica és que no desenvolupa càncer, mai. La rata talp nua constitueix un gran desafiament per la ciència, doncs aquesta immunitat al càncer podria permetre'ns trobar un tractament efectiu en humans.

En aquest projecte, intentarem esbrinar, utilitzant eines bioinformàtiques, què és el que fa aquest rosegador únic i com podriem aprofitar aquest descobriment per trobar un tractament o una prevenció efectiva al càncer.

Procediment

La idea es desenvolupa el projecte tal i com si fossim autèntics investigadors. Així, després de **dissenyar l'experiment** i **establir uns objectius**, seguirem una **metodologia adequada** per dur a terme la investigació, obtenir **resultats**, establir-ne les **conclusions** i **discutir-los**. En detallarem en tot moment les **referències** utilitzades, així com els codis d'accés o altra informació complementària, que anirà al **material suplementari**. L'estructura del projecte serà:

INTRODUCCIÓ
OBJECTIUS
MATERIAL I MÈTODES
RESULTATS
DISCUSSIÓ
CONCLUSIONS
REFERÈNCIES
MATERIAL SUPLEMENTARI

El projecte

En aquest apartat es desenvolupa el projecte, els objectius i la metodologia.

Punt 1: l'espai de treball

El primer pas és assentar-nos en el nostre lloc de treball. Prepararem l'ordinador amb un directori de treball personal i ordenat i tindrem cura del nostre material.

Punt 2: establir els objectius

Pensarem els objectius que volem satisfer amb la nostra investigació (què volem obtenir, des dels aspectes més generals als més específics).

Punt 3: cerca bibliogràfica

El pas més important en tota investigació és consultar les millors fonts bibliogràfiques. Com que estem fent un treball científic, utilitzarem eines més adequades, com per exemple:

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) és el portal d'Internet desenvolupat per la National Center for Biotechnology Information. Creat el 1997, PubMed ens permet l'accés a MEDLINE i a altres bases de dades desenvolupades per la National Library of Medicine, PreMEDLINE, Genbak i Complete Genome.

Google Acadèmic (<http://scholar.google.es>) és gratuït per a tothom i s'ha dissenyat per a la recerca específica de literatura acadèmica (articles, tesis, llibres, resums, etc), en lloc de només informació en pàgines web.

També serà molt útil utilitzar un gestor bibliogràfic, com Mendeley (<http://www.mendeley.com>). Mendeley és una aplicació web i d'escriptori, propietària i gratuïta. Permet gestionar i compartir documents de recerca, trobar noves dades i col·laborar en línia. Per exemple, ens serà molt útil fer citacions dintre del nostre text de Word i crear automàticament una bibliografia al final.

Serà molt útil començar utilitzant aquests articles, publicats a la prestigiosa revista *Nature*:

- <http://www.nature.com/nature/journal/v479/n7372/full/nature10533.html>
- <http://www.nature.com/nature/journal/v499/n7458/full/nature12234.html>

També resulta útil mirar notícies divulgatives, com: <http://esmateria.com/2013/06/19/el-unico-animal-inmune-al-cancer-revela-su-secreto/>

A partir de la cerca bibliogràfica, podem escriure una introducció que expliqui l'estat de l'art, informació general de la rata talp... i establir els nostres objectius.

Punt 4: seleccionar gens i organismes candidats

De la bibliografia deduem un gen que sembla clau en la immunitat de la rata. Quin gen és? Què fa normalment? Quina característica tenen els ratolins talps que no la resta d'organismes? Com està implicat en el càncer?

Obtenir les seqüències. Buscarem aquest gen en les bases de dades, no només per la rata talp si no per altres organismes, com el ratolí comú, la rata, o els humans. Les principals bases de dades són:

- <http://www.uniprot.org/> → per les seqüències proteïques
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/hucore> → per les seqüències nucleotídiques

Hem d'aconseguir els codis d'accés de les seqüències proteïques i nucleotídiques del gen en els nostres organismes d'interès.

Descarregar les seqüències. Un cop obtinguts els codis d'accés, escriurem un script en Perl (i utilitzant BioPerl, una col·lecció de mòduls de Perl per aplicacions en bioinformàtica) per descarregar-nos automàticament les seqüències de la seva base de dades.

Punt 5: estudi del gen

Primer buscarem informació sobre general sobre el gen, com la funció, la mida, etc. Després, mirarem quins dominis proteïcs té. Les proteïnes realitzen les seves funcions gràcies a què la seva seqüència aminoacídica conté uns determinats dominis funcionals. Els dominis, doncs, són aquelles seqüències d'aminoàcids que es poden plegar d'una manera estable formant una estructura tridimensional compacta que permetrà a la proteïna realitzar una determinada funció. Les proteïnes poden contenir varis dominis funcionals diferents, i un mateix domini pot aparèixer en una varietat de diferents proteïnes que realitzen una funció particular. Per tant, si detectem la presència d'un determinat domini funcional dins de la seqüència d'una proteïna, això pot ajudar-nos a inferir quina funció realitza. Existeixen diferents programes per a detectar dominis funcionals a seqüències proteïques. Aquests programes cerquen fragments d'aminoàcids amb característiques semblants als d'uns models coneguts. Un programa típicament utilitzat per detectar dominis funcionals és InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)¹.

A partir d'aquest programa, establirem quins dominis té la proteïna i la seva funció. Només necessitarem la seqüència d'aminoàcids que descarregarem amb el nostre programa. Fer una taula resum amb els resultats (coordenades del domini, funció...).

Punt 6: diferències entre seqüències

Descarregarem a la vegada diverses seqüències proteïques del gen de diferent organismes per alinear-les i comparar-les. Per això, utilitzarem ClustalW². Clustal és un programa d'ordinador àmpliament utilitzat per a l'alineament múltiple de seqüències.

Per facilitar la visualització del alineament, el visualitzarem amb MView (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>)³. Quin resultat important veus? Pots recolçar aquest resultat amb el que has vist a la bibliografia?

També pots comparar els diferents formats d'alineament (clustal, fasta i mega). Quin t'agrada més?

Punt 7: detecció de la selecció natural

Finalment emprarem el programa DnaSP (<http://www.ub.edu/dnasp/>)⁴ per tal de detectar evidències de l'acció de la selecció natural al gen, aplicant el test de la K_a/K_s .

Primer de tot, necessitaràs entendre què vol dir aquesta ratio!

A partir de l'alineament de seqüències nucleotídiques del gen en diferents organismes, mirarem quin tipus de substitucions són més freqüents al gen, per tal de deduir si la selecció natural hi ha estat actuant.

Punt 8: resum dels programes

De tots els programes bioinformàtics emprats, fes una taula resum amb la següent informació:

- Com s'hi accedeix?
- Per què serveix?
- Input
- Procediments i paràmetres
- Output

Punt 9: com organitzar-se

1. A la **introducció** hi haurà un resum de l'estat de l'art, és a dir, del que se sap, i que volem fer nosaltres.

2. **Objectius**: exposarem els nostres propòsits.

3. **Material i mètodes**: has de posar ordenadament quin programes fas servir a cada pas. Per exemple:

- a) Descarrega de seqüències. Les seqüències es descarregaran de la base de dades de Uniprot utilitzant...
- b) Alineament: s'utilitzarà ClustalW per alinear les seqüències...
- c) Etc.

4. **Resultats.** Has d'exposar ordenadament els resultats que vas obtenint. Hi ha dos grans resultats: el de l'alineament de seqüències proteïques i la detecció de la selecció. També inclourràs els resultats dels dominis proteïcs del gen i la seva informació en un tercer apartat.

5. **Discussió.** Critica els teus resultats. Intenta respondre la teva pregunta: podríem utilitzar aquest coneixement per obtenir una cura o tractament en humans?

6. **Conclusions.** Quines conclusions obtens.

7. **Referències bibliogràfiques.**

8. **Material suplementari.** Afegeix les taules resum dels programes.

Referències

1. Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., et al. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30, 1236–1240.
2. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(21), 2947–8.
3. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., ... Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W597–600.
4. Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* , 25, 1451–1452.

8.3. Scripts

8.4. Entrevista en versió original

Je suis en train de réaliser une étude sur le rat taupe, le seul animal au monde qui ne peut pas avoir le cancer, et sur les avantages et conséquences qu'on peut en retirer pour l'humanité.

C'est pour cela que je m'adresse à vous qui faites de la recherche à partir de souris dans un institut renommé de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire.

J'ai découvert grâce à un programme bioinformatique une double mutation au niveau du gène HAS2 (position 178 et 301, elles sont en rouge sur les photos). Ce gène contient l'information pour synthétiser un enzyme qui à son tour, synthétise l'acide hyaluronique.

Cette mutation étant présente dans le gène du rat taupe (l'acide aminé N est remplacé par un S à deux reprises), l'acide hyaluronique de cet animal a un plus gros poids moléculaire.

1/ Pourrait-on modifier le gène HAS2 d'un rat ou d'une souris afin qu'il ou elle possède le même gène mutant que le rat taupe ?

Oui. Ce genre d'approche est couramment employé chez la souris (le rat est un peu plus difficile à manipuler génétiquement). On parle alors de souris transgénique « knock-in », à ne pas confondre avec les modèles « knock-out » dans lesquels les gènes d'intérêt ne s'expriment plus. Dans le cas des souris knock-in, le but est donc d'introduire une mutation au sein même du gène d'intérêt par recombinaison homologe. Avec cette approche, tu pourrais donc aisément obtenir une souris portant ces deux mutations. D'autant plus qu'à la vue de tes alignements de séquences, le gène semble être très bien conservé d'une espèce à l'autre, ce qui augmente les chances de réussite technique. Mais attention, cette approche, bien que fonctionnant très bien, nécessite du temps. En effet, il faudra attendre deux à trois ans avant d'avoir les premiers animaux mutants !

Sache qu'il existe à ce jour de nombreux modèles de souris transgéniques qui portent des mutations impliquées dans différentes maladies génétiques chez l'homme. Ces animaux sont générés car ils permettent de mieux appréhender les conséquences de ces mutations au niveau de l'organisme entier, mais aussi au niveau de chaque organe. Par ailleurs il faut savoir que de nombreuses analyses sont faites non pas à partir de modèles animaux, mais à partir de modèles cellulaires. En effet, les cellules mises en culture sont beaucoup plus faciles à manipuler. En plus tu peux aisément les modifier génétiquement (cela prend quelques mois) et tu peux contrôler le milieu d'incubation comme tu le souhaites afin de soumettre les cellules à tous les traitements que tu veux. Dans ton cas, il serait intéressant de voir par exemple comment des cellules humaines ou de souris mutées synthétisent l'acide hyaluronique par rapport à des cellules isolées de rat taupe et ainsi clairement démontrer que ces mutations influencent directement la capacité d'HAS2 à synthétiser l'acide hyaluronique. On pourrait aussi voir si les cellules mutées sont capables ou non de s'agglomérer convenablement.

2/ La souris serait-elle alors capable de synthétiser par elle-même l'acide hyaluronique au poids moléculaire plus élevé ?

Si ces mutations sont effectivement à l'origine d'un acide hyaluronique de masse plus élevée chez les rats taupes, alors oui la souris mutée serait capable de synthétiser cet acide hyaluronique de haut poids moléculaire. En effet, on aurait introduit les mutations au sein même des allèles correspondant, ce qui fait qu'il n'y a aucune raison que les gènes mutés ne s'expriment pas normalement. Une autre idée intéressante serait d'exprimer fortement la forme « rat taupe » de HAS2 dans des cellules murines ou humaines et voir si cette seule surexpression suffit à produire un acide hyaluronique de masse plus élevée.

3/ Dans ce cas, l'animal muté serait-il immunisé contre le cancer ?

Alors, avant tout, on ne peut pas parler d'immunisation puisque le système immunitaire n'est pas impliqué dans ce mécanisme. Ensuite, on ne peut pas dire « le cancer » puisque les cancers sont extrêmement divers et d'origines

multifactorielles. La question serait de savoir si l'animal serait à même de se protéger contre toute forme de cancer. A cette question, il est difficile de répondre ! Ce serait tout l'intérêt d'un tel animal : pouvoir par ce modèle établir si ces mutations suffisent à modifier l'acide hyaluronique et ainsi jouer son rôle « protecteur » vis à vis de l'apparition de tumeurs.

4/ Cela pourrait-il avoir des conséquences négatives pour le fonctionnement interne ou l'organisme de l'animal ?

Il est difficile de répondre à une telle question. Il faut tout de même rappeler que cet acide hyaluronique de très grande masse permet une plus grande flexibilité de la peau chez le rat taupe, ce qui lui permet de mieux se mouvoir sous terre. Nous ne pouvons pas exclure que cela puisse avoir des conséquences sur les souris qui n'ont pas le même mode de vie que leurs cousins éloignés. Et puis enfin signalons que parfois une mutation ne va pas forcément avoir les mêmes effets une fois introduite dans un autre modèle animal ! Pour répondre, il n'y a pas d'autres alternatives que l'expérimentation...

5/ Si cela fonctionnait avec les rats ou les souris, pourrait-ce être applicable à d'autres animaux, ou par extension à l'homme ?

D'autres modèles animaux sont couramment employés afin de réaliser des études génétiques. C'est le cas notamment de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou du ver nématode (*Caenorhabditis elegans*). Ces animaux sont aisément manipulables génétiquement, ce qui fait que l'on pourrait facilement les modifier.

Pour l'homme, le problème est un petit plus vaste !!! Tout d'abord techniquement, cela reste à ce jour impossible à réaliser. En effet, il est impossible de modifier un gène dans la totalité des cellules composant un être humain. Une autre alternative serait de partir de cellules souches, que l'on pourrait modifier génétiquement et que l'on utiliserait afin de générer un nouvel être humain, autrement dit générer un clone muté d'humain ! De telles approches sont tout bonnement interdites pour des raisons éthiques évidentes !

6/ Pensez-vous que des recherches suivant cette voie pourrait aboutir à un remède efficace contre le cancer ?

Des travaux récents suggèrent qu'il y a des raisons de penser que l'acide hyaluronique pourrait s'avérer efficace pour les humains. Cette molécule est déjà utilisée dans les injections anti-rides ou pour soulager la douleur des malades de l'arthrite des genoux. Pourquoi alors ne pas imaginer qu'elle puisse donner lieu à de nouveaux traitements locaux contre certains cancers de la peau par exemple ? A voir... Maintenant il faut savoir qu'il existe différents types de cancers et que leurs origines sont diverses et extrêmement complexes. De très nombreuses études devront être entreprises d'ici à ce que l'acide hyaluronique se révèle être LA réponse à toutes ces tumeurs...

J'ai lu dans un article, que les télomères du rat taupe sont plus courts que ceux des autres animaux, et qu'il ne produit pas de télomérase, mais qu'il parvient à garder les télomères intacts tout au long de sa vie. En conséquence ses cellules ne vieillissent pas.

7/ Comment cela est-il possible?

Ta question est ambiguë... Avant tout les rats taupes produisent de la télomérase et heureusement pour eux ! Par ailleurs et point intéressant il semblerait même que l'activité de la télomérase soit augmentée dans les cellules souches de rats taupes ! Et puis il ne faut pas oublier que le vieillissement cellulaire ne se limite pas qu'à la longueur des télomères ! De nombreuses autres études doivent être réalisées afin de révéler les raisons de la durée de vie étonnamment longue de cet animal. Ainsi, le génome de l'animal doit être minutieusement étudié afin de voir si d'autres modifications génétiques pourraient être incriminées. Par ailleurs d'autres mécanismes doivent être analysés, comme les différents processus de réparation de l'ADN, les dommages oxydatifs et leur élimination, l'activité mitochondriale...

8/ Pensez-vous que l'homme pourrait tirer des bénéfices de ce constat en matière de santé ?

Il est indiscutable que ce modèle animal peut nous permettre de mieux comprendre certains processus clés intervenant dans la longévité et la protection contre l'émergence de cancers.

9/ Pourrait-on alors vivre plus longtemps et mieux ?

Appliquer à l'homme des résultats obtenus à partir du rat taupe nécessitera du temps... Mais cela peut effectivement, en association avec d'autres études portant sur d'autres alternatives, nous amener à découvrir des solutions afin de vivre plus longtemps et mieux.

8.5. Dietari del Treball de Recerca

23/07/2014

Aquell dia viag enviar-li un correu electrònic a la Fran demanant-li ajuda pel meu Treball de Recerca. Havia tingut uns problemes amb el tema que havia escollit al principi, i per tant, m'havia quedat a finals de juliol sense tema per fer-lo i això m'estressava una mica. Dubtava entre tres temes:

- Sobre el Ratopin Rasurado, l'únic animal immune al càncer.
- Mutació de Drosophiles Melanogaster.
- Planaries, els cucs capaços de regenerar-se.

24/07/2014

La Fran va contestar-me dient que fes una pluja de preguntes per tal de veure quin tema seria més factible. També em va facilitar el seu número de telèfon i em va dir que podíem quedar per tal d'ajudar-me a aclarar-me les idees.

01/08/2014

Vaig elaborar la pluja de preguntes i li vaig enviar a la Fran per a que m'aconsellés.

Vam quedar, vaig a anar a l'institut i ens vam quedar xarrant per tal de decidir què fer.

Es va mostrar molt comprensiva amb mí i amb ganes d'ajudar-me.

03/09/2014 : Quedada amb la tutora.

Avui, he anat a l'institut per parlar amb la Fran del meu Treball de Recerca. Durant l'estiu, ens havíem estat enviant missatges que contenien informació sobre el Ratopín, però no havíem arribat a decidir res concret. Per tant, vam decidir de fer una quedada per parlar més seriosament del tema. Quan vaig arribar al laboratori de biologia, ens vam posar a parlar de seguida del tema, i vam quedar en què ella seria la meva tutora del TR. També vam estar mirant enllaços que havia rebut després de preguntar-li a una investigadora del CRG (centre de regulació genòmica) si algú estava treballant amb el Ratopín. Malauradament, no es treballa amb la Ratatopo al CRG, i per això, va enviar-nos uns enllaços amb més informació sobre aquest animal. Estan en anglès i costa una mica entendre'ls, però la part positiva, és que al final de cada article, apareix el nom de qui l'ha escrit i podria intentar posar-me en contacte amb ell. Finalment, després de mirar una mica per sobre aquests textos, la Fran i jo vam quedar en què:

-Faria una llista de tots els gens que apareixen en aquells articles i buscaria la funció que tenen.

-Preguntaria a l'Antonio Barbadilla (tutor de la meva estada a l'Argó) si pot ajudar-me a trobar el genoma seqüenciat del Ratopín. Per, un cop tenir-lo comparar-lo amb un de ratolí normal mitjançant el BLAST.

-Buscar informació sobre l'àcid hyalurònic en el ratatopo per saber com és i què fa exactament.

- Buscar perquè el ratopín no agafa el càncer i els ratolins normals sí.
- Llegir articles per veure quines ventatjes podria tenir per als humans.
- Trucar a Estrasburg a un amic del meu pare que treballa en un dels laboratoris més importants d'europa i preguntar-li per algunes pràctiques.

04/09/2014

Avui he estat buscant els gens que hi havien als articles que m'havia passat la Fran.

El primer que he trobat ha estat el TP53, que codifica la proteïna P53. He trobat la seva funció en una pàgina de wikipedia.

Per a la resta de gens, no trobo gaire cosa o no entenc bé la seva funció. La majoria de les pàgines estan en anglés i són una mica complicades. Tot i així segueixo buscant a veure què trobo.

05/09/2014

Avui he trucat al millor amic del meu pare Emmanuel Compe que treballa en un dels laboratoris més reconeguts d'Europa, a Estrasbourg. Quan l'he trucat, li he explicat una mica el projecte, i li he dit que em faltava trobar una part pràctica. Li ha semblat súper interessant, però m'ha dit que ell treballava amb rates normals, i que al seu laboratori encara no s'havien plantejat la possibilitat de treballar amb farumfers. Em va prometre que, buscaria laboratoris a prop de Barcelona que treballessin amb aquest animal i què, els hi enviaria una sollicitud, per enviar-m'hi a fer pràctiques. Això m'ha posat molt contenta, ja què no esparava tanta involucració al meu treball i li agraeixo molt l'esforç.

06/09/2014

Ahir vaig trucar a l'amic del meu pare, per preguntar-li si en el seu laboratori feien pràctiques amb el ratopín. Em va dir que no, però que buscaria laboratoris a prop de Barcelona on en tinguessin i preguntaria si podria anar-hi per fer

practiques.

Avui ha enviat un mail, dient que, ho sentia molt però que no havia trobat cap laboratori a Europa on es treballés amb el ratopí.

M'ha dit que sabia de dos laboratoris als Estats Units que fan moltes practiques sobre l'animal :

-Barshop institute (San Antonio, Texas)

-Rochester University (New York)

M'ha enviat un article en anglés que van publicar investigadors de la Rochester University l'any passat (Que és un dels que em va enviar la Fran de part de la Annick Labeeuw) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3720720/>

També m'ha dit que no dubti en posar-me en contacte amb ell per a qualsevol altre cosa que necessiti, que està disposat a ajudar-me.

08/09/2014

Avui, he mirat aquest video: "

https://www.youtube.com/watch?v=l_uSrr8CVtU&list=PLFDAFBC112C1261D2&index=5 "

que m'ha passat la Fran i que parla sobre la proteïna P53 i la seva funció. M'ha semblat molt interessant, i m'ha fet plantejar-me molts més dubtes dels que abans tenia, és una bona senyal, vol dir que vaig aprenent més coses. Jo ja havia buscat per a què servia la P53, serveix per aturar i evitar la proliferació de cèl·lules tumorals. Està implicada doncs en la prevenció del càncer. El que jo no sabia, era què passava si "jugaves" amb aquesta proteïna, és

a dir, si afegies més quantitat o menys de la proteïna en un ratolí en el cas del vídeo, o en qualsevol altre organisme que en tingui.

He après què, si elimines la P53, els ratolins moren més ràpid i tots contrauen el càncer. Si els hi elimines una de les còpies de la proteïna, perquè es veu que n'hi ha dos, acaben morin més aviat que els que tenen les dues còpies. I si, afegeixes més P53 del compte, els ratolins envelleixen abans, perquè la proteïna està més activa i acaba confonent cèl·lules sanes amb cèl·lules tumorals. També he vist la funció del p63, però no he entès molt bé el tipus de tumors que provoca quan hi ha massa quantitat de la proteïna. I en canvi, en aquesta, quan l'extreus d'un ratolí normal, i fas que no la pugui codificar, contràriament a la p53, envelleix molt més ràpid que els ratolins normals.

http://www.dailymotion.com/video/xe5qew_vida-sexual-de-la-rata-topo-desnuda_school Vida sexual del farufer.

https://www.youtube.com/watch?v=htt_e5li_ws

<https://www.youtube.com/watch?v=sDQ-g7BADyc>

https://www.youtube.com/watch?v=YqZfjXa3_Ng

Programa del hormiguero. A un programa del hormiguero que es va emetre a principis d'abril, parlen d'algunes característiques del ratopín, aquestes en concret :

- Són cegs
- Venen d'Àfrica: Somalia, etiopia, Kènia...
- Viuen en túnels sota la terra.
- No tenen pel.
- No acumulen greix sota la pell.
- Poden moure les seves quatre dents independentment.

- No contrauen el càncer. S'ha intentat produir-los el càncer en laboratoris però no ho han aconseguit (Parlen d'un gen P16, i de l'àcid hialurònic)
- Poden viure fins als 30 anys.
- És l'únic màmifer que s'organitza en societat com els insectes.
- La reina s'encarrega de tenir totes les cries, escolleix d'un a tres mascles per a tenir-les, i la resta de mascles faran d'obriers.
- No envelleixen.
- Poden sobreviure 30 minuts sense oxigen.

Els ratopins que he vist al programa venen del bioparc de València, que els hi han deixat en préstec.

<http://www.bioparcvalencia.es/animales-y-habitats/animales/>

He buscat la pàgina del bioparc de València i he llegit la fitxa del ratopin on hi ha més informació sobre aquest curiós animal. Parlen de l'habitat, la dieta, el període de gestació, l'esperança de vida, el comportament que té. Hi han curiositats molt interessants.

09/09/2014

Avui he escrit un mail a la Marta Coronado, la meva tutora del Argó, explicant-li el meu treball de recerca. Li he sol·licitat ajuda per instal·lar el Perl al meu ordinador, i li he preguntat si podia ajudar-me a trobar el genoma del ratopín. A veure què em contesta.

http://ca.wikipedia.org/wiki/%C3%80cid_hialur%C3%B2nic#Funcions

He llegit aquest enllaç de la wikipedia on parlen de l'àcid hialurònic per saber millor el que és. L'he trobat una mica complicat i m'he saltat algunes parts.

10/09/2014

Avui he quedat amb la tutora perquè em diexi un llibre de biologia de segon de batxillerat i així poder mirar-me el tema que parla sobre els càncers i tumors.

Per la tarda he vist que la Marta m'havia contestat. M'ha dit que li feia il·lusió que li hagués enviat un mail demanant-li ajuda. M'ha dit que pensaria com podem enfocar el tema i m'ha facilitat unes pàgines web amb el genoma del ratopin.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?term=SRA030468>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AFSB000000000>

12/09/2014

Llegint l'article : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3720720/> que m'havia enviat el Emmanuel Compe, l'investigador que és amic del meu pare, me n'he adonat de dues coses:

-Al fet de que estigui en anglès no és el que em fa no entendre'l del tot, sinò que és perquè hi ha uns termes realment complicats que em dificulten la comprensió del que l'article diu.

-La proteïna P53 que havia estat mirant, no surt a l'article, parlen del gen HAS2.

18/09/2014

Avui he rebut la confirmació sobre la possible estada a l'IBB per realitzar la meva part pràctica. Al doctor Antonio Barbadilla li sembla una molt bona idea i hem permet l'accés al seu despatx, així com, a un ordinador d'allà per poder realitzar la pràctica correctament, estic encantada!

05/10/2014

La Marta m'ha enviat un guió de proposta amb el que puc fer de part pràctica del treball, m'agrada molt! És d'ecomparar seqüències proteïques amb programes bioinformàtics.

Parlarem més sobre el tema el dia 9 que hem quedat per a que vagi a l'IBB.

08/10/2014

Avui ha sigut el primer dia a la UAB, ha anat molt bé. La Marta m'ha explicat tot el que faria que és en conclusió, tornar a realitzar la investigació que ja van fer els americans de veure perquè el ratopín no prenia el càncer, a la meva manera. M'ha donat uns impresos dels treballs originals, que estan en anglés i són molt difícils d'entendre, però m'ha dit que no em preocupés que era només per a què els posés a l'annex.

També vam redactar els objectius del TR, i concretament, de la part pràctica, que crec que serà la majoria del TR, perquè serà molt extens. També m'ha fet buscar i esbrinar què era el "test de la Ka/Ks. I m'ha deixat uns deures pel proper dia d'anar mirant programes bioinformàtics i jugar una mica per veure com funcionen.

Aquesta setmana tin 5 exàmens i no sé si podré anar-hi, però aniré fent feina a casa.

14/10/2014

Avui i aquests dies he estat intentant descarregar els programes que necessitaré per la part pràctica, al meu ordinador, però no sóc capaç de fer-ho, hauré d'esperar a que la Marta m'ajudi.

He estat buscant més informació sobre el ratopin, i veig que hi ha informació diferent depenent de la pàgina web que miri. Hauré d'anar en compte a la hora de triar el que poso al treball.

22/10/2014

Avui a l'IBB he fet una taula amb uns mamífers i els seus respectius codis per accedir al seu gen HAS2 i després poder fer-ne la comparació. He utilitzat la base de dades UNIPROT per la taula de les proteïnes HAS2, i la del NCBI per la taula dels gens HAS2.

29/10/2014

Avui he anat a la UAB i he buscat el que era el domini proteic d'un gen, també he redactat com havia instal·lat els programes bioinformàtics necessaris.

També he trobat la mutació de la proteïna HAS2 (que és un enzim) que és diferent en el ratopin. Estic molt contenta. He fet una foto i amb el paint he emmarcat els resultats amb un recuadre vermell, el proper dia redactaré bé el que he fet i trobat, perquè avui m'he quedat curta de temps.

He intentat fer el test de la Ka/Ks però no sé si m'ha sortit bé, l'intentaré repetir.

30/10/2014

Avui he enviat un missatge a la Fran per enviar-li tot el que tinc fet fins ara:

- Explicació de l'instal·lació dels programes
- Explicació del test de la Ka/ks
- Taules de gens proteïnes i organismes
- Una mica de recerca sobre el gen objectiu

05/11/2014

Avui he redactat el que havia fet de la comparació de les proteïnes a la UAB.

14/11/2014

Avui he trobat una pàgina web amb característiques molt interessants sobre el farumfer, he fet un petit resum aclaratori per tal de que se'm quedin guardades i poder-les redactar correctament quan trobi més informació. L'enllaç és:

<http://www.bioterios.com/2013/post.php?s=2014-01-26-la-rata-topo-desnuda-conozca-al-vertebrado-ms-destacado-del-ao-2013>

26/11/2014

Ja tinc el test definitiu de la Ka/Ks i he comentat a discutir els resultats de la part pràctica. He tornat a redactar alguna cosa que no estava bé i finalment, he buscat imatges de l'àcid hialurònic i del ratopin.

30/11/2014

Amb la Marta portem uns dies parlant per missatges. Volíem trobar una imatge de la proteïna HAS2, plegada, tridimensional, però tenim moltes dificultats per trobar-la. Necessitem descarregar uns programes específics, i no sabem perquè l'ordinador no els vol descarregar, i no funcionen. Crec que haurem de deixar-ho de banda i seguir avançant

3/12/2014

Avui he quedat amb la Fran i hem parlat al laboratori. Li he ensenyat el que tenia i hem quedat que he de tornar a redactar lo de la Ka/Ks perquè no s'enten, i que hem falten bastantes coses per fer. El meu treball encara no està ben estructurat, li falta la forma. El contingut no està malament, però està incomplet.

He de seguir treballant.

10/12/2014

Avui és l'últim dia que vaig a la UAB. Ja he acabat la part pràctica i només em falta redactar bé algunes coses i redactar els objectius, que completaré amb el treball teòric.

Li aniré enviant el que vaig fent a la Marta per a que m'ajudi i em digui si el que faig està bé.

17/12/2014

Porto tota la setmana treballant, per exàmens i treballs, i no he tingut temps de fer molta cosa. Vaig llegint pàgines i escrivint tot el que em sembla interessant sobre el ratopin, ja endreçaré les idees del que he escrit, a veure com em queda.

He començat a redactar correctament tota la informació que havia trobat sobre el farumfer.

22/12/2014

<http://dciencia.es/la-rata-topo-desnuda/>

Avui he reorganitzat coses que tenia soltes, i he començat a elaborar l'índex.

29/12/2014

He redactat la introducció i els objectius (els objectius els he retocat i millorat dels que tenia abans).

04/12/2014

He acabat de redactar tot el que volia posar sobre el farumfer, espero les opinions de la Fran per afegir, o treure coses.

07/01/2014

Avui he redactat una entrevista per fer a Emmanuel Compe, l'he fet en català i hauré de traduir-la al francès perquè si no no l'entendrà. Espero poder fer-li aviar l'entrevista, mentres tant, ja tinc quasi tot el treball acabat, espero que només em falti polir-lo.

10/01/2015

Després d'haver quedat amb la Fran, he corregit algunes faltes que ha trobat, i he rectificat alguns apartats. He començat a elaborar el glossari, i he modificat les conclusions en base al que al final he trobat i fet.

14/01/2015

Avui he enviat l'entrevista a l'investigador, i he millorat alguns detalls del treball.

15/01/2015

Avui he rebut les respostes de l'entrevista, les he traduït del francès (molta feina) i les he posat al treball. Demà li ensenyaré a la Fran.

16/01/2015

Avui he entregat a la Fran un borrador amb quasi tot ja, és hora d'acabar. Hem corregit algunes coses importants, i he de seguir treballant per tal d'acabar bé el treball.

He d'afegir un apartat sobre l'acid hialurònic.

El vaig fent.

18/01/2015

Avui he acabat l'apartat de l'acid hialurònic i he redactat correctament el de Metodologia del Treball.

També he elaborat els annexos i he modificat algunes coses que la meva tutora m'ha suggerit que modifiqués.

Deixo per demà l'elaboració del glossari, i la correcta redacció de les conclusions.

19/01/2014

Avui he afegit els últims tocs al meu treball. He corregit tot el que la meva tutora i jo hem estat parlant aquest matí.

Quin pes em trec de sobre!

Ha estat genial realitzar aquest treball, he après moltíssim.

8.6. CD del Treball de Recerca

9. BIBLIOGRAFIA

- Els articles apareixen a l'annex 8.1.

9.1. Webgrafia

- http://www.dailymotion.com/video/xe5qew_vida-sexual-de-la-rata-topo-desnuda_school (Vida sexual del farumfer)
- <http://www.bioterios.com/2013/post.php?s=2014-01-26-la-rata-topo-desnuda-conozca-al-vertebrado-ms-destacado-del-ao-2013> (Algunes característiques interessants sobre l'animal)
- <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/ampliaciones/2-hialuronico.php> (informació molt interessant sobre l'àcid hialurònic, té unes imatges molt bones)
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=mview-120141022-162457-0578-42245534-pg>
- <http://concienciados.es/tag/cancer/>
- <http://www.reumatologiaclinica.org/es/el-acido-hialuronico-el-tratamiento/articulo/13083697/>
- <http://www.sanissima.com/Hialuronico-Onagra-EPAPLUS-60perles>
- http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HAS2.html
- http://es.wikipedia.org/wiki/Heterocephalus_glaber
- <http://esmateria.com/2013/06/19/el-unico-animal-inmune-al-cancer-revela-su-secreto/>
- <http://www.agenciasinc.es/Noticias/El-ARN-del-ratopin-rasurado-esconde-el-secreto-de-su-longevidad>
- http://sophimania.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=20882:el-secreto-del-ratopin-el-unico-animal-que-no-desarrolla-cancer&catid=127&Itemid=727

- https://www.youtube.com/watch?v=YqZfjXa3_Ng
- <http://www.pnas.org/content/110/43/17350.abstract>
- <http://revistaecoaula.blogspot.com.es/2014/02/desvelando-los-secretos-del-ratopin.html>
- <http://www.libertaddigital.com/ciencia-tecnologia/ciencia/2013-06-20/el-unico-animal-inmune-al-cancer-revela-su-secreto-1276493437/>
- <http://www.quo.es/naturaleza/la-rata-casi-inmortal>

