

VCH-FC
Biotecnología

E 29

C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Pcc1/Pig-P son requeridas para la correcta síntesis de proteínas y desarrollo de *Drosophila melanogaster*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Cristian Eduardo Eggers Aracena

Director de Seminario de Título:

Dr. Álvaro Glavic

Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Mayo 2016

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por **Cristian Eduardo Eggers Aracena : "Pcc1/Plg-P son requeridas para la correcta síntesis de proteínas y desarrollo de *Drosophila melanogaster*"** ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Alvaro Glavic Maurer
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AGM', written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Elías Utreras Puratich
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'EUP', written over a horizontal line.

Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'RCP', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, mayo de 2016

BIOGRAFIA

Nací el 15 de Mayo de 1990 en Santiago, el segundo hijo de Flavio y Patricia. Realice mis estudios básicos y medios en el Colegio Alemán Sankt Thomas Morus, y durante ese tiempo me di cuenta que mi área de interés eran las ciencias biológicas. Hasta los 14 años practique tenis a nivel competitivo, lo que me enseñó a llevar un



estilo de vida sana y a valorar el esfuerzo que se requiere para cumplir metas. Además tuve el privilegio de realizar un intercambio a Érfurt, Alemania, donde pude conocer otras realidades y darme cuenta de todo lo que falta por avanzar en Chile. Una vez egresado de cuarto medio, ingrese al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile, donde la gran variedad de tópicos estudiados me mostro el potencial que tiene la biología y las diversas maneras en que podemos interactuar con ella, reafirmando mis deseos de estudiar esta área, por lo que seguí mi camino hacia Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. Creo que aún falta mucho por avanzar y como Steve Jobs alguna vez dijo: *“si tu lo deseas puedes volar”*.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El trabajo contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1140522.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFIA.....	iv
FINANCIAMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	ix
1 RESUMEN.....	1
2 ABSTRACT.....	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudios	3
3.2 Crecimiento celular	5
3.3 ARNts de transferencia	7
3.4 Complejo KEOPS.....	8
4 HIPÓTESIS.....	13
5 OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo General.....	13
5.2 Objetivos Específicos.....	13
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Manejo de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
6.2 Cultivos Bacterianos	14
6.3 Transformación de <i>E. coli</i>	14
6.4 Extracción de ADN.....	14
6.5 PCR y electroforesis	15
6.6 Purificación de bandas desde geles de agarosa	15
6.7 Análisis <i>in silico</i> , diseño y síntesis de Pcc1-GFP, Pig-P-Flag y Reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag.....	15
6.8 Clonamiento de <i>Pcc1</i> , <i>Pig-P</i> y Reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag.....	16
6.9 Transformación de la línea germinal de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
6.10 Curvas de crecimiento.....	18

6.11	Montaje de alas adultas y fotografía de alas y larvas.....	18
6.12	Inmunohistoquímica.....	18
6.13	Cultivo y transfección de células S2R+	19
6.14	Extracción de proteínas, Co-inmunoprecipitación y Western Blot.....	19
7	RESULTADOS.....	22
7.1	Análisis <i>in silico</i> de <i>Pcc1</i>	22
7.2	Generación de Herramientas para estudiar los genes <i>Pcc1/Pig-P</i>	24
7.3	Participación de <i>Pcc1</i> en el complejo KEOPS.....	27
	27	
7.4	Efectos del <i>knock down</i> de <i>Pcc1/Pig-P</i> en el desarrollo de <i>Drosophila</i>	28
7.5	Rol de <i>Pcc1/Pig-P</i> en la síntesis de proteínas.....	32
7.6	Patrón de expresión del Reportero HA- <i>Pcc1/Pig-P</i> -Flag	34
8	DISCUSIÓN.....	37
9	CONCLUSIONES.....	42
10	REFERENCIAS	43
11	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ciclo de vida de Drosophila melanogaster</i>	3
Figura 2. Esquema del sistema UAS/GAL4	4
Figura 3. Funciones de mTORC1	6
Figura 4. Esquema de la estructura de un ARN de transferencia y sus modificaciones	8
Figura 5. Mecanismo de síntesis de t(6)A	10
Figura 6. <i>Estructura de los genes CG42498 y CG14550</i>	23
Figura 7. Constructos generados y su expresión en células S2R+	26
Figura 8. Pcc1 interactúa con el complejo KEOPS	27
Figura 9. Eficiencia del ARNi contra Pcc1/Pig-P	29
Figura 10. Efecto del <i>knock down</i> de Pcc1/Pig-P en el desarrollo de <i>Drosophila</i>	31
Figura 11. <i>Knock down</i> de Pcc1/Pig-P induce activación de UPR	33
Figura 12. Traducción del Reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag en distintos tejidos	36
Figura Suplementaria 1. Efecto del <i>knock down</i> de Pig-A	47

LISTA DE ABREVIACIONES

°C	Grado Celsius
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATF4	Activating Transcription Factor 4
BLAST	<i>Basic Local alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovina
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
dpp	<i>Decapentaplegic</i>
dNTP	Desoxinucleosido trifosfato
g	Fuerza de gravedad
GFP	Proteína fluorescente verde
GPI	Glicosil-fosfatidil inositol
h	horas
HIF1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
KEOPS	<i>Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size</i>
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
mA	Miliamperes

miARN	Micro ácido ribonucleico
min	minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mORF	Marco abierto de lectura principal
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
ng	Nanogramo
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	Tampón fosfato salino
PBT	1xPBS con Tritón X-100 al 0.3%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
Ph	<i>Faloidina unida a tetrametilrodamina</i>
Prpk	<i>p53-related protein kinase</i>
s	<i>segundos</i>
S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico
SV40	<i>Simian Vacuolating virus 40</i>
t(6)A	N(6)-treonilcarbamoiladenosina
TAE	Tampón Tris, Acetato y EDTA
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	1xTBS con Tween 20 al 0.1%
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TRITC	Tetrametilrodamina

UAS	Upstream Activating secuencia
uORF	Marco abierto de lectura río arriba
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UTR	Región no traducida
UV	Luz ultravioleta
V	Volts
WB	Western Blot
WT	Silvestre
Xbp1	X-box binding protein 1

1 RESUMEN

La modificación N(6)-treonilcarbamoiladenosina (t(6)A) de ARNts es conservada y esencial para el crecimiento celular. Esta modificación es sintetizada por Sua5 y transferida por el complejo KEOPS. En *Drosophila* existen homólogos para 3 de los componentes del complejo: *Kae1*, *Prpk* y *Pcc1*, pero no para el componente Cgi121 de levadura. Previamente en el laboratorio se demostró que existe interacción entre *Kae1* y *Prpk*, y que ambas proteínas son requeridas para sintetizar ésta modificación. El papel de *Pcc1* no ha sido caracterizado. *Pcc1* es codificado en *Drosophila* por un gen bistrónico, que también codifica *Pig-P*. Para evaluar la participación de *Pcc1* en el complejo KEOPS hicimos Co-IP entre *Pcc1* y *Prpk*, mostrando que *Pcc1* interactúa con el complejo. Con un ARNi inducible contra *Pig-P* se analizaron los efectos del *knock down* de ambas proteínas. Observamos que su pérdida de función genera problemas en el desarrollo. Además, se produce activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Por último, se generó un animal transgénico que permite expresar un mensajero para ambas proteínas fusionadas en sus extremos N- y C-terminal a un tag diferente. Determinamos que los niveles de expresión de cada proteína es dependiente del tipo celular en el cual se expresa el constructo; células en proliferación poseen mayores niveles de *Pcc1*-HA que células diferenciadas. Estos datos sugieren que *Pcc1* es parte del complejo KEOPS, y que los fenotipos observados se deben a la pérdida de esta proteína. Sin embargo, no es posible descartar la contribución de *Pig-P*. La expresión diferencial de *Pcc1* en distintos tejidos podrían revelar una nueva forma de regular la cantidad de ARNt modificados, y por ende, el proceso de traducción en general.

2 ABSTRACT

N(6)-threonylcarbamoyladenosine (t(6)A) is a conserved modification of tRNA essential for cell growth. Sua5 and the KEOPS complex synthesize this modification. Homologs to 3 proteins of the complex are present in *Drosophila melanogaster*: *Prpk*, *Kae1* and *Pcc1*, but not to the yeast component Cgi121. We have shown that *Prpk* and *Kae1* interact with each other and are required to modify the tRNAs. Regarding *Pcc1*, coded in *Drosophila*'s genome by a bicistronic gene that also codifies *Pig-P*, there are no studies. To evaluate the participation of *Pcc1* in the KEOPS complex, we performed a Co-IP between *Pcc1* and *Prpk* showing that *Pcc1* interacts with the complex. Using an inducible RNAi against *Pig-P* we could analyze the effects of the knock down of both proteins. This showed that these genes are required for *Drosophila*'s development. Furthermore we could detect activation of the Unfolded Protein Response (UPR) under this condition. During this project, a transgenic animal was generated. It allows us to express the whole mRNA, but with both proteins labeled with a different tag at their N and C terminal end. Using this tool we determined that the levels of each protein are dependent on the cellular type the construct is expressed; proliferating cells have higher levels of *Pcc1* than differentiated ones. Our data suggest that *Pcc1* is part of the complex and that the phenotypes observed are caused by its loss of function due to the similarities with the effects of loss of function of the other elements of the KEOPS complex. Nevertheless, we cannot exclude a possible contribution of *Pig-P* to the phenotypes. The different translational levels of *Pcc1* could reveal a novel way of controlling the amount of modified tRNA, and therefore the overall translational processes.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudios

Drosophila melanogaster, la mosca del vinagre, es un insecto holometábolo que ha sido ampliamente utilizado como animal modelo debido a las amplias ventajas que posee. Entre ellas se pueden nombrar: el fácil manejo y mantención debido a su pequeño tamaño, un ciclo de vida corto (10 días a 25°C aproximadamente, Figura 1), alto número de descendencia, y un genoma pequeño (4 cromosomas), secuenciado y detalladamente anotado (Greenspan, 2004).

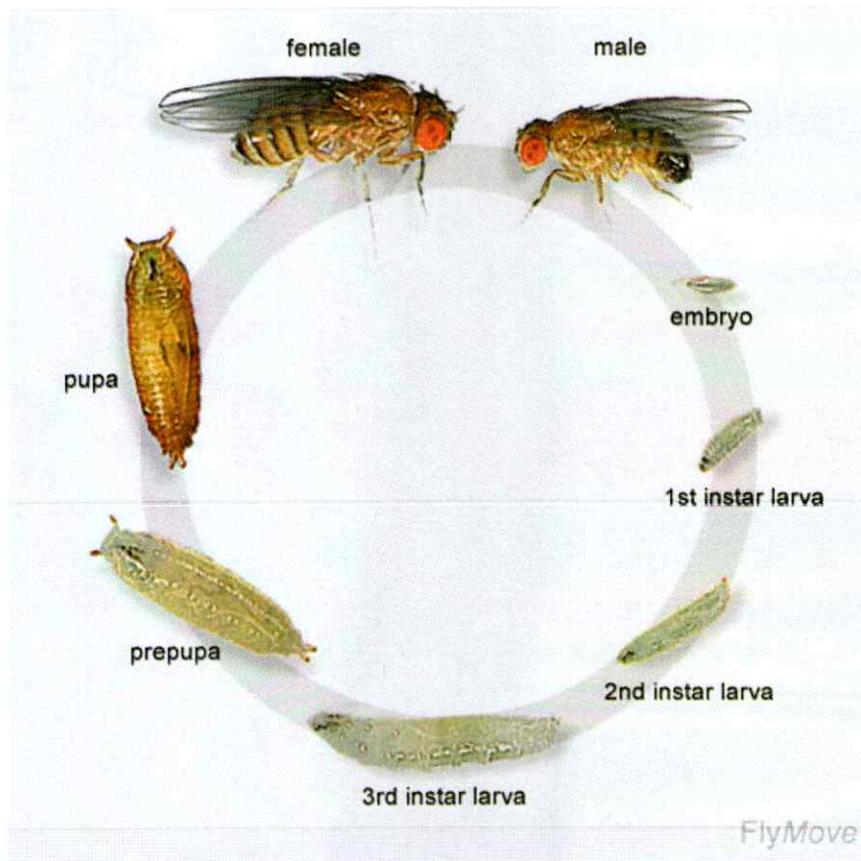


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El ciclo de vida de la mosca del vinagre se divide en 4 fases: etapa embrionaria, larvaria, pupal, y adulta. (Tomado de Flymove)

Una de las grandes ventajas de *Drosophila* son las herramientas genético-moleculares entre las que destaca el sistema UAS/GAL4 para la expresión de transgenes. GAL4 corresponde a un factor de transcripción de levadura que participa en el metabolismo de galactosa. Como factor de transcripción es capaz de inducir la transcripción de cualquier gen que este ubicado río debajo de la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*).

En *Drosophila*, este sistema se usa de manera bipartita. Se cruza un animal que exprese GAL4 bajo el control de un *driver* (*enhancer o promoter trap*) con un animal que tiene un transgén río debajo de la secuencia UAS. De esta manera, la descendencia tendrá ambas partes del sistema y el transgén se expresará con el mismo patrón que el GAL4 (Figura 2, Brand y Perrimon, 1993).

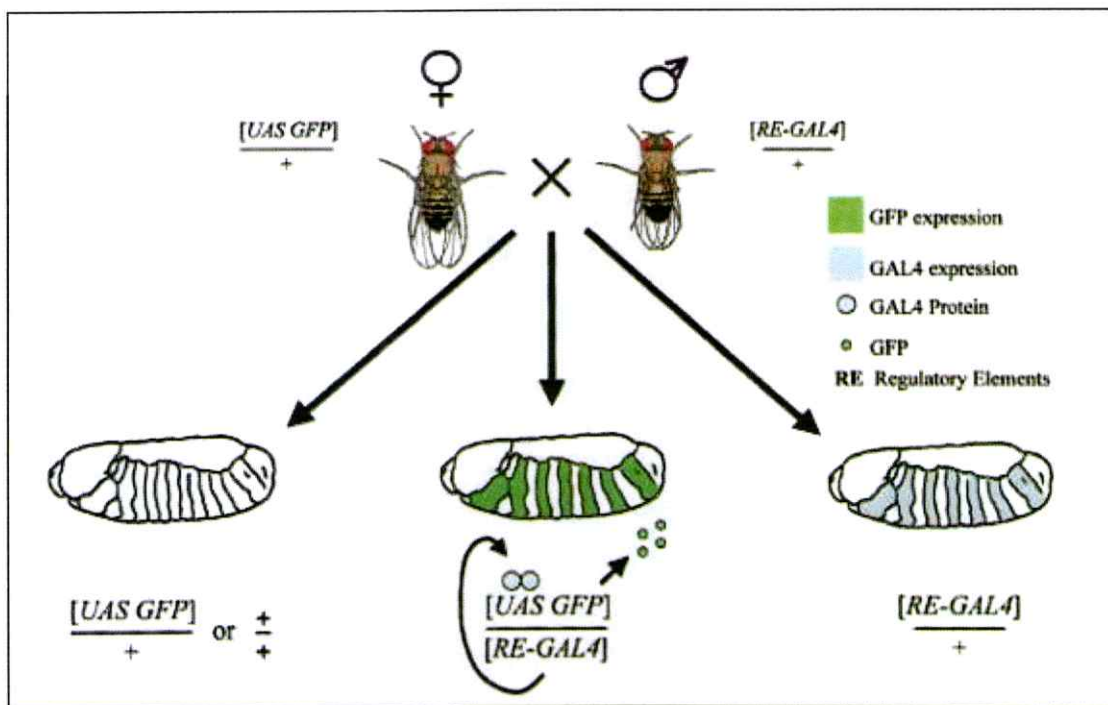


Figura 2. Esquema del Sistema UAS/GAL4. Cuando se cruza una línea que expresa GAL4 con una línea que posee un transgén río debajo de la secuencia UAS, el transgén se expresará con el patrón de GAL4. (Modificado de Duffy, 2002)

Actualmente existe una amplia librería de animales que expresan GAL4 bajo el control de distintos promotores o *enhancers*, cada uno con un patrón espacio-temporal particular. Esto permite realizar la expresión de los transgenes de manera específica en un determinado tejido y/o en una determinada etapa del desarrollo de *Drosophila* (Jennet y Cols., 2012).

3.2 Crecimiento celular

El tamaño final de un organismo se genera principalmente por dos factores: el balance entre proliferación y apoptosis, y el crecimiento celular. La proliferación y la muerte celular son esenciales para la morfogénesis de órganos durante el desarrollo. El balance entre estos dos procesos permite mantener un equilibrio entre los distintos linajes celulares (Danial and Korsmeyer, 2004; Sherr, 2004). Por otro lado, el crecimiento celular es crucial en aquellos procesos en los cuales se acumula biomasa y es un factor determinante en el tamaño de las células, órganos y organismos (Kim y Cols., 2003).

Target of rapamycin (TOR) es una serina/treonina kinasa fundamental en el control del desarrollo. Se encuentra presente en todos los eucariontes. Mientras que algunas levaduras poseen dos genes que codifican para TOR, en el resto de los eucariontes solo se halla uno (Dobashi y Cols., 2001). Esta proteína integra las condiciones ambientales y celulares, como factores de crecimiento, la disponibilidad de nutrientes, estado energético de la célula y si existen o no algún tipo de estrés (Wullschleger y Cols., 2006). Si las condiciones son favorables, TOR promueve procesos anabólicos, como la síntesis de proteína a través de la fosforilación de una enorme cantidad de

proteínas blanco. Entre todos los blancos de TOR, destacan S6K y 4E-BP1, ambas involucradas en el proceso de iniciación de la traducción (Hay y Cols., 2004), Figura 3. También se ha descrito que TOR regula los 3 tipos de ARN polimerasas, estimulando la transcripción de ARN ribosomal (polimerasa I), proteínas ribosomales (polimerasa II) y ARNs de transferencia y genes 5S (polimerasa III) (Mayer y Cols., 2006). La pérdida de función de esta proteína provoca defectos en el crecimiento y el arresto del ciclo celular tanto en levadura como en eucariontes superiores. Estos efectos son muy similares a los generados ante una situación de privación de nutrientes (Loewith y Cols., 2011).

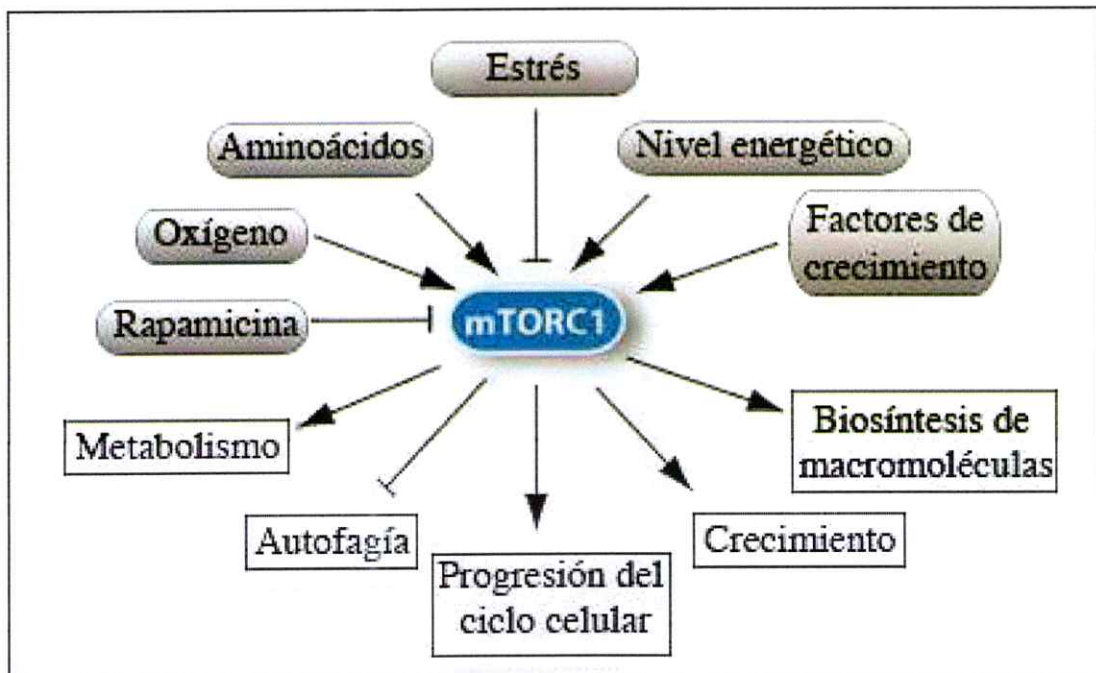


Figura 3. Funciones de mTORC1. mTORC1 es capaz de responder ante distintas condiciones ambientales e intracelulares para promover el crecimiento celular. (Modificado de Laplante y Sabatini, 2012).

3.3 ARNts de transferencia

Como se mencionó, entre los factores ubicados río abajo de TOR, están los ARNs de transferencia (ARNt). Estas moléculas funcionan como adaptadores que permiten que el código genético sea traducido en aminoácidos. Sin embargo, los ARNts no son simplemente adaptadores dentro de lo que es la síntesis de proteína, sino que tienen algún grado de regulación sobre este proceso. Se ha descrito que la sobreexpresión de ARNts por sí solos son capaces de inducir un aumento en el crecimiento celular y animal. En particular, basta con sobreexpresar el ARNt de inicio para lograr estos efectos (Rideout y Cols., 2012, Rojas-Benítez y Cols., 2015).

Hasta la fecha se han descrito más de 90 nucleósidos modificados presentes en los ARNts. Las modificaciones están involucradas en distintos aspectos, algunas son necesarias para el procesamiento de los ARNt, mientras que otras son necesarias para el correcto reconocimiento de los codones. (Hiroyuki, 2014).

Entre todas las modificaciones existentes, este proyecto se centra en particular en la modificación N(6)-treonilcarbamoiladenosina (t(6)A). Esta es una modificación que se encuentra en la adenosina 37 de todos los ARNt que reconocen codones de la forma ANN, siendo "A" adenina y "N" cualquier base nitrogenada (Srinivasan y Cols., 2011). En la Figura 4 se muestra un esquema de la estructura de los ARNt y de la modificación t(6)A. T(6)A es necesaria para la interacción codón-anticodón. Esto permite un correcto reconocimiento de los codones y una traducción de los ARN mensajeros (ARNm) adecuada.

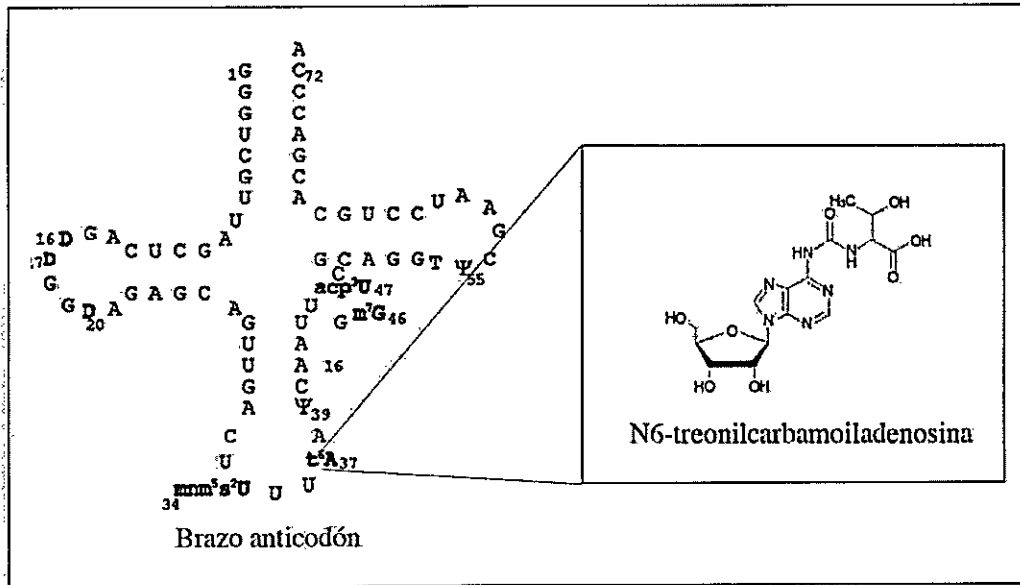


Figura 4. Esquema de la estructura de un ARN de transferencia y sus modificaciones. Los ARN de transferencias poseen estructura secundaria en forma de trebol y distintas modificaciones en diferentes bases. En la adenosina 37 de los ARN de transferencia que codifican codones de la forma ANN se encuentra la modificación t(6)A (Modificado de Deutsch et al., 2012).

3.4 Complejo KEOPS

La modificación t(6)A es sintetizada por la proteína Sua5 y el complejo multiproteico KEOPS; por sus siglas en ingles (*Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size*). Estas proteínas se encuentran universalmente distribuidas y ensayos de complementación entre los homólogos de los tres reinos sugieren un mecanismo conservado en la síntesis de la modificación (Perrochia y Cols., 2013 [a]).

Ensayos de actividad de Sua5 sugieren que esta proteína formaría un intermediario, treonilcarbamoiladenilato, el cual sería posteriormente transferido a los ARNt por el complejo KEOPS (Perrochia y Cols., 2013 [b]). En levadura, la pérdida de función de Sua5 genera problemas en el inicio de la traducción, cambios +1 en el marco de lectura y errores al reconocer codones de término (Lin y Cols., 2010)

En levaduras el complejo KEOPS esta formado por cuatro subunidades: pKae1, una metaloproteína con actividad ATPasa, Bud32/Prpk, una kinasa atípica, y dos proteínas pequeñas, Pcc1 y Cgi121. En el caso del reino Fungi se hay una quinta subunidad presente: Gon7 (Srinivasan y Cols., 2011).

Estudios de las subunidades de KEOPS en microorganismos (arqueas, bacterias y levaduras) han demostrado que *Kae1*, *Prpk* y *Pcc1* son necesarios para el correcto crecimiento de los organismos (Hecker y Cols., 2009; Lin y Cols., 2010; Oberto y Cols., 2009). Otros estudios, también en microorganismos, han demostrado que *Kae1*, *Prpk* y *Pcc1* conforman la unidad funcional mínima para poder realizar la modificación. Cgi121 solo correspondería a un regulador alostérico (Perrochia y Cols., 2013[b]).

Dentro de la unidad mínima, se vio que *Kae1* es la unidad catalítica que transfiere el intermediario a los ARNt. En lo que respecta a *Prpk*, se vio que en el complejo es regulado por *Kae1* y no actúa como kinasa, sino que tiene actividad ATPasa. Esta actividad participa en la disociación del ARNt modificado del complejo. Finalmente, a *Pcc1* se le atribuyen dos roles. Por un lado, constituye junto con *Kae1* el dominio de unión de los ARNt, y por otra parte actúa como puente formando un dímero entre 2 complejos. La configuración básica del complejo y el proceso de síntesis de la modificación se resume en la Figura 5 (Zhang y Cols., 2015).

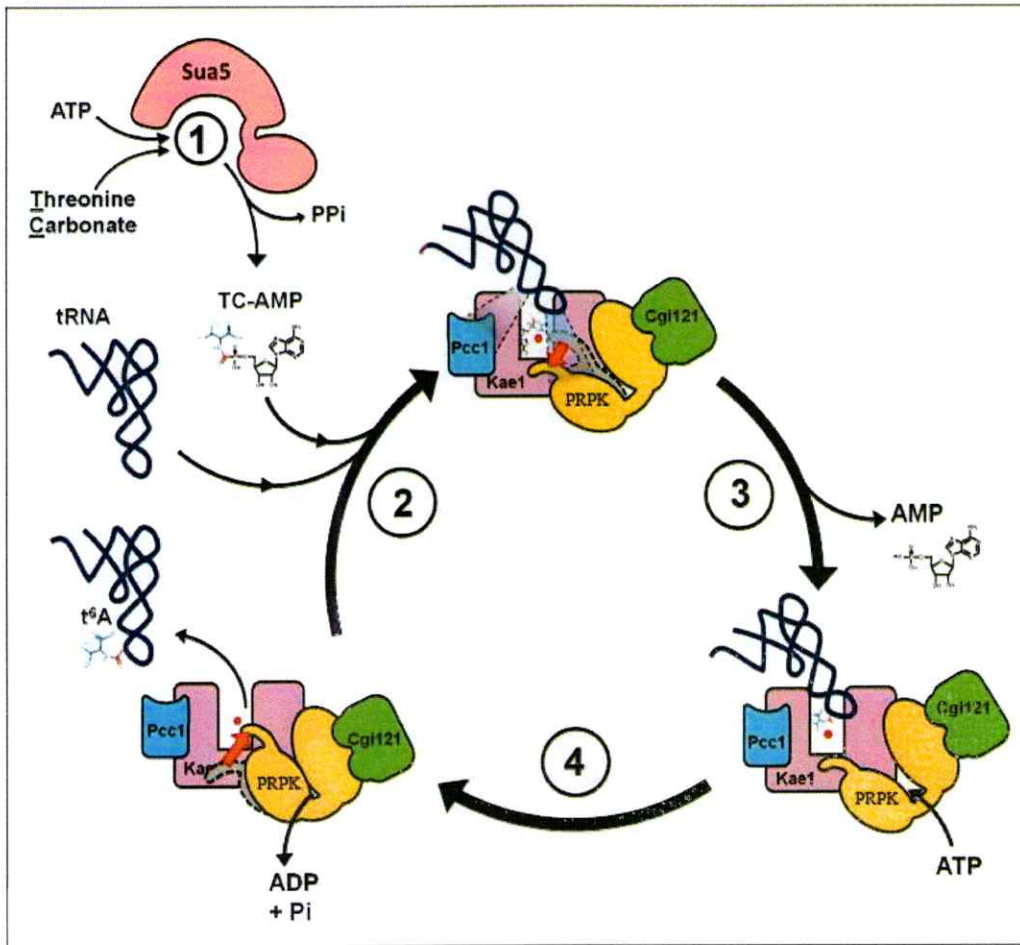


Figura 5. Mecanismo de síntesis de t(6)A. El intermediario formado por Sua5 se une al complejo KEOPS induciendo cambios conformacionales. Kae1 y Pcc1 forman la mayor parte de la superficie de contacto (triángulos grises). El intermediario es transferido al ARNt liberando AMP al medio. Finalmente la hidrólisis de ATP provoca un cambio conformacional de Prpk liberando el ARNt modificado. (Modificado de Perrochia y Cols., 2013)



A pesar de la alta conservación de KEOPS dentro de la filogenia, existen limitadas publicaciones acerca del complejo en metazoos. Muchos de estos trabajos han utilizado a *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio. En este animal se hayan homólogos para *Kae1*, *Prpk* y *Pcc1*.

Ibar y Cols. lograron mostrar que en *Drosophila melanogaster* *Prpk* es necesaria para la proliferación y crecimiento celular. Más aún, llegaron a relacionar sus resultados con TOR debido a las similitudes que estos tenían con los fenotipos producidos por su pérdida de función (Ibar y Cols., 2012). Continuando con la línea del rol del complejo KEOPS y su impacto en la traducción de proteínas, Rojas-Benítez y Cols. vieron también en *Drosophila*, que en condiciones de pérdida de función, tanto de *Kae1* como de *Prpk*, se induce el procesamiento de *Xbp1* activando la Respuesta a Proteínas mal Plegadas o UPR por sus siglas en inglés (*Unfolded Protein Response*) (Rojas-Benítez y Cols., 2013).

Un trabajo posterior acerca de *Kae1* mostró por primera vez en un modelo no microbiano que esta proteína es requerida para la síntesis de t(6)A, y cómo la pérdida de función lleva a una reducción en el tamaño de los animales. En esta publicación también se logró probar el rol de los ARNt en la traducción más allá de ser moléculas adaptadoras, descubriéndose que el factor limitante para el crecimiento celular y animal es la proporción de ARNt de iniciación (AUG) modificado versus el no modificado. También se demostró que regulando los niveles de *Kae1* se altera la actividad de TOR (Rojas-Benítez y Cols., 2015). Estos datos en conjunto dan cuenta de cómo la modificación t(6)A determina el potencial de crecimiento de los animales. Recientemente el grupo de Erick Lai corroboró el rol de *Kae1* en la síntesis de t(6)A mediante una serie de alelos mutantes para este gen (Lin y Cols., 2015).

En lo que respecta a *Pcc1*, aún no hay estudios publicados en animales. Tampoco existen herramientas disponibles para poder estudiar esta proteína. Por lo que se pretende abordar este tema en el Seminario de Título usando *Drosophila melanogaster* como modelo.

4 HIPÓTESIS

Pcc1 forma parte del complejo KEOPS de *Drosophila melanogaster* y es necesario para su desarrollo

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la relación de Pcc1 con el complejo KEOPS y su rol en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1. Generar las herramientas necesarias para analizar el rol de Pcc1

5.2.2. Establecer si Pcc1 es parte o interactúa con subunidades del complejo KEOPS

5.2.3. Determinar la importancia de *Pcc1* en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Manejo de *Drosophila melanogaster*

Los animales fueron mantenidos a 17°C en viales plásticos con medio de cultivo solido. Los cruces experimentales fueron realizados a 25°C a menos que se indique lo contrario. Las líneas transgénicas utilizadas se detallan a continuación: (UAS-CG14550 IR) (Dickson y Cols., 2007), (UAS PIG-A IR) (Dickson y Cols., 2007), (UAS, PIG-A TRiP) (Keleman y Cols., 2009), (Tub-GAL4) (Bellen, 2012), (Nub-GAL4) (Perkins, 2008), (En-GAL4) (Takeo et al., 2006), (Cg-GAL4/CyO; Xbp1-GFP/TM6b) (Rojas-Benítez, 2013) y (Nos-GAL4, phiC31; attP2) (Transgenic RNAi Project).

6.2 Cultivos Bacterianos

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5a . Los cultivos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) de forma aeróbica a 37°C y a 200 RPM de agitación por 16h.

6.3 Transformación de *E. coli*

Bacterias químicocompetentes fueron incubadas por 30 min en hielo junto con el plásmido deseado. Posteriormente se les dio un shock térmico a 42°C por 1 min. Las bacterias fueron crecidas en 1 ml de medio LB por 1h para finalmente ser plaqueadas en LB con el antibiótico respectivo (ampicilina o kanamicina).

6.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos bacterianos crecidos durante una noche. Para extraer el ADN se utilizó el kit E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.5 PCR y electroforesis

Los PCR fueron realizados en un volumen final de 25 μ L: 20,5 μ L de agua destilada, 2,5 μ L de tampón de reacción 10x, 0,25 μ L de dNTP's 10 mM, 0,5 μ L de cada partidor 10 mM, 1 μ L ADN, 0,25 μ L de polimerasa. El programa utilizado se detalla a continuación:

Denaturación inicial: 5 min a 94°C

25 ciclos de amplificación: 45s a 94°C, 30s a 55°C, 1 min a 72°C

Elongación final: 7 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% por 30 min a 120V en tampón TAE (4,8 g/L TRIS, 1,1 mL/L ácido acético, EDTA 0,1M). Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio y revelados con un transiluminador UV.

6.6 Purificación de bandas desde geles de agarosa

La purificación se realizó utilizando el kit UltraClean® 15 DNA Purification Kit de MO BIO Laboratories de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.7 Análisis *in silico*, diseño y síntesis de Pcc1-GFP, Pig-P-Flag y Reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag

La secuencia del mensajero de *Pcc1/Pig-P* fue obtenida de Flybase.org y analizada con el software Snapgene 2.7 (GSLBiotech LLC). Para el diseño de los partidores se uso el mismo software y la herramienta *online* BLAST (National Library of Medicine) El reportero fue diseñado modificando el mensajero de *Pcc1/Pig-P* para agregarle a Pcc1 en su extremo amino terminal un tag 3xHA y a Pig-P un tag 3xFlag en su extremo carboxilo terminal. La secuencia modifica fue sintetizada por GENEWIZ, Inc.

6.8 Clonamiento de *Pcc1*, *Pig-P* y Reportero HA-*Pcc1*/*Pig-P*-Flag

Pcc1 fue clonado a partir de un vector previamente existente en el laboratorio utilizando los siguientes partidores:

Fd: 5' CACCATGGATGCCACAAATTGCAAATAAACC 3'

Rv: 5' TGGGGAGTCGGAGCTGGAGT 3'

Pig-P fue clonado desde el reportero previamente sintetizado utilizando los siguientes partidores:

Fd: 5' CACCATGCCGGAACACACTCCAGC 3'

Rv: 5' GTTATAATACGCTGTATTTAC 3'

Para ambos genes se incluyó la secuencia "CACCC" en el partidior *forward* ya que es necesaria para la posterior clonación vía Gateway.

Ambos productos de PCR purificados fueron clonados direccionalmente, a través de la secuencia "CACCC" agregada durante el PCR, en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Las reacciones de clonamiento y transformación de bacterias se realizaron según las indicaciones del fabricante. Para el *screening* de colonias, se seleccionaron 5 colonias para cada producto y fueron analizadas mediante PCR. Aquellas colonias que dieron positivo fueron crecidas en medio líquido, se purificó el plásmido y se mandó a secuenciar a "laboratorio de Genética y Biotecnología" de la Universidad de Chile para corroborar la secuencia del fragmento clonado.

Finalmente, las regiones codificantes fueron sub-clonadas a vectores de destino que permiten la expresión de las proteínas mediante el sistema de clonamiento por recombinación Gateway (Invitrogen). *Pcc1* fue clonado en el vector pTWG y *Pig-P* en

el vector pTWF. Las reacciones se realizaron de acuerdo a las direcciones del fabricante (Gateway® LR Clonase® II enzyme mix, Invitrogen).

El reportero fue clonado en el vector pUC57 por GENEWIZ Inc. Durante la síntesis se flanqueo la secuencia del constructo con los sitios de restricción EcoRI y XbaI para su posterior clonamiento. Usando estos sitios de restricción, el reportero fue clonado en el vector pUAST-attB.

6.9 Transformación de la línea germinal de *Drosophila melanogaster*

Para la generación del animal transgénico se utilizó la línea de *Drosophila* Nos-GAL4, phiC31; attP2. Esta mosca expresa la recombinasa phiC31 en la línea germinal y posee un sitio attP2 en el cromosoma 3. Al inyectar embriones con un plásmido que tenga un sitio attB, la recombinasa phiC31 realizará la recombinación entre los sitios attP y attB, integrando el transgén en el genoma.

Para inyectar embriones, se recolectaron huevos de no más de 40 min después de su ovoposición y se decorionaron en 50% hipoclorito de sodio diluido en agua. Los embriones decorionados fueron alineados, desecados, cubiertos con aceite mineral (Halocarbon oil 700, Sigma-Aldrich) y microinyectados en la región posterior con una solución de plásmido en agua 500 ng/μl.

Cada macho obtenido de los embriones inyectados se cruzó individualmente con hembras w^{1118} de ojos blancos. Debido al marcador w^+ del plásmido pUAST-attB, aquellos descendientes de los cruces individuales que sean transgénicos se podrán reconocer por tener ojos rojos.

6.10 Curvas de crecimiento

Se recolectaron 20 larvas de los genotipos deseados de 72h +/- 12h y se dejaron en viales de comida fresca. Las larvas se dejaron a 25°C y se cuantificó el tiempo al cual entraban en pupación.

6.11 Montaje de alas adultas y fotografía de alas y larvas

Hembras adultas provenientes de larvas crecidas a 29°C se fijaron en etanol 95% por al menos 1h. Posteriormente se removió el ala derecha de cada mosca y se montó en una solución de etanol: ácido láctico 1:1. Las alas montadas fueron fotografiadas utilizando una lupa Nikon SMZ800 acoplada a una cámara y el *software* Micrometrics SE Premium 4.

Para fotografiar larvas, se seleccionaron larvas estadio 3 y se adhirieron a un portaobjetos mediante cinta adhesiva de doble faz. Para sacar las fotografías se usó el mismo sistema descrito para fotografiar las alas.

La manipulación de las imágenes se llevó a cabo usando el *software* Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc.).

6.12 Inmunohistoquímica

Larvas estadio 3 fueron disectadas en PBS, fijadas 20 min en PFA 4%, lavadas con PBT al 0,3% (1xPBS con Tritón X-100 al 0.3%) 3 veces por 5 min. El bloqueo se realizó con BSA al 1% en PBT. Los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo durante la noche a 4°C. A continuación se lavaron los anticuerpos primarios 3 veces con PBT por 15 min, se volvió a bloquear por al menos por 1h y se incubó con anticuerpo secundarios pertinentes y faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) cuando corresponda durante la noche a 4°C. Finalmente se incubó con TO-PRO-3 (Invitrogen)

por 20 min y se lavó nuevamente 3 veces con PBT por 15 min. Las muestras fueron montadas en medio para fluorescencia Vectashield (Vector Labs).

La visualización de las muestras se llevó a cabo en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta. Para el análisis de las imágenes se utilizaron los software ImageJ y Photoshop CS6.

Los anticuerpos y tinciones usadas se detallan a continuación:

Anti-HA.11 Mouse (BioLegend) 1:500.

Anti-Flag Rabbit (Sigma-Aldrich) 1:1000.

Alexa Fluor 488 anti-Mouse y Alexa Fluor 568 anti-Rabbit (ThermoFischer Scientific) 1:100.

Faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) 1:100.

TO-PRO-3 (Invitrogen) 1 μ M.

6.13 Cultivo y transfección de células S2R+

Las células S2R+ fueron cultivadas en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los cultivos se mantuvieron a 25°C. Para la transfección se utilizó Effectene Transfection Reagent (Quiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los vectores utilizados corresponden a los siguientes:

pTWF-Prpk, pTWG-Pcc1, pTWF-Pig-P, pUAST-Reportero Pcc1/Pig-P y pdc2GAL4.

6.14 Extracción de proteínas, Co-inmunoprecipitación y Western Blot

Por cada cruce se colectaron 10 larvas de estadio 3 en PBS frío y se homogenizaron mecánicamente en 200 μ l de tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40,

0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris-Cl pH 8) con 2 - 5 μ l mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Invitrogen). Se incubó a 4°C durante media hora y se centrifugó a 15000 x g durante 30 min a 4°C.

La extracción de proteínas a partir de células S2R+ se hizo usando tampón de lisis (EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, Glicerol 5%, Tris 25 mM y NaCl 150 mM, pH 7.4). Se centrifugó 2 veces a 15000 x g durante 30 min a 4°C.

Se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante por el método colorimétrico de Bradford, utilizando BSA como estándar para la curva de calibración.

Para la co-inmunoprecipitación se utilizó el kit GFP-Trap (ChromoTek) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Los experimentos se realizaron a partir de 150 μ g de proteína inicial.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. El gel concentrador se preparó al 5% y el gel separador al 12% de acrilamida: bis-acrilamida. Se cargaron 50 μ g de proteína o toda la muestra en el caso de la co-inmunoprecipitación por carril.

El gel se sometió a electroforesis en tampón de corrida (30,3 g/L Tris Base, 144,2 g/L Glicina, 0,1% SDS) a 75V por 15 min, y luego a 110V hasta antes de que el frente de corrida alcanzara el término del gel. La transferencia se realizó a 300 mA durante 2h en tampón de transferencia (30,3 g/L Tris Base, 144,2 g/L Glicina, 20% v/v metanol) a 4°C utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m. La membrana se bloqueó con BSA al 5% en TBS (80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 30 g/L Tris Base, pH 8) con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) durante 1h a temperatura ambiente con agitación constante. Las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario disuelto

en BSA 3% en TBS-T a 4°C con agitación constante. Al día siguiente se lavó tres veces durante 5 min con TBS-T, y se incubó con el anticuerpo secundario disuelto en BSA 3% en TBS-T durante 2h a temperatura ambiente con agitación constante, luego se lavó tres veces durante 15 min con TBS-T. El revelado de las membranas se realizó con quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

7 RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* de *Pcc1*

Como se mencionó anteriormente, 3 de los componentes del complejo KEOPS están presentes en *Drosophila*. El homólogo de *Pcc1* en *Drosophila* corresponde al gen *CG42498* ubicado en el locus 96F10-96F10. En ese mismo locus se ubica un segundo gen, *CG14550*, Figura 6A. *CG14550* es el homólogo de *Pig-P*, una subunidad de un complejo involucrado en la síntesis de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), una modificación post traduccional de proteínas, Figura 6A. De acuerdo a la estructura del gen, *Pcc1* corresponde a un marco de lectura abierto río arriba (uORF por sus siglas en ingles) del marco abierto de lectura principal (mORF por sus siglas en ingles), *CG14550*. Los uORF corresponden a pequeñas secuencias codificantes presentes en alrededor del 50% de los mensajeros en mamíferos, que cumplen funciones regulatorias en la traducción de proteínas. Normalmente los péptidos de alrededor de 70 aminoácidos son rápidamente degradados, (Barbosa Y Cols., 2013). Sin embargo, en algunos casos, los uORF codifican para proteínas funcionales (Hayden y Cols., 2008). En la Figura 6B se puede observar la estructura del mensajero que codifica para ambas proteínas. Cabe destacar que en la base de datos no se tiene registrado una región 3'UTR para *Pig-P*.

En lo que respecta a *Pcc1*, no se encuentran herramientas para poder estudiar su función. Sin embargo, para *Pig-P* existe descrito un ARN de interferencia (ARNi), Figura 6B. Esta herramienta permite realizar un *knock down* de ambas proteínas.

7.2 Generación de Herramientas para estudiar los genes *Pcc1/Pig-P*

Si bien, se disponía de un ARN de interferencia que permitía realizar una aproximación inicial al rol de *Pcc1/Pig-P* en el desarrollo de *Drosophila*, fue necesario generar constructos para estudiar la participación de Pcc1 en el complejo KEOPS. Como no existe anticuerpos comerciales para Pcc1, se diseñó una proteína de fusión a un tag que sí pudiera ser reconocido. Para esto se construyó un vector mediante la tecnología Gateway que permite la expresión de Pcc1 fusionado a la proteína fluorescente verde (Pcc1-GFP) utilizando el sistema UAS/GAL4. La región codificante de *Pcc1* fue clonada e insertada en el vector pTWG. En este vector, el inserto queda río abajo de la secuencia UAS y en el mismo marco de lectura que GFP en su extremo carboxilo terminal. La proteína de fusión tiene un peso de alrededor de 40 kDa, 12.5 kDa provenientes de Pcc1, 27 kDa de GFP y el resto corresponde a una pequeña secuencia que actúa de puente entre Pcc1 y GFP. Utilizando la misma metodología, también se construyó un vector para expresar Pig-P fusionado a un tag Flag. Esta proteína de fusión tiene un peso de 21 kDa (18 kDa Pig-P y 3 kDa el tag Flag junto con la secuencia puente). Figura 7A.

Considerando la estructura del mensajero de *Pcc1*, se diseñó un constructo artificial que consiste en el mensajero completo, incluidas las regiones no codificantes, con ambas proteínas fusionadas a un tag diferente como se muestra en la Figura 7A. En este caso las proteínas de fusión tienen un peso de 16 y 21 kDa respectivamente. Este constructo fue diseñado como un reportero de traducción para analizar que proteínas estaban siendo sintetizadas a partir del ARNm.

Una vez generados todos los constructos, se utilizó la línea celular S2R+ para comprobar la correcta expresión de las proteínas de fusión. Las células fueron co-transfectadas con los vectores descritos junto a un vector que expresa de manera

constitutiva GAL4. Después de 2 días de realizada la transfección se extrajo proteínas y se analizó la expresión de las proteínas mediante WB contra los diferentes tags. Tanto para los constructos Pcc1-GFP y Pig-P-Flag se detectó la marca en el peso correspondiente a cada proteína de fusión. Para el caso del reportero de traducción, se encontraron ambas proteínas presentes en el extracto, Figura 7B.

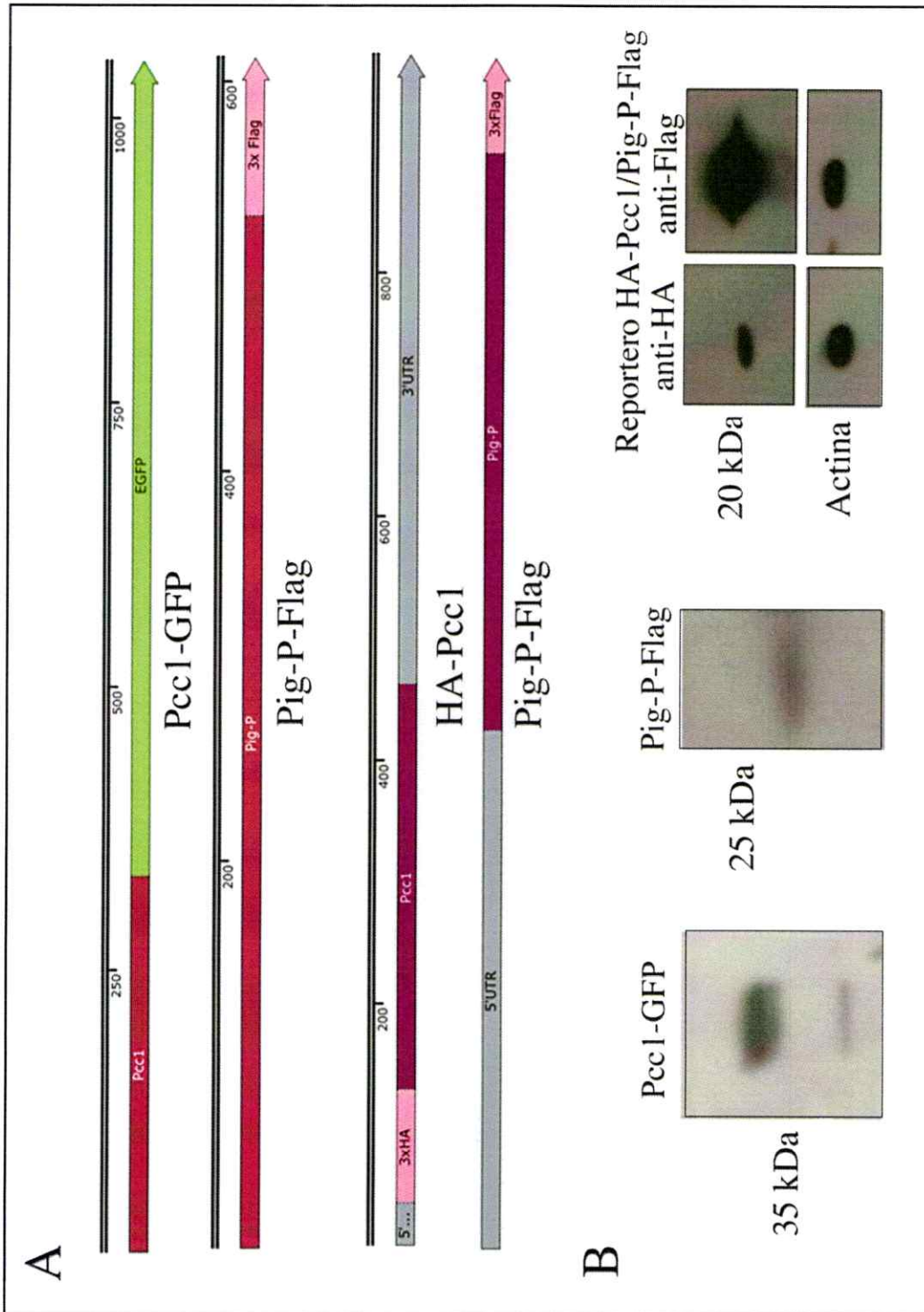


Figura 7. Constructos generados y su expresión en células S2R+. (A) Esquema de los constructos generados durante el Seminario de Título. (B) Western Blot de extractos de proteínas obtenidos a partir de células S2R+ transfectadas con los vectores generados.

7.3 Participación de Pcc1 en el complejo KEOPS

El complejo KEOPS se ha descrito ampliamente en microorganismos. En nuestro laboratorio se demostró previamente que había una interacción física entre Kae1 y Prpk. Ahora, teniendo la posibilidad de expresar Pcc1-GFP, analizamos si esta proteína también forma parte del complejo. Suponiendo una conservación de la estructura del complejo descrita para levadura (Zhang y Cols., 2015) en la Figura 8A se muestra un esquema de como estaría conformado el complejo KEOPS de *Drosophila*. Nuevamente usando las células S2R+ como modelo, se co-transfectaron con el vector Pcc1-GFP y un vector generado anteriormente en el laboratorio para expresar la proteína de fusión Prpk-Flag. Con extractos de proteína obtenidos a partir de estas células se realizó una inmunoprecipitación utilizando anti-GFP y después un Western Blot para determinar si Prpk-Flag fue co-inmunoprecipitado junto con Pcc1-GFP. Efectivamente se pudo detectar Prpk en el co-inmunoprecipitado. Esto muestra que en este sistema heterólogo existe una interacción entre ambas proteínas, Figura 8B.

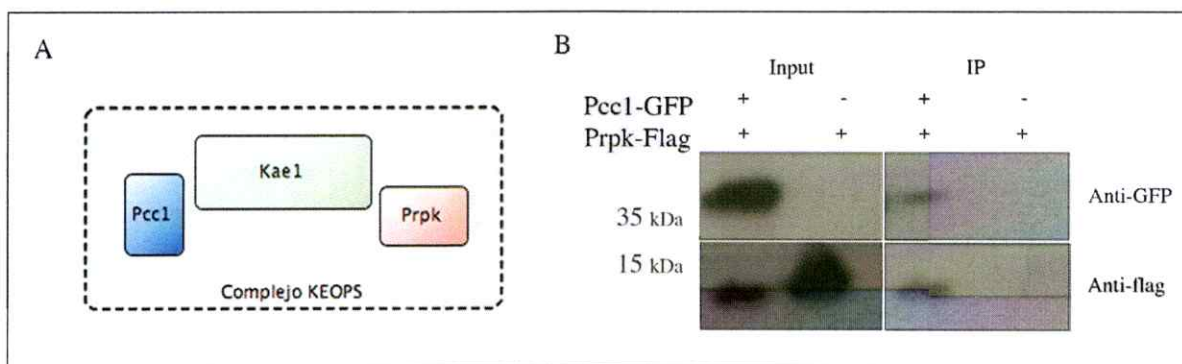


Figura 8. Pcc1 interactúa con el complejo KEOPS. (A) Esquema más probable de la estructura del complejo KEOPS en *Drosophila*. (B) Co-inmunoprecipitación de Prpk-Flag con Pcc1-GFP en células S2R+.

7.4 Efectos del *knock down* de *Pcc1/Pig-P* en el desarrollo de *Drosophila*

Utilizando la cepa comercial que permite la expresión de un ARNi contra *Pcc1/Pig-P* (v4271, Vienna Drosophila Resource Center) se evaluó el efecto del silenciamiento de estas proteínas sobre el desarrollo de los animales. Para ver si efectivamente esta herramienta era capaz de disminuir los niveles de las proteínas, se expresó este interferente en conjunto con el reportero HA-*Pcc1/Pig-P*-Flag. Mediante WB se pudo ver que efectivamente el ARNi generaba una situación de pérdida de función. Los niveles de *Pcc1* bajaron aproximadamente a un 30%, mientras que los de *Pig-P* disminuyeron prácticamente a 0. (Fig. 9)

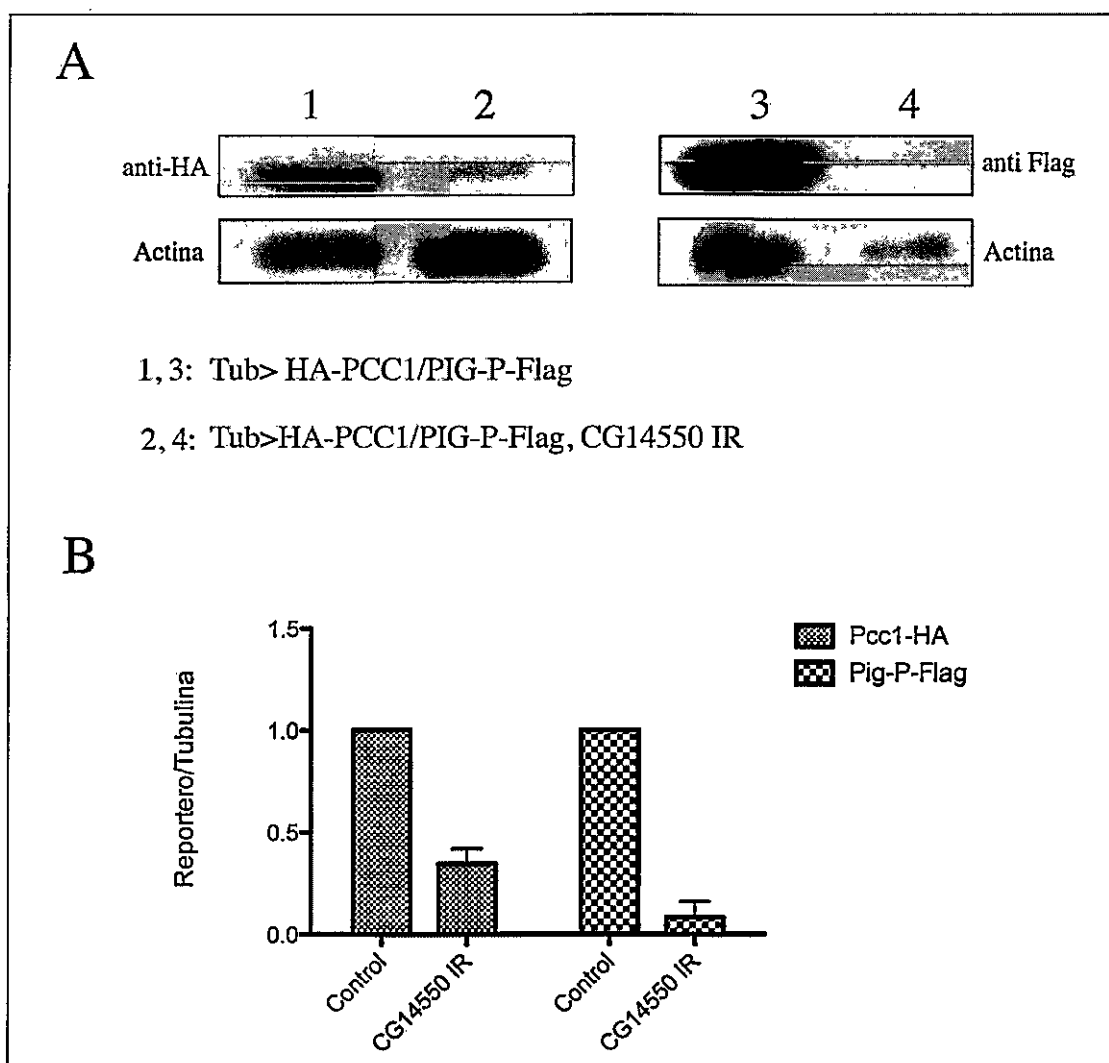


Figura 9. Eficiencia del ARNi contra *Pcc1/Pig-P*. (A) Western Blot a partir de larvas que solo expresan el reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag y de larvas que co-expresan el reportero junto al ARNi contra estos genes. (B) Cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas normalizadas por actina. N=2

Al reducir los niveles de las proteínas en los animales completos usando un *driver* ubicuo, Tub-GAL4, se observan evidentes problemas en el desarrollo. Las larvas logran alcanzar un tamaño normal, sin embargo, el tiempo requerido para esto aumenta, pasando de ser de alrededor de 7 días (larva control) a 10 días. Además, es posible observar la aparición de tumores melanóticos compuestos por células sanguíneas denominadas hemocitos (Dearolf, 1998) (Figura 10A, círculo rojo). Efecto que también ocurre al disminuir los niveles de los otros componentes del complejo KEOPS. Bajo la condición experimental, las larvas son capaces de pupar pero no generan individuos adultos. En algunos casos los animales mueren incluso antes de formar la pupa. Figura 10A y B.

Aprovechando las ventajas del sistema UAS/GAL4, se limitó la expresión del interferente usando el *driver* Nub-GAL4. Este driver tiene una fuerte expresión en el disco imaginal de ala, en particular en la región que dará origen al ala adulta. De esta forma es posible ver el fenotipo generado por la falta de función en la estructura de una mosca adulta. Como se muestra en la Figura 10C, el ala de las moscas con expresión del ARNi se encuentran atrofiadas (C` en comparación al ala control C).

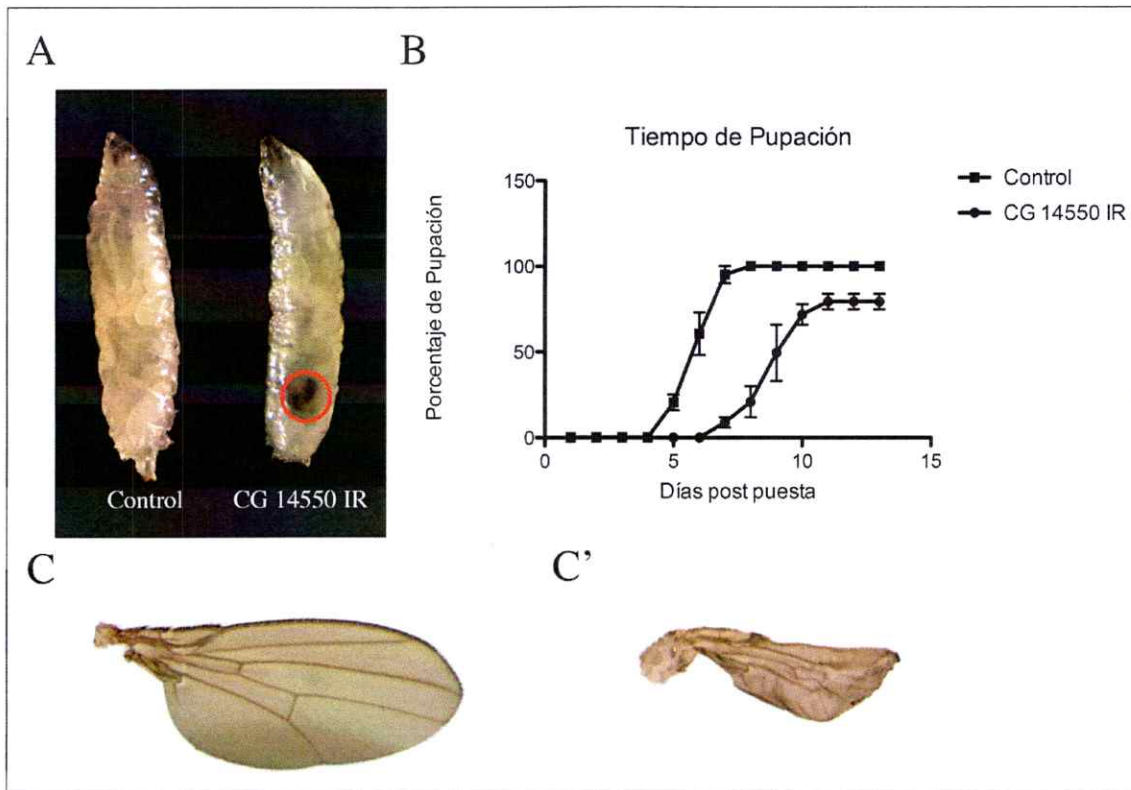


Figura 10. Efecto del knock down de *Pcc1/Pig-P* en el desarrollo de *Drosophila*. (A) Larvas con expresión de ARNi alcanzan tamaño normal a los 10 días y generan tumores melanóticos (círculo rojo). (B) Cuantificación del tiempo que demoran las larvas en pupar. (C, C') Comparación entre alas control (C) y alas de moscas con expresión del ARNi (C')

7.5 Rol de Pcc1/Pig-P en la síntesis de proteínas

Previamente se ha demostrado en el laboratorio que tanto Kae1 como Prpk son necesarios para la correcta síntesis proteica y en condiciones de pérdida de función de estas proteínas se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

En el laboratorio se dispone con una mosca para evaluar la activación de una de las vía de UPR, la vía dependiente de Ire1. Esta mosca permite la expresión de un mensajero de Xbp1 fusionado a GFP (Xbp1::GFP). En condiciones normales, el mensajero de Xbp1 no es traducido a una proteína debido a la presencia de un pequeño intrón. Bajo estrés de retículo, el sensor Ire1 se activa y es capaz de procesar el mensajero de forma no convencional removiendo este intrón. El ARNm resultante si codifica para Xbp1 funcional, en este caso Xbp1::GFP (Ryoo y Cols., 2007), Figura 11A.

Si se expresa el constructo Xbp1::GFP en cuerpo graso, usando el *driver* Cg-GAL4 en condiciones *WT* no se ve señal GFP, dando cuenta que Ire1 no está activo en estas células. Cuando co-expresamos el constructo junto al interferente contra *Pcc1/Pig-P* si se detectó señal GFP, lo que revela la inducción de UPR, Figura 11B.

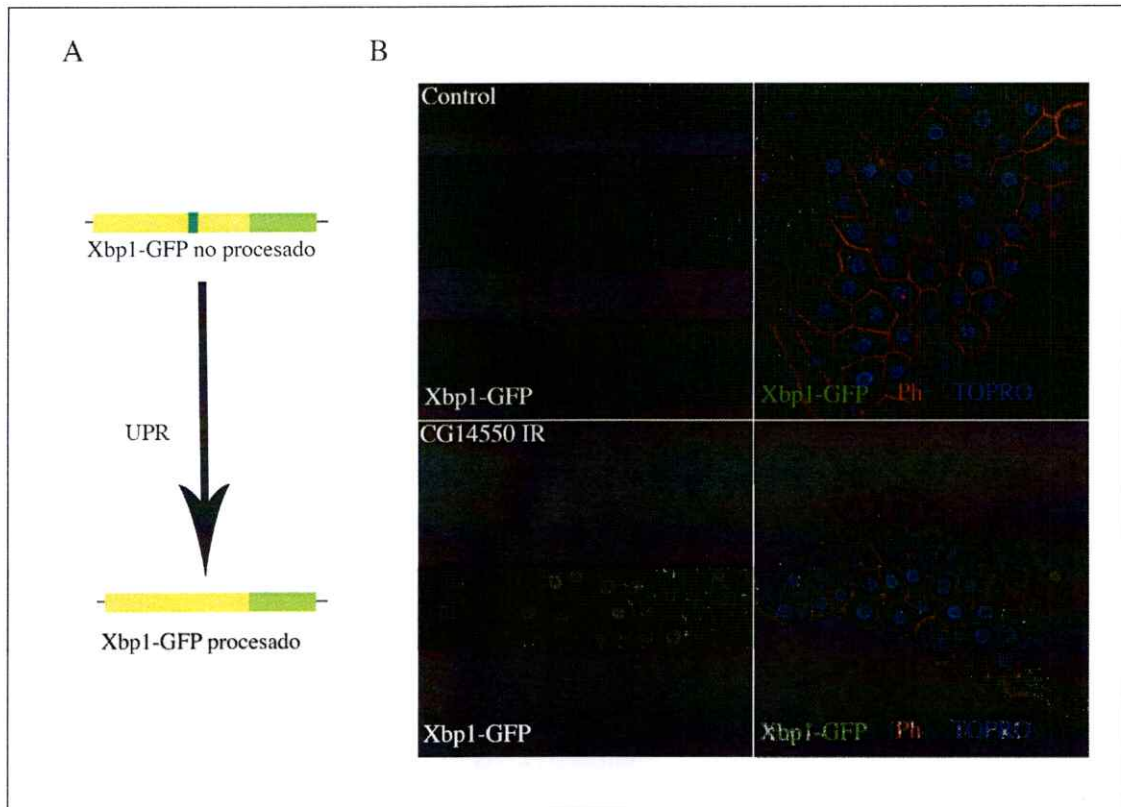


Figura 11. Knock down de *Pcc1/Pig-P* induce activación de UPR. (A) Esquema de funcionamiento del constructo Xbp1::GFP. **(B)** Cuerpo graso teñido con Faloidina-TRITC (Ph, canal rojo) y TO-PRO-3 (canal azul). Solo se detecta señal GFP cuando es expresado el ARNi contra *Pcc1/Pig-P*.

7.6 Patrón de expresión del Reportero HA-Pcc11/Pig-P-Flag

Una de las ventajas de *Drosophila* es la facilidad con la cual se pueden generar animales transgénicos. Durante el desarrollo del Seminario de Título se alcanzó a generar un animal transgénico a partir de uno de los vectores construidos, el cual permite la expresión del reportero de traducción de HA-Pcc1/Pig-P-Flag.

Como el constructo se encuentra río abajo de la secuencia UAS, es posible inducir su transcripción utilizando el sistema UAS/GAL4. Para analizar la traducción de ambas proteínas se utilizó el *driver* En-GAL4. Este *driver* se expresa en las regiones correspondientes a la parte posterior de los tejidos, en particular se utilizó el disco imaginal de ala. En la figura 12A se muestra un esquema de su ubicación en la larva y su estructura.

Al expresar el reportero con En-GAL4, es posible realizar inmunohistoquímica contra los tags de ambas proteínas. Como el *driver* solo se expresa en la región posterior, la región anterior sirve como tejido control. En la Figura 12B se muestra un disco imaginal de ala en que se muestra el patrón de expresión de *En* mediante inmunohistoquímica contra esta proteína. Al sobreexpresar el reportero usando En-GAL4 y realizar inmunohistoquímica contra HA y Flag se puede ver que al igual que en el caso de las células S2R+, tanto Pcc1 como Pig-P están siendo traducidas a partir del mensajero (Figura 12C).

Al expresar el reportero con el *driver* ubicuo Tub-GAL4, se pudo apreciar el patrón de traducción en distintos tejidos. En particular llama la atención el disco imaginal de ojo-antena. Nuevamente se puede ver en la figura 12A la localización de

este tejido en la larva y su estructura. Este disco consta de dos regiones bien definidas, células que se encuentran en proliferación que se pueden identificar mediante la marca contra Atonal (Figura 12D, canal verde) y células que están en proceso de diferenciación o ya diferenciadas en fotorreceptores, caracterizadas por la expresión de Elav (Figura 12D, canal rojo). En este tejido, tanto Pcc1 como Pig-P son sintetizados en las células en proliferación, pero en aquellas células diferenciadas se observó una clara disminución de Pcc1 en comparación a la región proliferativa, mientras que los niveles de Pig-P se mantienen relativamente constantes (Figura 12E).

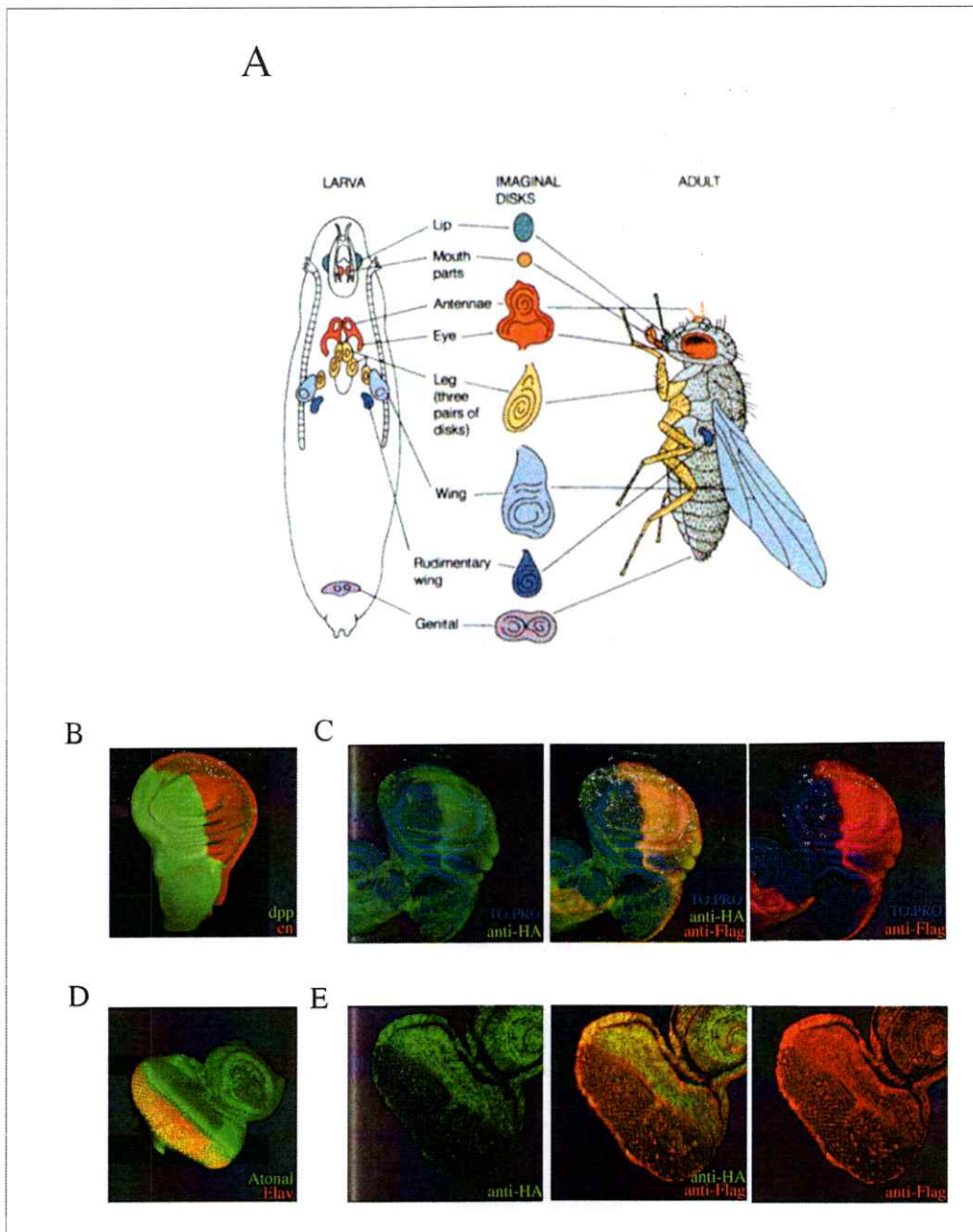


Figura 12. Traducción del Reportero HA-Pcc1/Pig-P-Flag en distintos tejidos. Inmunohistoquímica contra HA (canal verde) y Flag (canal rojo) de discos imaginales de ala y ojo-antena. **(A)** Esquema de los discos imaginales de la larva y los tejidos que generan en el adulto. **(B)** Inmunohistoquímica de disco imaginal de ala contra *en* (rojo) marcando la región posterior del disco y *dpp* (verde). Modificado de Pérez-Garijo y Cols., 2009. **(C)** Expresión del reportero usando En-GAL4 muestra que ambas proteínas son traducidas a partir del mensajero. HA-Pcc1 en canal verde y Pig-P-Flag en canal rojo **(D)** Inmunohistoquímica de disco imaginal de ojo-antena mostrando la región proliferativa (atona, canal verde) y la región diferenciada (Elav, canal rojo), modificado de Tare y Cols., 2011. **(E)** Disco imaginal de ojo-antena con expresión ubicua del reportero usando Tub-GAL4. Los niveles de la proteína Pcc1 decaen al comparar los niveles de la región proliferativa con la diferenciada mientras que los de Pig-P se mantienen constantes.

8 DISCUSIÓN

En este trabajo se generaron distintas herramientas para empezar a entender el rol de *Pcc1* y su importancia en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Una vez que se obtengan los animales transgénicos, los constructos *Pcc1*-GFP y *Pig*-P-Flag permitirán estudiar los efectos de cada proteína por separado y cuál es su verdadero aporte a los fenotipos observados con el ARNi. Es necesario considerar que los tags, sobre todo GFP debido a su tamaño en relación a *Pcc1*, podrían interferir con la función endógena de la proteína (Skube y Cols., 2010). Sin embargo, se ha visto que si se le añade una secuencia que distancie el tag de la proteína, como es el caso en la metodología Gateway, el tag deja de interferir (Hammond y Cols., 2010). En cuanto al reportero de traducción, si se analiza la secuencia anotada del mensajero, en particular usando *Pig-P* como gen de referencia, se observa que no tiene descrito un 3'UTR. El vector en el que se insertó el reportero añade a la secuencia una señal de poliadenilación fuerte (proveniente del SV40). Se ha reportado que el 3'UTR está involucrado en la estabilidad de los mensajeros, ya que esta región, por ejemplo, es blanco de miARN (Bartel, 2004). Por esta razón, el reportero no tendrá el mismo comportamiento que el mensajero endógeno. A pesar de esto, se podrá usar para estudiar el reconocimiento de los ATG bajo distintas condiciones. Considerando que *Pcc1* corresponde a un uORF, sería interesante generar un reportero similar al descrito en este trabajo pero que contenga mutado el codón de inicio de *Pcc1* y ver como esto repercute en la síntesis de *Pig*-P.

La estructura del complejo KEOPS está ampliamente descrita en microorganismos (Mao y Cols., 2008; Perrochia y Cols., 2013 [b]; Zhang y Cols., 2015). Previamente en el laboratorio se ha demostrado que *Kae1* y *Prpk* interactúan entre sí. Ahora

mostramos que existe una interacción entre Pcc1 y Prpk mediante una co-IP. Esto sugiere que la estructura del complejo KEOPS está conservada en *Drosophila* y se encuentra compuesto por los 3 homólogos presentes en el genoma de la mosca. Sin embargo, la técnica utilizada no permite dilucidar más detalles acerca de la estructura del complejo, solo permite decir que existe una interacción (directa o no) entre Pcc1 y Prpk. Considerando la estructura del complejo descrita en microorganismos (Perrochia y Cols, 2013 [b]), es altamente probable que la interacción entre Pcc1 y Prpk este mediada por Kae1. Para demostrar esto con las herramientas disponibles, es necesario repetir el experimento de co-IP, pero esta vez en una situación de pérdida de función de Kae1. Si efectivamente la interacción entre Pcc1 y Prpk esta dada por Kae1, ésta se debería perder bajo estas condiciones.

Los fenotipos de problemas en el desarrollo provocados por el ARNi se asemejan a los observados previamente en el laboratorio con respecto a *Kae1* y *Prpk*, tanto en lo que respecta a desarrollo como en la activación de UPR (Rojas-Benítez y Cols, 2015; Rojas-Benítez y Cols., 2013; Ibar y Cols., 2013). Por otro lado, se pudo observar la aparición de tumores melanóticos en las larvas con expresión del interferente, fenómeno que igualmente hemos observado para la pérdida de función de las otras subunidades del complejo KEOPS. El grupo de Erick Lai también describió la aparición de estos tumores en animales mutantes para *Kae1* (Lin y Cols., 2015). La aparición de estos tumores se puede relacionar con problemas en la proliferación celular, en particular en los tejidos imaginales (Dearolf, 1998). Todos estos resultados y el requerimiento diferencial de Pcc1 por células en proliferación sugieren fuertemente que los fenotipos observados son causados por la pérdida de función de *Pcc1* y su rol asociado al complejo KEOPS. Una disminución en la actividad del complejo lleva a una

falta de ARNts modificados provocando fallas en la síntesis de proteínas (activación de UPR), causando finalmente problemas globales de desarrollo. Sin embargo, no es posible descartar una posible contribución de *Pig-P*. Como *Pig-P* es una subunidad de un complejo encargado en la síntesis de GPI (Kinoshita, 2014), se trabajó con 2 ARNi contra la unidad catalítica de dicho complejo, *Pig-A*. La expresión de estos interferentes no generaron un fenotipo visible, tanto con expresión ubicua como solo en disco imaginal de ala (Fig. sup. 1). La ausencia de fenotipo para la pérdida de función de *Pig-A* refuerza la idea que es *Pcc1* el responsable de los fenotipos producidos. Sin embargo, en este caso no se pudo probar la eficiencia de estas herramientas, por lo que la ausencia de fenotipo puede deberse simplemente a la ineficacia de estos constructos en reducir los niveles de la proteína blanco. Para poder discernir el responsable de los fenotipos, es necesario generar las moscas transgénicas que permitan realizar ganancias de función de *Pcc1* y *Pig-P*. De esta forma se podrán realizar experimentos de rescate con cada proteína individualmente. En particular nos interesa generar la mosca *Pcc1*-GFP. Si este constructo es capaz de rescatar los fenotipos producidos por el interferente contra *Pig-P* mostrará claramente que es la pérdida de función de *Pcc1* la que produce los problemas de desarrollo. Un rescate sobreexpresando *Pig-P* no necesariamente implica que se está recuperando la función. Como el interferente esta dirigido contra esa región, la sobreexpresión puede simplemente estar titulando el ARNi. En cambio, *Pcc1* no tiene ninguna región complementaria de homología con el ARNi, por lo que si rescata el fenotipo, es efectivamente porque es el gen responsable.

En cuanto al reportero de traducción, fue de especial interés el patrón de traducción del reportero en el disco imaginal de ojo-antena. Las diferencias de los

niveles de *Pcc1* en las células en proliferación y diferenciadas está mostrando en que medida el codón de inicio de *Pcc1* esta siendo reconocido por la maquinaria de traducción. Un punto interesante de mencionar es que la población de ARNts en células en proliferación y diferenciadas son distintas. Por ejemplo, el codón de inicio de metionina se encuentra en niveles mucho más elevados en células en proliferación que en aquellas que están diferenciadas favoreciendo el reconocimiento de codones AUG y la síntesis proteica (Gingold y Cols., 2014). Recientemente, el grupo de Erick Lai demostró que la expresión de un ARNi contra *Kae1* en todo el disco imaginal de ojo-antena genera evidentes problemas en el desarrollo del tejido. Sin embargo, si la expresión se limita a la zona correspondiente a los fotoreceptores, estas células no se ven afectadas (Lin y Cols., 2015). Datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que los niveles del mensajero de *Kae1* son altos en la zona proliferativa y decaen en la diferenciada. Estos resultados se relacionan con lo observado durante este trabajo. Células que tienen una menor cantidad de ARNts de iniciación requieren una menor cantidad de t(6)A, y por ende de actividad del complejo KEOPS. Los menores niveles *Kae1* están en concordancia con esto y explicarían el decaimiento en la síntesis de *Pcc1* en los fotoreceptores. Esto plantea que el producto del mismo complejo KEOPS podría estar autoregulado los niveles de sus componentes. En tejidos en los cuales se requiera niveles elevados del complejo, aumentando el nivel de *Kae1* podría llevar a un aumento en los niveles de *Pcc1*, favoreciendo la actividad del complejo KEOPS. Como trabajo futuro, se podría dilucidar este punto usando herramientas ya existentes en el laboratorio. Utilizando el reportero generado durante este seminario y animales que permiten realizar ganancia y pérdida de función de *Kae1* y *Prpk* permitiría analizar los efectos de estas proteínas sobre el reconocimiento de los codones de inicio y la traducción de proteínas codificadas por el reportero. Por otro lado, sería interesante

utilizar técnicas como *Ribosome Profiling* para detectar que inicios de traducción están siendo reconocidos y la eficiencia de traducción de los ribosomas (Ingolia, 2014), y las repercusiones que el complejo KEOPS tiene sobre ellas a través de la modificación t(6)A.

9 CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se puede concluir que:

- En células S2R+ Pcc1 interactúa con el complejo KEOPS.
- Pcc1 junto con Pig-P son necesarios para la correcta síntesis de proteínas y desarrollo de *Drosophila melanogaster*.
- El reconocimiento del codón de inicio de *Pcc1* es dependiente del contexto celular en el que se encuentra.

Por último, podemos proponer que el reconocimiento diferencial en los distintos tipos celulares del codón de inicio de *Pcc1* puede ser parte un nuevo mecanismo en la regulación de los niveles de ARNt modificados. Considerando que la modificación es necesaria para el correcto reconocimiento de los codones de inicio y como ésta se relaciona con células en proliferación, el complejo KEOPS y su posible auto-regulación podrían llegar a tener implicancias en enfermedades como el cáncer.

10 REFERENCIAS

- Barbosa C, Peixeiro I, Romão L (2013) Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet* 9(8): e1003529. doi:10.1371/journal.pgen.1003529
- Brand AH, Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118(2):401-15.
- Bellen, 2012.12.7. Personal communication to FlyBase.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2):205-19.
- Dearolf CR. (1998) Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta*. 1998;1377:M13–23.
- Deutsch C, El Yacoubi B, Crécy-Lagard V, Iwata-Reuyl D. (2012) Biosynthesis of Threonylcarbamoyl Adenosine (t⁶A), a Universal tRNA Nucleoside. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M112.344028.
- Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S. (2011) Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Pathol.*, doi: 4(5):476-95.
- Duffy J. (2002). GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist's swiss army. *Genesis*. DOI: 10.1002/gene.10150.
- Gingold H, Tehler D, Christoffersen N, Nielsen M, Asmar, F, Kooistra S, Christophersen N, Christensen L, Borre M, Sorensen K, Andersen L, Andersen K, Hulleman E, Wurdinger T, Ralfkiaer, Helin K, Gronbaek K, Omtoft T, Waszak S, Dahan O, Pedersen J, Lund A, Pilpel Y. (2014). A Dual Program for Translation Regulation in Cellular Proliferation and Differentiation. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.011.
- Greenspan, R.J. Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004.
- Hammond J., Blasius T., Soppina V., Cai D., Verhey K. (2010). Autoinhibition of the kinesin-2 motor KIF17 via dual intramolecular mechanisms. *J. Cell Biol.* Doi: 10.1083/jcb.201001057.
- Hay N, Sonenberg N, (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, doi: 18(16):1926-45.
- Hayden C, Bosco G. (2008) Comparative genomic analysis of novel conserved peptide upstream open reading frames in *Drosophila melanogaster* and other dipteran species. *BMC Genomics*. doi:10.1186/1471-2164-9-61 .
- Hecker A, Graille M, Madec E, Gadelle D, Le Cam E, van Tilbergh H, and Forterre P (2009). The universal Kae1 protein and the associated Bud32 kinase (PRPK), a mysterious protein couple probably essential for genome maintenance in Archaea and Eukarya. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 1): 29–35.

Hiroyuki Hori. (2014). Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Front Genet*; 5: 144. doi: 10.3389/fgene.2014.00144.

Ibar C, Cataldo V, Vásquez-Doorman C, Olguin P, Glavic A. (2013) *Drosophila* p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. *Development*, doi: 10.1242/dev.086918.

Ingolia N. (2014). Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Reviews Genetics*. Doi: 10.1038/nrg3645.

Jenett A, Rubin G, Ngo T, Shepherd D, Murphy C, Dionne H, Pfeiffer B, Cavallaro A, Hall D, Jeter J, Lyer N, Fetter D, Hausenfluck J, Peng H, Trautman E, Svirskas R, Myers E, Iwinski Z, Aso Y, DePasquale G, Enos A, Hulamm P, Lam S, Li HH, Lavert T, Long F, Qu L, Murphy S, Rokicki K, Safford T, Shaw K, Simpson J, Sowell A, Tae S, Yu Y, Zugates C. (2012). A GAL4-Driver Line Resource for *Drosophila* Neurobiology. *Cell Rep*. doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.011.

Keleman, K., Micheler, T., VDRC project members, (2009.8.5). RNAi-phiC31 construct and insertion data submitted by the Vienna *Drosophila* RNAi Center.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. (2003) GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Molecular Cell*, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00114-X.

Kinoshita T. (2014). Biosynthesis and deficiencies of Glycosylphosphatidylinositol. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. doi: 10.2183/pjab.90.130.

Laplanta M, Sabatini DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.

Lin CA, Ellis S, True H. (2010). The Sua5 Protein Is Essential for Normal Translational Regulation in Yeast. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/MCB.00754-09.

CJ, Smibert P, Zhao X, Hu J, Ramroop J, Kellner S, Benton M, Govind S, Dedon P, Sternglanz R, Lai E. (2015). An extensive allelic series of *Drosophila* kae1 mutants reveals diverse and tissue-specific requirements for t6a biogenesis. *RNA*. doi: 10.1261/rna.053934.115.

Dickson, B., Dietzl, G., Keleman, K., VDRC project members (2007.7.18). RNAi construct and insertion data submitted by the Vienna *Drosophila* RNAi Center.

Loewith R, Hall MN. (2011) Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *GENETICS*, doi: 10.1534.

Mao D, Neculai D, Downey M, Orlicky S, Haffani Y, Ceccarelli D, Ho J, Szilard R, Zhang W, Ho C, Wan L, Fares C, Rumpel S, Kurinov S, Arrowsmith C, Durocher D, Sicheri F. (2008). Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Mol Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.002.

Mayer C, Grummt I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, doi: 25(48):6384-91.

Oberto J, Breuil N, Hecker A, Farina F, Brochier-Armanet C, Culetto E, and Forterre P (2009). Qri7/OSGEPL, the mitochondrial version of the universal Kae1/YgjD protein, is essential for mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res* 37(16): 5343–5352.

Pérez-Garijo A., Shlevkov E., Morata G. (2009) The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development*. doi: 10.1242/dev.034017.

Perkins, L.A. (2008.9.25). Additions and corrections for insertions used in the TRiP toolbox.

Perrochia L, Crozat E, Hecker A, Zhang W, Bareille J, Collinet B, van Tilbeurgh H, Forterre P, Basta T. (2013) In vitro biosynthesis of a universal t6A tRNA modification in Archaea and Eukarya. *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gks1287.

Perrochia L, Guetta D, Hecker A, Forterre P, Basta T. (2013) Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t6A tRNA modification. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gkt720.

Rideout EJ, Marshall L, Grewal SS. (2012) *Drosophila* RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNA^{iMet} synthesis and systemic insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.

Rojas-Benítez D, Ibar C, Glavic Á. (2013) The *Drosophila* EKC/KEOPS complex: roles in protein synthesis homeostasis and animal growth. *Fly (Austin)*, doi: 10.4161/fly.

Rojas-Benitez D, Thiaville PC, de Crécy-Lagard V, Glavic A. (2015) The levels of a Universally Conserved tRNA Modification Regulates Cell Growth. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M115.665406.

Roote, J., and Prokop, A. (2013). How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda)* 3, 353-358. Sherr CJ. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2):235-46.

Ryoo H, Domingos P, Kang M, Steller H. (2007). Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *Embo J*. doi: 10.1038/sj.emboj.7601477.

Skube S., Chaverri J., Goodson H. (2010). Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments *in vivo*. *Cytoskeleton (Hoboken)*. doi: 10.1002/cm.20409.

Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, Karzai AW, Sternglanz R. (2011). The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO J*. doi: 10.1038/emboj.2010.343.

Tare M, Modi RM, Nainaparampil JJ, Puli OR, Bedi S, Fernandez-Funez P, Kango-Singh M, Singh A. (2011). Activation of JNK signaling mediates amyloid- β -dependent cell death. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0024361.

Takeo, S., Akiyama, T., Firkus, C., Aigaki, T., Nakato, H. (2005). Expression of a secreted form of Dally, a *Drosophila* glypican, induces overgrowth phenotype by affecting action range of Hedgehog. Dev. Biol. 284(1): 204–218.

Vrailas A., Marendra D., Cook S., Powers M., Lorenzen J., Perkins., Moses K. (2006). *smoothened* and *thickveins* regulate Moleskin/Importin 7-mediated MAP kinase signaling in the developing *Drosophila* eye. Development. doi: 10.1242/dev.02334.

Zhang W, Collinet B, Graille M, Daugeron MC, Lazar N, Libri D, Durand D, van Tilbeurgh H. (2015). Crystal structures of the Gon7/Pcc1 and Bud32/Cgi121 complexes provide a mode for the complete yeast KEOPS complex. Nucleic Acids Res. doi: 10.1093/nar/gkv155.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell, doi: 124(3):471-84. 25227.

11 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

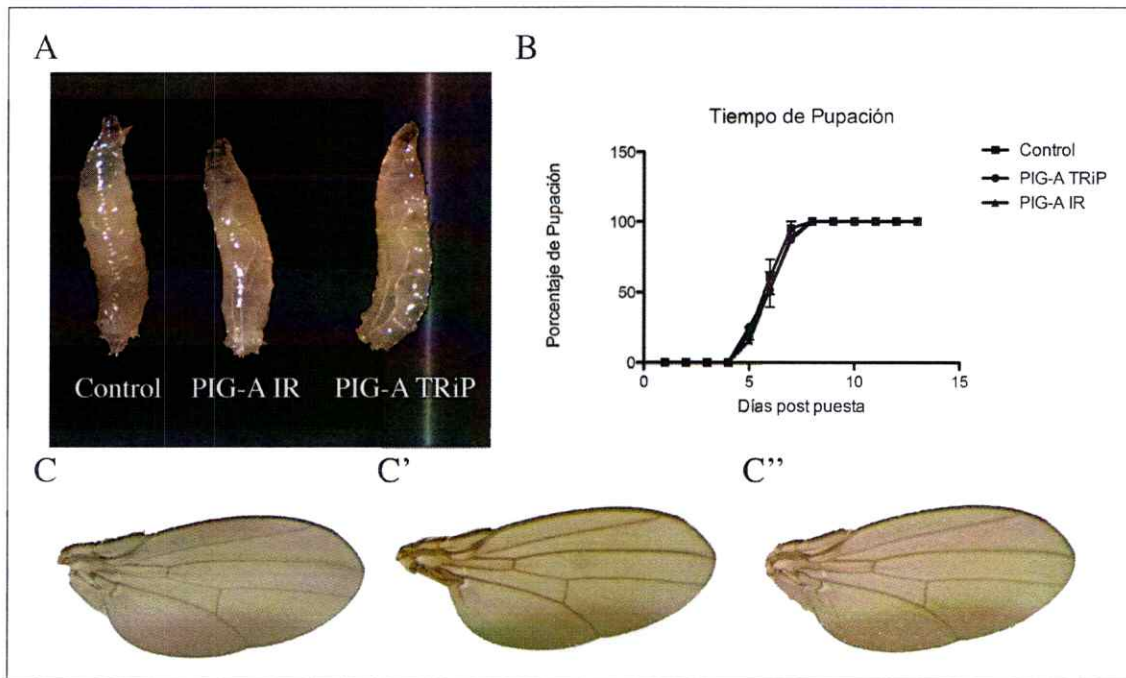


Figura Suplementaria 1. Efecto del knock down de Pig-A. (A) Larvas con expresión de los ARNi contra Pig-A no presentan problemas de desarrollo. (B) Cuantificación del tiempo que demoran las larvas en pupar. (C, C', C'') Comparación entre alas control (C) y alas de moscas con expresión de los interferentes Pig-A IR (C') y Pig-A TriP (C'').