

UCH-FC
DOC-BMAN
1 122
C.1



Relaciones entre el aparato de Golgi y la mitosis: Papel de la golgina p115 en la activación de Cdk1 y el punto de control G2/M de la mitosis en *Drosophila*

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

María Consuelo Ibar Valenzuela

Octubre, 2013

Director de Tesis: Dr. Álvaro Glavic Maurer

Co-Director de Tesis: Dr. Alfonso González de la Rosa



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

María Consuelo Ibar Valenzuela

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día **14 de Agosto de 2013**.

Director de Tesis

Dr. Álvaro Glavic Maurer

Co-Director de Tesis

Dr. Alfonso González de la Rosa

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Allende (Presidente)

Dr. Andrés Couve

Dr. Andrew Quest

Dra. Lorena Norambuena



*"There are known knowns; there are things we know we know.
There are known unknowns; we know there are some things we do not know.
There are also unknown unknowns; we don't know we don't know."
Donald Rumsfeld (Secretario de Defensa de EEUU), 12 Febrero 2002.*

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago en 1982. De padres arquitectos, aprendí primero que era una cercha y de construcción, probablemente mucho antes que de ciencia. Después de un paso difícil por el colegio, escogí la Odontología para poder viajar e ir a pescar varias veces en el año. Algo ahí no funcionó y gracias a un científico, terminé en la carrera de Biología Ambiental en la Universidad de Chile descubriendo que lo macro no era lo mío, lo que me hizo cambiarme a Ingeniería en Biotecnología en la misma universidad, encontrando que la gente más afín a mí trabajaba en ciencia, encontrando amigos que se mantienen hasta el día de hoy. Hice mi memoria de título en un Laboratorio de Biología Vegetal pensando que iba a permanecer ese tema por mucho tiempo, pero el doctorado pasó por mí y descubrí la Biología del Desarrollo, maravillándome. Ahora continuaré mi trabajo en Mecanismos del Crecimiento y Proliferación en *Drosophila*, el trabajo paralelo que mantuve durante esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que contribuyeron con el desarrollo de esta tesis de alguna forma u otra. En especial a Álvaro, por su apoyo infinito en los momentos oscuros y brillantes, por dejar mi cabeza bien amoblada con el maravilloso mundo de la Biología del Desarrollo y compartir esa capacidad de lograr separar un problema en sus partes más simples.

También un agradecimiento especial a Alfonso, por las largas conversaciones acerca de ese organelo aún misterioso para mí, denominado aparato de Golgi, que aún después de dos tesis creo que no logro comprender del todo.

A mis compañeros de laboratorio y a los vecinos: Constanza, Elvis, Diego, Vicente, Nano, Perro Peri y Luis, junto con Óscar, Claudio, Polo, Gabi, Consu y Mario, los cuales en distintas épocas me hicieron reír y hacer que las largas horas de trabajo se hiciesen más cortas. Gracias por los kioscazos y por todas las conversaciones triviales y profundas que tuvimos durante este tiempo.

A mis amigos: Valentina, Andrés y Daniel, por ser mi muralla de contención cuando el cansancio y la frustración me atacaba. Gracias por compartir sus distintas visiones de la ciencia, de los laboratorios y de la vida en general.

A María Rosa Bono y Daniela Sauma, que sin su experiencia en citometría de flujo, tal vez esta tesis no hubiese sido posible.

A las instituciones y personas detrás de ellas, que creyeron en mí de distintas formas: CONICYT, Wellcome Trust y LASDB. Gracias por permitir mostrar el trabajo realizado en Chile y el extranjero, además de permitirme conocer gente que trabaja en diferentes temas con las que aún mantengo contacto y la posibilidad de generar redes en un futuro próximo.

A mi hermano Tomás, que a pesar de estar lejos, me hace reír con las tonteras que hablamos y hacerme tía del más lindo sobrino.

A mis padres: Héctor y Gabriela, por soportarme todo este tiempo...por escucharme a pesar de no entender nada. ¡Los quiero mucho!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
INDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
1. CICLO CELULAR Y PUNTOS DE CONTROL	7
2. HERENCIA DEL APARATO DE GOLGI	8
2.1. Herencia del aparato de Golgi en mamíferos.	9
2.1.1. Golginas y sus efectos sobre la progresión mitótica en mamíferos.....	10
2.1.2. Mecanismo para la fragmentación del aparato del Golgi y su acoplamiento con la entrada en mitosis.	11
2.1.3. p115: proteína de matriz de Golgi (golgina).....	13
2.1.4. Pérdida de la función de las golginas y sus efectos respecto a la formación del huso mitótico.....	15
2.2. El aparato de Golgi en <i>Drosophila</i>	16
2.2.1. Biogénesis del aparato de Golgi en los discos imaginales durante el desarrollo en <i>Drosophila</i>	19
2.2.2. Golginas en <i>Drosophila</i>	20
2.2.3. p115 en <i>Drosophila</i>	20
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23

MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. DROSOPHILA COMO MODELO GENÉTICO	24
1.1. Cromosomas.....	24
1.2. Sistema Gal4/UAS.	26
1.3. Nomenclatura.....	26
2. MATERIALES BIOLÓGICOS.	27
2.1. Animales y su mantención.	27
2.2. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3. REACTIVOS, SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES.	30
3.1. Reactivos.	30
3.2. Soluciones.....	32
3.2.1. Soluciones para métodos de biología molecular.....	32
3.2.2. Soluciones para otros métodos.....	32
3.2.3. Otros materiales.....	32
4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR BACTERIANA.....	33
4.1. Medios y condiciones de cultivo bacteriano.....	33
4.2. Transformación bacteriana.	33
4.3. PCR de colonias.	33
4.4. Extracción de DNA plasmidial.....	34
4.5. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.....	34
4.6. Digestión con enzimas de restricción.....	35
4.7. Construcción de pTHW-HA::p115 (ganancia de función).	35
4.8. Secuenciación de la construcción.....	37
5. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES PARA <i>D. melanogaster</i>.....	37
5.1. Extracción de DNA genómico a partir de individuos adultos.	37
5.2. Extracción de RNA total de larvas.	38
5.3. Síntesis de cDNA y PCR semi-cuantitativa.....	38
5.4. Extracción de proteína total de larvas y discos imaginales.....	39
5.5. Inmunoprecipitación de extractos proteicos.....	40
5.6. Análisis de extractos proteicos mediante inmunoblot.	40
5.7. Inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	41

5.8. Detección de la replicación del DNA a través de bromodeoxiuridina.....	43
5.9. Determinación de la muerte celular a través de TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>).....	43
5.10. Citometría de flujo (Neufeld y col. 1998).....	44
5.11. Obtención de hemocitos larvarios.....	45
5.12. Análisis del tamaño celular en alas adultas.	45
6. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MOSCAS TRANSGENICAS.	46
6.1. Transgénesis por transformación de la línea germinal.	46
6.2. Preparación del DNA y microinyección.	47
6.3. Mapeo cromosómico.....	48
6.4. Expresión regulada de <i>UAS-HA::p115</i> y <i>UAS-p115i</i> mediante el sistema UAS/Gal4.....	49
RESULTADOS.....	54
1. ESTABLECER LOS EFECTOS DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE p115 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA TRANSICIÓN G2/M.....	54
1.1. Evaluación de las herramientas para la pérdida y ganancia de función de p115.54	
1.1.1. Eficacia y especificidad de los RNA interferentes contra p115.....	54
1.1.2. Fenotipos del interferente <i>UAS-p115i^{KK}</i>	55
1.2. Descripción de la localización subcelular de p115.....	57
1.3. Fenotipo celular de p115.....	57
1.4. Fenotipos del interferente contra p115 en diferentes tejidos de <i>Drosophila</i> durante el desarrollo.....	58
1.5. La depleción de p115 produce defectos en proliferación.....	65
1.5.1. Efectos sobre el ciclo celular del interferente contra p115 durante el desarrollo del ala de <i>Drosophila</i>	65
1.5.2. Fenotipos de la ganancia de función de p115 durante el desarrollo del ala de <i>Drosophila</i>	68
1.5.3. Fenotipos de la co-expresión del interferente de p115 con el inhibidor de apoptosis p35.	68

2. DETERMINAR SI LOS EFECTOS SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DEPENDEN DE LA PRESENCIA DE p115, DEFECTOS EN EXOCITOSIS/SECRECIÓN O ESTADO DE FRAGMENTACIÓN DEL GOLGI.....	74
2.1. Defectos en la exocitosis/secreción.....	74
2.2. Defectos en la estructuración del aparato de Golgi.....	76
3. DETERMINAR LAS INTERACCIONES FUNCIONALES DE p115 CON COMPONENTES DE CICLO CELULAR, PRINCIPALMENTE RESPECTO A LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO CDK1/CICLINA B.....	81
3.1. Activación de la progresión G2/M.....	81
3.2. Efectos de la co-expresión de Cdk1 con el interferente de p115.....	82
3.2.1. ¿Cómo la sobreexpresión de Cdk1::myc es capaz de rescatar los fenotipos de falta de p115?	85
3.2.1.1. Niveles de activación de Cdk1 en la condición de reducción de p115.	85
3.2.2. p115 no es necesaria para la formación del huso mitótico en <i>Drosophila</i> .	86
3.2.3. Distribución de las unidades de Golgi en la condición de reducción de p115.	86
3.2.4. Existencia de la interacción física entre Cdk1 y p115.....	87
DISCUSIÓN	91
1. EFECTOS DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE p115 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA TRANSICIÓN G2/M.	92
1.1. Depleción de p115 y su relación con la proliferación celular.....	92
1.2.1. Deficiencias y alelos.....	93
2. PROCESOS EN LOS QUE PUDIERA ESTAR INVOLUCRADO p115.....	94
2.1. Exocitosis y cambios en la estructura del aparato de Golgi.....	94
3. p115 Y LA TRANSICIÓN G2/M.....	96
4. MODIFICADORES DEL FENOTIPO DE p115: PROMOTORES DEL ESTADO ACTIVO DE CDK1.....	98
4.1. Cdk1 (rescate total) y Myt1 (rescate parcial).	98

5. MECANISMOS POSIBLES DEL ACOPLAMIENTO DE LA ACTIVACIÓN DE CDK1 CON EL APARATO DE GOLGI.....	101
5.1. Centrosomas.....	101
5.2. Interacción física entre Cdk1 y p115.....	102
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	106
ANEXO 1: Interferente no específico contra p115 (UAS-p115GD).....	116
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO 2: Análisis de los efectos sobre otras fases del ciclo celular.....	122
1. Activación/Inhibición de la progresión G1/S.....	122
2. Inhibidores de la progresión G2/M.....	124
3. Interacción genética con p53.....	124
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXO 3: Otros genes nuevos identificados en relación al control del tamaño de los organismos: PRPK y Bax Inhibitor-1.	129
BIBLIOGRAFÍA	131

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas UAS de <i>D. melanogaster</i> usadas en la presente tesis.	27
Tabla 2. Cepas Gal4 de <i>D. melanogaster</i> usadas en la presente tesis.	28
Tabla 3. Cepas obtenidas por recombinación meiótica realizadas en la presente tesis	28
Tabla 4. Cepas obtenidas por segregación de cromosomas realizadas en la presente tesis.....	28
Tabla 5. Otras cepas de <i>D. melanogaster</i> usadas en la presente tesis.....	30
Tabla 6. Partidores utilizados en PCRs y/o secuenciación de las construcciones. .	34
Tabla 7. Partidores diseñados para la construcción de la ganancia de función (pTHW HA::p115).	36
Tabla 8. Plásmidos utilizados en esta tesis.....	37
Tabla 9. Partidores utilizados para las PCR semi-cuantitativas.....	39
Tabla 10. Anticuerpos primarios usados en inmunoblot.	41
Tabla 11. Anticuerpos secundarios usados en inmunoblot.....	41
Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.....	42
Tabla 13. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia.	42
Tabla 14. Otros tintes.....	43
Tabla 15. Anticuerpos utilizados en hemocitos.....	45
Tabla 16. Blancos no específicos encontrados en la secuencia de p115 ^{GD} (BLAST contra la secuencia encontrada en VDRC en Flybase).....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Herencia del aparato de Golgi en mamíferos.....	14
Figura 2. Relaciones establecidas entre la fragmentación mitótica del Golgi y progresión de la mitosis en células de mamíferos.....	18
Figura 3. Biogénesis del aparato de Golgi en <i>Drosophila</i> y los posibles efectos de la depleción de niveles de p115.....	22
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Figura 5. Anatomía del ala adulta de <i>Drosophila melanogaster</i>	50
Figura 6. Sistema de transformación binario.....	51
Figura 7. Esquema representativo de la transgénesis en <i>D. melanogaster</i>	52
Figura 8. Esquema simplificado de cruces realizados para mapear los cromosomas en donde ocurrió la inserción del transgen (mapeo cromosómico).....	53
Figura 9. Estructura del locus p115 y RNAs doble hebra utilizados en esta tesis.....	56
Figura 10. Eficacia de silenciamiento del segundo RNA doble hebra (p115 ^{i^{KK}}) sobre los niveles de p115.....	60
Figura 11. Fenotipos del RNA interferente p115 ^{i^{KK}} , de éste en combinación con los alelos en <i>transheterocigosis</i> y por rescate con la construcción HA::p115.....	61
Figura 12. Co-distribución de p115 con aparato de Golgi en diferentes tejidos de <i>Drosophila</i>	62
Figura 13. Fenotipos de la depleción de p115 en hemocitos provenientes de larvas de <i>Drosophila</i>	63
Figura 14. Fenotipos observados en distintos tejidos causados por la depleción de p115 a través de RNA interferente.....	64
Figura 15. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala del tercer estadio depletados de p115 en el compartimiento posterior.....	70
Figura 16. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala del tercer estadio determinados mediante citometría de flujo de discos imaginales que sobreexpresan p115 en el compartimiento posterior.....	71
Figura 17. La reducción del tamaño del tejido causada por la depleción de p115 no es debida a la existencia de muerte celular.....	72

Figura 18. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario que co-expresan el RNA doble hebra contra p115 junto al inhibidor de la apoptosis p35.....	73
Figura 19. La depleción de p115 no afecta la secreción a través de las diferentes unidades de Golgi especializadas en <i>Drosophila</i>	79
Figura 20. Efectos de modificadores de la dinámica del aparato de Golgi sobre la depleción de p115.....	80
Figura 21. Efectos de la modificación en los niveles de reguladores positivos de la activación de Cdk1 (transición G2/M) y sus efectos sobre el tamaño del tejido en alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior.....	83
Figura 22. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario que co-expresan el RNA doble hebra contra p115 junto a la sobreexpresión de una versión etiquetada de Cdk1.....	84
Figura 23. Determinación de la abundancia de forma activa de Cdk1 en discos imaginales controles y depletados de p115 a través de inmunoblot.....	88
Figura 24. La depleción de p115 no produce cambios observables en la formación de los husos mitóticos.....	89
Figura 25. Distribución de las unidades de Golgi en la condición de reducción de p115 y existencia de interacción directa entre Cdk1 y p115 determinada por inmunoprecipitación.....	90
Figura 26. Efectos de la depleción de p115 sobre el ciclo celular y la activación de Cdk1.....	100
Figura 27. Determinación de la eficacia y especificidad del fenotipo del primer RNA doble hebra analizado (p115i ^{GD}).....	118
Figura 28. Efectos de modificadores de la transición G1/S del ciclo celular sobre la depleción de p115.....	125
Figura 29. Efectos de inhibidores de la activación de Cdk1 (transición G2/M) y sus efectos sobre el tamaño del tejido en alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior.....	126
Figura 30. Efectos de la interacción genética con p53 y sus efectos sobre alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior.....	127

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

AL	agar Luria
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
BFA	brefeldina A
BrdU	bromodeoxiuridina
BSA	albúmina de suero bovino
CAK	quinasa activadora de Cdks
Casp3*	caspara-3 clivada (marcador de apoptosis)
Cdk1	quinasa dependiente de ciclina-1 (<i>Cyclin-dependent kinase-1</i>)
cDNA	DNA copia
DN	dominante negativo
dsRNA	RNA doble hebra
ECL	<i>enhanced chemiluminiscence</i>
EDTA	ácido etilendiamintetraacético
ER	retículo endoplasmático
FSC	<i>forward scattering</i>
G1	fase gap-1
G2	fase gap-2
GEF	factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
GM130	<i>Golgi matrix 130</i>
GRASP	proteínas de reensamblamiento y <i>stacking</i> de Golgi (<i>Golgi stacking and reassembly proteins</i>)
GTP	guanosina trifosfato
HA	hemaglutinina
HRP	peroxidasa de rabanito (<i>horseradish peroxidase</i>)
hs-FLP	<i>heat-shock-induced FLP recombinase</i>
kDa	kilo Dalton
LB	medio Luria-Bertani
M	mitosis
NSF	factor sensible a N-etilmaleimida

PBS	solución tampón de fosfato
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
PFA	paraformaldehído
PH3	fosfohistona H3
RNAi	RNA de interferencia
RT-PCR	transcripción reversa a través de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SSC	<i>side scattering</i>
TA	temperatura ambiente
tER	retículo endoplasmático transicional (<i>transitional ER</i>)
TRIP	<i>Transgenic RNAi Project (Harvard Medical School)</i>
TRITC	tetrametil rodamina isotiocianato
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila RNAi Center</i>

RESUMEN

Las células eucariontes tienen organelos derivados de membrana dentro de los cuales se encuentra el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, los cuales les permiten separar y organizar las distintas funciones celulares. Estos organelos tienen que ser mantenidos en las células hijas durante la división celular, generando las preguntas: ¿qué ocurre cuando las células se dividen? ¿se dividen los organelos existentes o nuevas copias son generadas? ¿cómo esto se encuentra acoplado a los mecanismos conocidos de control del ciclo celular?

Nosotros intentamos responder esta última pregunta. Dentro del ciclo celular existen puntos de control, en los cuales la célula verifica a través de mecanismos moleculares si los procesos necesarios para pasar a la siguiente etapa han sido completados. Respecto a esto, se ha propuesto en las células de mamífero, que poseen solo un aparato de Golgi organizado en cisternas, la fragmentación de éste durante la mitosis es un punto de control del ciclo celular en fase G2/M que garantiza su herencia en las células hijas. Esto ha sido mostrado bloqueando la fragmentación del aparato de Golgi, a través de la sobreexpresión u inyección de proteínas de matriz de Golgi (por ejemplo, Grasp65).

Las células de *Drosophila*, a diferencia de las células de mamíferos, presentan múltiples unidades de Golgi. Éstas transitan, durante el desarrollo del organismo, desde estados fragmentados (túbulo-vesiculares) hacia la formación de cisternas (denominadas *stacks* apareados), por un aumento en los niveles de la hormona ecdisona en pupación. Así, la estructura túbulo-vesicular del Golgi, durante el desarrollo de los progenitores de las estructuras adultas de *Drosophila* no impondría un punto de control del ciclo celular para asegurar la herencia de este organelo.

En esta tesis estudiamos la función de la proteína p115, una proteína de matriz de Golgi (golgina) requerida para la formación de los *stacks* apareados y de la estructura de los sitios transicionales del retículo endoplasmático, durante el desarrollo de *Drosophila*. Nos preguntamos si la depleción de esta proteína afecta la secreción/exocitosis y si el cambio de la estructura del aparato de Golgi-sitios tER producida por variaciones en los niveles de esta proteína posee consecuencias sobre el ciclo celular y el crecimiento de los tejidos.

Para responder a estas preguntas se realizaron experimentos de ganancia y pérdida de función *in vivo* utilizando un RNA doble hebra contra p115, para el cual se determinó su efectividad y especificidad, y una construcción que permite sobreexpresar una proteína de fusión. A través del sistema UAS/Gal4 y microscopia confocal, se determinó la proliferación y muerte celular. El ciclo celular se analizó además por citometría de flujo y los niveles activado/total de la quinasa determinante de la transición G2/M, Cdk1, a través de inmunoblot.

Nuestros resultados revelaron que la depleción de p115 en el compartimiento posterior del ala produce una reducción en el tamaño de éste. A pesar de esto, existen más células positivas para marcadores de proliferación (como BrdU y PH3) así como para marcadores de apoptosis (caspasa 3-clivada). Esto nos sugiere, junto al fenotipo de reducción del tamaño del compartimiento, que las células están quedando retenidas en alguna de las etapas del ciclo celular. El análisis del contenido de DNA a través de citometría reveló un enriquecimiento de células aneuploides y en estado G2/super-G2, similar a lo observado en condiciones de reducción de reguladores de la transición G2/M (por ejemplo, pérdidas parciales de Cdk1). El bloqueo de la muerte celular no suprime la reducción del tamaño del tejido y favorece el enriquecimiento en súper-G2. El análisis de las interacciones genéticas de p115 reveló que la modificación de la estructura de Golgi no es relevante sobre los fenotipos, siendo Cdk1 el único elemento capaz de suprimirlos y se muestra que p115 es requerido en la activación de Cdk1.

Se ha descrito en células de mamíferos que p115 interactúa con γ -tubulina, concentrándose en los centrosomas durante la mitosis y que la depleción de p115 en este tipo celular genera husos multipolares. Además, se ha establecido que Cdk1 durante el inicio de la mitosis estaría localizado en los centrosomas. Se exploró este posible mecanismo de regulación, no encontrándose evidencias de su existencia en los tejidos de *Drosophila*. A pesar de esto último, encontramos la existencia de interacciones físicas entre p115 y Cdk1, pudiendo proponer de esta forma un posible mecanismo de regulación, extensible a otros tipos celulares eucariontes.

Durante esta tesis, se estableció una relación entre p115 y la activación de Cdk1 en *Drosophila*, sugiriendo que el punto de control G2/M dependiente de fragmentación del Golgi en *Drosophila* sería independiente de ésta y más bien estaría

directamente relacionado con la presencia de las proteínas de matriz de Golgi y su capacidad de favorecer la activación completa de Cdk1 para la consecución del ciclo celular.

Esto nos ofrece un punto de partida para entender el mecanismo base que explica las relaciones entre las golginas, la estructura de los sitios transicionales del retículo y aparato de Golgi, y la progresión del ciclo celular en eucariontes.

ABSTRACT

Eukaryotic cells have membrane-bound organelles like the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus, which allow the separation and organization of different cell functions. These organelles have to be maintained in the daughter cells, generating questions like: what happens when cells divide? Do they divide the existing organelles or new copies are generated? How this is connected to the known mechanisms of cell cycle control?

In this thesis, we have focused into this last question. Within cell cycle are checkpoints, where cells verify through molecular mechanisms if the processes necessary to pass to following stage have been completed. Respect to this, it has been proposed in mammalian cells, which have only one Golgi apparatus with cisternal structure, that Golgi fragmentation is a cell cycle checkpoint in G2/M phase that guarantees its inheritance to daughter cells. This has been showed by fragmentation blockage through the overexpression or injection of Golgi matrix proteins (i.e. Grasp65).

Unlike mammalian cells, *Drosophila* cells have multiple Golgi units. Moreover, during *Drosophila* development, Golgi units transit from fragmented states (tubular-vesicular) to cisternae (denominated paired stacks), depending on a raise on ecdysone hormone during the pupation. In this way, the tubular-vesicular structure of Golgi during the development of progenitors of adult structures of *Drosophila* would not impose a cell cycle checkpoint to ensure this organelle inheritance.

In this thesis, we have studied p115 protein function, a Golgi matrix protein (golgin) required for paired stack formation and transitional endoplasmic reticulum (tER) sites structure in *Drosophila* development. We asked ourselves if the depletion of this protein had effects on the secretion/exocytosis of proteins and if the change of the Golgi-tER structure had consequences over the cell cycle and tissue proliferation.

To answer to these questions, live experiments of gain and loss of function were done using a double strand RNA (dsRNA) against p115 for which its effectiveness and specificity were established, and a construction that allows us to express a fusion protein. Through UAS/Gal4 system and confocal microscopy, we determined proliferation parameters and cell death. Cell cycle was studied by flow cytometry and

activated/total of the determinant kinase of G2/M transition, Cdk1, were analyzed by immunoblot.

Our results revealed that p115 knockdown in the posterior compartment of the wing decreased its size. In spite of that, there are more proliferating and apoptotic cells in the wing primordial, This suggested that the cells are getting retained in some point of the cell cycle. Cytometry analysis of DNA content displayed an enrichment of aneuploid and G2/super-G2 cells, resembling a reduction of G2/M regulators (i.e., Cdk1 knockdown). Blocking cell death does not suppress the phenotype of tissue reduction and it favors super-G2 enrichment. Genetic interactions revealed that Golgi structure modification is not relevant over the phenotypes, being Cdk1 the only element capable to suppress them. This was confirmed showing that p115 is required for Cdk1 activation.

It has been described that p115 in mammalian cells interacts with γ -tubulin, localizing in the centrosomes during mitosis and p115 depletion caused multi-polar spindle formation. Also, it has been showed that Cdk1 at mitosis beginning is localized in centrosomes. We explored this possibility but we haven't found evidences of their existence in *Drosophila* tissues. In spite of this, we have found the existence of physical interactions between p115 and Cdk1, being able to propose this as a possible mechanism of regulation, and possible to extend to other eukaryotic cell types.

In this thesis, we have established a relation between p115 and Cdk1 activation in *Drosophila* and it is suggested, at least in *Drosophila*, that G2/M checkpoint is Golgi structure independent and rather it would directly be related to the presence of Golgi matrix proteins and their capacity of favoring the full activation of Cdk1 for cell cycle attainment.

This offers a starting point to understand the underlying mechanism that explains the relations between golgins, Golgi-tER structure and cell cycle progression in eukaryotes.

INTRODUCCIÓN

Las células eucariontes tienen organelos derivados de membrana dentro de los cuales se encuentra el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, los cuales les permiten separar y organizar las distintas funciones celulares. Esto permite que un diverso rango de diferentes ambientes coexistan en una misma célula, y tiene enormes implicancias en términos de la diversidad de funciones que esta puede realizar. Al mismo tiempo que proteínas son degradadas en el ambiente ácido de los lisosomas, nuevas proteínas son sintetizadas en el citoplasma y transportadas a través de los organelos de la ruta secretoria. El problema con la existencia de estos organelos derivados de membrana como el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi es que estos deben ser mantenidos. En células que no se dividen esto es un simple acto de preservación, la biosíntesis de lípidos y proteínas están asociados con el RE, y los componentes requeridos pueden ser enviados a otras partes del sistema, como el aparato de Golgi, a través del tráfico vesicular. Sin embargo, ¿qué ocurre cuando las células se divide? ¿Crean copias adicionales de sus organelos al dividir las copias existentes, o generan nuevas copias *de novo*? ¿Cómo esto se encuentra acoplado a los mecanismos conocidos de control del ciclo celular?. Nosotros en esta tesis nos enfocamos en esta última pregunta.

Dentro del ciclo celular existen puntos de control, en los cuales la célula verifica a través de mecanismos moleculares si los procesos necesarios para pasar a la siguiente etapa han sido completados. Respecto a esto, se ha propuesto en las células de mamífero poseedoras de solo un aparato de Golgi organizado en cisternas, que la fragmentación de éste durante la mitosis es un punto de control del ciclo celular en fase G2/M que garantiza su herencia en las células hijas dependiente de una proteína de matriz de Golgi (golgina), denominada Grasp65.

En esta tesis analizamos el papel de la proteína p115, una proteína de matriz de Golgi que ha sido relacionada con la estructura de este organelo y con la exocitosis/secreción sirviendo además de andamio para otras proteínas. A través de esta tesis fuimos capaces de relacionar esta proteína con activación de Cdk1 y las consecuencias de esta sobre la transición G2/M en el disco imaginal de ala *Drosophila*.

En esta introducción se revisará el ciclo celular en general, como la estructura del aparato de Golgi es capaz de regularlo y los antecedentes que involucran a p115 en el punto de control G2/M en otros organismos. A continuación detallaré los antecedentes existentes acerca de la estructura del aparato de Golgi en *Drosophila*, como esta estructura es influenciada por la señalización por ecdisona y como p115 podría acoplar la estructura del aparato de Golgi con el ciclo celular.

1. CICLO CELULAR Y PUNTOS DE CONTROL.

En términos generales, la división celular parte con la duplicación de los contenidos celulares, seguido por la distribución de estos componentes entre las dos células hijas. La duplicación de los cromosomas ocurre durante la fase S del ciclo celular. Durante la fase M, los cromosomas replicados son segregados en núcleos individuales (mitosis) y luego la célula se divide en dos. La fase S y la fase M están separadas por fases espaciadoras (*gap*) denominadas G1 y G2, donde varias señales intracelulares y extracelulares regulan la progresión del ciclo celular. Dentro del ciclo celular existen puntos de control, en los cuales el ciclo celular responde a la información proveniente de la célula y del medio extracelular. Por ejemplo, si no se completa la síntesis del DNA, señales son enviadas al sistema de control para retrasar la progresión a la fase M. Los puntos de control mejor establecidos son *Start* (o el punto de restricción) en G1 tardío, donde la célula se compromete a entrar en el ciclo celular y duplicar los cromosomas. El segundo es el punto de control G2/M, en el cual el sistema de control responde a los eventos mitóticos tempranos que llevan al alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico. El tercero es la transición entre la metafase y la anafase, donde el sistema de control estimula la separación de las cromátidas hermanas, promoviendo a la mitosis y posteriormente a la citocinesis.

Los sistemas de control dependen de la activación de distintas quinasas dependientes de ciclina (Cdks) durante el ciclo celular, que son las que fosforilan a muchas de las proteínas implicadas en el proceso. La activación de Cdks dependen en primera instancia de la presencia de las ciclinas respectivas, que como su nombre lo indica tienen un ciclo de síntesis y degradación durante el ciclo celular. En organismos

multicelulares existen ciclinas y Cdks específicas para cada fase del ciclo celular (Alberts y col., 2005).

La unión de las ciclinas a las Cdk produce un desbloqueo del sitio activo, resultando en una activación parcial de esta. La activación completa se produce por la fosforilación por una quinasa activadora de Cdks (CAK) en el *loop* de activación de la quinasa. En *Drosophila*, la única CAK descrita es Cdk7, la que posee actividad quinasa descrita sobre las distintas Cdks (Larochelle y col., 1998; Li y col., 2010) y en el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II (Schwartz y col., 2003).

Para la regulación más fina del complejo Cdk1/Ciclina B, que regula la transición G2/M, existen dos sitios en la superficie de Cdk1 (T14 e Y15) que son fosforilados por la quinasa *Wee1* (nuclear) o *Myt1* (Golgi – RE) dependiendo del tejido inhibiendo la actividad quinasa del complejo, en cambio la desfosforilación de estos por la fosfatasa *cdc25* (*string* en *Drosophila*), es capaz de activar al complejo (Alberts y col., 2005).

2. HERENCIA DEL APARATO DE GOLGI.

Las células eucariontes contienen un “sistema de endomembranas” el cual incluye organelos de la ruta secretoria y de la ruta endocítica. En la ruta secretoria, las proteínas sintetizadas son exportadas desde el retículo endoplasmático (RE) al aparato de Golgi, el cual consiste de membranas con forma de disco denominadas cisternas. En este organelo ocurren muchos procesos celulares, incluyendo la biosíntesis de lípidos, modificación de proteínas (dentro de las cuales la glicosilación es la más importante) y el movimiento de membranas en el interior de la célula. Estas membranas deben ser heredadas durante la mitosis, acoplándose con el ciclo celular y los centrosomas.

La forma en que el aparato de Golgi se hereda varía en la evolución, desde una simple división del material, como ocurre en *Pichia pastoris* o en *Saccharomyces cerevisiae*, donde durante la división celular el aparato de Golgi permanece ensamblado y funcional (revisado en Papanikou y Glick, 2009), hasta un proceso altamente regulado por las proteínas que participan en la progresión del ciclo celular en mamíferos (Rabouille y col., 2007; Corda y col., 2012). Al parecer, la relación con el

ciclo celular esta directamente relacionada con el grado de estructuración que posee. En *Saccharomyces cerevisiae* el aparato de Golgi esta formado por cisternas distribuidas en el citoplasma. En cambio, en mamíferos existe un solo aparato de Golgi que se encuentra altamente estructurado en agrupaciones de cisternas en número variable (denominado **stack**) el cual debe fragmentarse completamente previo a la mitosis, permitiendo así una segregación uniforme. De acuerdo a lo anterior, al impedir la fragmentación del Golgi en mamíferos se produce el bloqueo de la mitosis, evidenciando de esta forma la existencia de un íntimo acoplamiento entre la fragmentación del aparato de Golgi y el ciclo celular.

Respecto a lo anterior, podemos considerar a *Drosophila* como un modelo intermedio, en el cual se distingue más de un aparato de Golgi y éste se encuentra estructurado en *stacks* con menor número de cisternas (denominado *paired stack* o *stack* apareado por Kondylis y col., 2007). En *Drosophila* existe conservación de la mayoría las proteínas que participan en el proceso de fragmentación. A lo largo de esta tesis modificamos la estructura del aparato de Golgi a través de la depleción de la proteína p115, produciendo la pérdida de la organización de la matriz del aparato de Golgi lo que consecuentemente impide la formación de cisternas (Kondylis y Rabouille, 2003). Primero, indagamos si la falta de función de p115 producía algún tipo de cambios en la proliferación celular y si tenía algún efecto sobre la transición G2/M en los discos imaginales de *Drosophila*. Posteriormente, si los efectos observados dependen de la presencia de p115, efectos en endocitosis/secreción o el estado de fragmentación del aparato de Golgi, para finalmente analizar las interacciones funcionales de p115 con componentes del ciclo celular, principalmente respecto a la activación del complejo Cdk1/ciclina B, analizando cuanta similitud existe con los fenotipos y procesos descritos en mamíferos.

2.1. Herencia del aparato de Golgi en mamíferos.

Durante la mitosis en mamíferos, en particular en profase, el Golgi se fragmenta a cisternas individuales (Lucocq y Warren, 1987), las que progresivamente se desagregan en numerosos conjuntos de vesículas en prometáfase (Shima y col., 1997) (Figura 1). Existe evidencia de que los conjuntos de vesículas de Golgi se mantienen independientes del retículo endoplasmático durante la mitosis (Jesch y

Linstedt, 1998; Jesch y col., 2001; Jokitalo y col., 2001; Seemann y col., 2002; Shima y col., 1998; Shima y col., 1997). Se ha sugerido que este proceso de fragmentación del aparato de Golgi podría actuar como un sensor de daño que regularía la progresión del ciclo celular y conectaría el ciclo de partición del Golgi con el ciclo del centrosoma y la división celular (Sütterlin y col., 2002).

Las golginas son proteínas de matriz de Golgi que participan de este proceso y dentro de las cuales se encuentra la proteína p115. Las golginas son proteínas periféricas de membrana que han sido involucradas en la formación de la matriz del Golgi (esqueleto proteico necesario para la mantención de la estructura del aparato de Golgi) y la unión de éste con el citoesqueleto. Estas proteínas se localizan y funcionan en dominios específicos del Golgi, poseen estructuras tipo *coiled-coil* y su actividad es regulada por GTPasas pequeñas. En vertebrados, las golginas son importantes para establecer la estructura normal del aparato de Golgi (Barr y Short, 2003) y en correspondencia con lo anteriormente mencionado, se les ha asignado un rol regulador fundamental durante la mitosis, favoreciendo la correcta herencia de este organelo a las células hijas (Seemann y col., 2002; Sütterlin y col., 2005; Kodani y col., 2008). Por un lado, las golginas de matriz pertenecientes al cis-Golgi son capaces de formar un esqueleto y de heredarse en ausencia de membranas provenientes del Golgi (marcadas a través de la presencia de glicosiltransferasas), sugiriendo que esta matriz es la que le da al Golgi una identidad autónoma (Seemann y col., 2002). Por otro lado, los grupos de vesículas de Golgi durante la mitosis son enriquecidas en golginas específicas que mantienen la polaridad *cis-trans* durante la mitosis (Shima y col., 1997). Junto a los experimentos mencionados posteriormente, la función estructural y enriquecimiento durante la mitosis ha llevado a la proposición que las golginas serían requeridas para la correcta herencia del aparato de Golgi durante la mitosis.

2.1.1. Golginas y sus efectos sobre la progresión mitótica en mamíferos.

El estudio de la función de Grasp65 es el ejemplo más claro de la participación de una golgina sobre la progresión mitótica en mamíferos. Al sobreexpresar el fragmento C-terminal de Grasp65 o utilizar anticuerpos contra este dominio, se impide el desensamblaje del oligómero y la consecuente fragmentación del aparato de Golgi previo a la mitosis no procede, quedando las células retenidas en la fase G2 tardía del

ciclo celular (no entran en profase): Esta inhibición se alivia al inducir farmacológicamente la fragmentación a través de una microinyección de brefeldina A (BFA, bloqueo del transporte anterógrado y produciendo la fusión del Golgi con el retículo endoplásmico) o nocodazol (despolimerizante de los microtúbulos), permitiendo que las células retenidas ahora entren en mitosis (Sütterlin y col., 2002). El blanco de la brefeldina A es un conjunto de intercambiadores de GTP (GEFs) tipo Sec7 que catalizan la activación de una GTPasa denominada Arf1 (Jackson y Casanova, 2000), necesaria para el reclutamiento de proteínas del coatómero COPI. Los resultados inmediatos de la adición de BFA es la inhabilidad para reclutar proteínas del coatómero COPI a las membranas del aparato de Golgi. Como resultado, la mayoría de las cisternas de Golgi se fusionan directamente con el retículo endoplasmático (ER), llevando a la formación de un compartimiento híbrido ER-Golgi (mecanismos revisados en Nebenführ y col., 2002).

Al mirar la herencia del Golgi marcando las glicosiltransferasas o a través de las proteínas de matriz de Golgi en presencia de BFA. Se observa que al marcar las glicosiltransferasas, estas permanecen asociadas con el ER durante la mitosis. Pero al marcar las proteínas de matriz, se observa que migran hacia los centrosomas normalmente como si fueran Golgi, separado del ER. Estos experimentos sugieren que la matriz proteica es la unidad de partición del aparato de Golgi y que sería la que llevaría las membranas que contienen las enzimas hacia las células hijas (Seemann y col., 2002).

2.1.2. Mecanismo para la fragmentación del aparato del Golgi y su acoplamiento con la entrada en mitosis.

La incubación de membranas de Golgi aisladas o células de mamífero permeabilizadas con citosol mitótico y un sistema de regeneración de ATP causa una fragmentación de las membranas del aparato de Golgi. Este tipo de procedimientos ha revelado el requerimiento de tres quinasas diferentes: la quinasa activada por mitógeno, MEK1; la quinasa similar a polo, Plk1 y la quinasa dependiente de ciclina, CDK1 (Misteli y Warren, 1995; Acharya y col., 1998, Lowe y col., 1998; Colanzi y col., 2000; Colanzi y col., 2003; Sütterlin y col., 2001)

MEK1 y Plk1 son necesarias para la dispersión del aparato de Golgi pericentriolar en *stacks* y fragmentos más pequeños, los cuales entonces son divididos en fragmentos más pequeños por un proceso dependiente de Cdk1 (Lowe y col., 1998; Kano y col., 2000; Sütterlin y col., 2001; Shorter y Warren, 2002).

Las polo-like quinasas son enzimas conservadas que poseen un rol fundamental en la progresión mitótica con tres funciones conocidas: establecer la bipolaridad del huso, participar en la citoquinesis y mantener a Cdk1 en estado activo a través de la activación de la fosfatasa Cdc25/String por fosforilación directa (revisado por Glover y col., 1996).

Cdk1 es capaz de fosforilar a GM130 (Lowe y col., 1998; Lowe y col., 2000), lo cual bloquea la interacción con p115 promoviendo de esta forma también la fragmentación del aparato de Golgi. Otro de los blancos descritos para Cdk1 es GRASP65, y su fosforilación impide la trans-oligomerización de los dímeros de Grasp65, impidiendo así su unión a membranas y desestabilizando la configuración de cisternas del aparato de Golgi.

GRASP65 fosforilado es capaz de reclutar además a la quinasa Plk1 desde el citoplasma al aparato de Golgi (polo, en *Drosophila*) promoviendo la fosforilación de otros blancos en el aparato de Golgi facilitando la vesiculación del organelo (Sütterlin y col, 2001; Preisinger y col, 2005).

Cdk1 es el regulador más importante de muchos de los eventos de la entrada y progresión de la mitosis y quién, como ya se mencionó, promovería además la vesiculación completa de las cisternas de Golgi (Misteli y col., 1995, Prescott y col., 2001). Varios sustratos fosforilados por Cdk1 que participan en la ruta secretoria temprana como Rab1 y p47 (Uchiyama y col., 2003), podrían contribuir en este proceso.

La fragmentación del aparato de Golgi en mamíferos en túbulos y vesículas finalmente es mediada secuencialmente por MEK1, Plk1 y CDK1. Recientemente se mostró que estos eventos secuenciales están conectados a través de la quinasa asociada a ER-Golgi, Myt1 (Villeneuve y col., 2013). Esta enzima se localiza en el retículo endoplásmico y Golgi (Liu y col., 1997) y podría ser sustrato de la Plk1 al ser reclutada al Golgi al inicio de la mitosis. Myt1 es un inhibidor de la activación de Cdk1 y

en consecuencia regulador negativo de la mitosis, efecto que es suprimido cuando Myt1 es fosforilado por Plk1 (Nakajima y col., 2003). MEK1 también es conocido por fosforilar a Myt1 vía p90RSK (S6 quinasa ribosomal de 90 kDa) inactivándolo (Villeneuve y col., 2013). La regulación de la entrada en mitosis depende de las fosforilaciones inhibitorias de Cdk1, la ya comentada ejercida por la quinasa Myt1, y otra dependiente de la quinasa Wee1, proteína nuclear que ha sido relacionada en *Drosophila* con el control de los ciclos celulares rápidos que ocurren durante el desarrollo temprano del embrión (Price y col., 2000).

La depleción de Myt1 mediante RNA de interferencia aumenta el ritmo de proliferación de células de *Drosophila* S2 al igual que en células de mamífero, mientras que su sobreexpresión disminuye el ritmo de proliferación, con retención en G2/M y se observa una fragmentación incompleta del aparato de Golgi (Cornwell y col., 2002; Price y col., 2002; Villeneuve y col., 2013).

Como se señaló con anterioridad, si se impide la vesiculación del aparato de Golgi se bloquea la entrada a mitosis, por lo cual se ha propuesto la existencia de un punto de control G2/M dependiente de la fragmentación del Golgi (Presinger y col., 2005).

2.1.3. p115: proteína de matriz de Golgi (golgina).

El grupo de proteínas denominadas Golginas es altamente conservado en la evolución. En levaduras encontramos a Uso1p, el ortólogo de la golgina p115. Análisis funcional mediante un mutante termosensible de Uso1p muestra que su falta de función produce una pérdida de la secreción detectada a través de la secreción de la enzima invertasa. Además mediante la observación de la glicosilación de la invertasa se determinó que Uso1p es requerida para el transporte entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. (Nakajima y col., 1991). Este defecto es producido por ser necesaria para la interacción v-SNARE/t-SNARE entre vesículas provenientes del retículo y la membrana blanco en el *cis*-Golgi (Sapperstein y col., 1996). De manera similar, la reducción de p115 en mamíferos mediante siRNA produce la fragmentación del aparato de Golgi y retardo en el tráfico anterógrado sin defectos en la glicosilación de proteínas (Sohda y col., 2005).



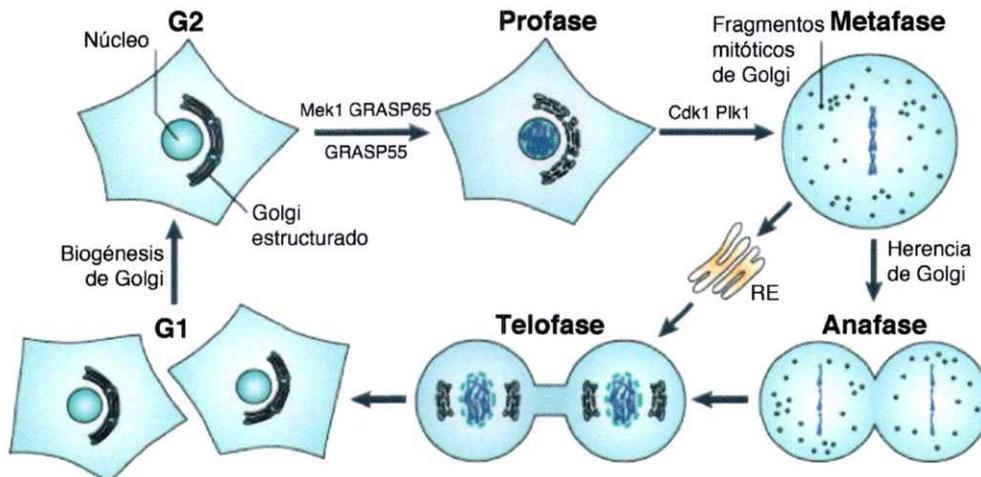


Figura 1. Herencia del aparato de Golgi en mamíferos.

El aparato de Golgi en la interfase está compuesto de cisternas apiladas (*stacks*) las cuales están unidas por conexiones laterales tubulares, este organelo está generalizadamente localizado en la región perinuclear de la célula. Durante la profase, las conexiones laterales se pierden y el aparato de Golgi se convierte en cisternas individuales que se mantienen cerca del núcleo. Entre la profase y la metafase, las cisternas son convertidas en vesículas de 50-70 nm y elementos túbulo-vesiculares que son dispersadas en el citoplasma. Se ha propuesto que estos fragmentos de Golgi funcionen como las unidades de particionamiento del aparato de Golgi entre las células hijas. Una visión alternativa es que estos fragmentos de Golgi se fusionen con el retículo endoplasmático y que las proteínas y membranas del aparato de Golgi sean particionadas junto al retículo. En la telofase, los fragmentos del aparato de Golgi son fusionados unos con otros para iniciar la reformación de nuevos apilamientos de cisternas los cuales finalmente se conectan para formar un aparato de Golgi en cada una de las células hijas. Se muestran las proteínas necesarias descritas para desarmar las cisternas y posteriormente fragmentar completamente el aparato de Golgi. (Modificado desde Lowe y Barr, 2007)

En células de mamífero se ha establecido además que p115 tiene una función en la fragmentación del aparato de Golgi durante el ciclo celular. Durante la interfase, p115 une las membranas del Golgi a través de la proteína de matriz de Golgi GM130. En el inicio de la mitosis, el complejo Cdk1/ciclina B fosforila a GM130 esto impide la interacción entre GM130 y p115 y, en consecuencia, la unión de esta última al aparato de Golgi. La pérdida de p115 en estas membranas prevendría la asociación, y por lo tanto, la fusión de las vesículas tipo COPII, facilitando la vesiculación del aparato de Golgi (Lowe y col., 1998).

2.1.4. Pérdida de la función de las golginas y sus efectos respecto a la formación del huso mitótico.

Al depletar las células de Grasp65 a través de RNA de interferencia en líneas celulares de mamífero (HeLa), el número de cisternas se reduce, sin afectar el transporte anterógrado y las células son capaces de entrar en mitosis, sin embargo se acumulan en metafase con la cromatina condensada, generándose múltiples husos mitóticos (detectados a través de IF contra γ -tubulina), no obstante solo 2 poseen centrina-2 y las células eventualmente mueren (Sütterlin y col., 2005). Esto revela otra función de Grasp65, relacionada a la formación del huso mitótico. Efectos similares se encuentran utilizando interferentes contra GM130 (Kodani y col., 2008) en células HeLa, los cuales reducen la asociación de Grasp65 a las membranas del aparato de Golgi. En estas células se observa un incremento del índice mitótico, sugiriendo que las células se arrestan en mitosis y donde la mayoría posee husos mitóticos desorganizados (determinado mediante IF contra α -tubulina y centrina-2). Al repetir estos experimentos en líneas celulares p53 positivas (HeLa es una línea celular deficiente en p53) se observó una disminución, de la tasa de proliferación, retardo en la transición G2/M y no se detectó el fenotipo del huso mitótico. Los fenotipos en el huso no dependen de la unión de Grasp65 a GM130, ya que al sobreexpresar en las células depletadas de GM130 el dominio C-ter de éste, que es el que media la interacción con Grasp65 y la asociación a Golgi de GM130 (Nakamura y col., 1997; Barr y col., 1998) se siguen observando husos aberrantes en las mismas proporciones que al reducir solo los niveles de GM130. Por otra parte, al bloquear la muerte celular con ZVAD

(inhibidor pan-caspasa), se incrementa más aún el índice mitótico de las células depletadas de GM130.

Recientemente fueron descritos los fenotipos de huso mitótico de p115, en los que se observó la existencia de múltiples husos mitóticos y defectos en la citoquinesis. Esto estaría mediado por una interacción directa entre p115 y γ -tubulina (determinada por co-inmunoprecipitación) (Radulescu y col., 2011).

2.2. El aparato de Golgi en *Drosophila*.

En *Drosophila* principalmente dos grupos de investigación: el de Catherine Rabouille (Holanda) y el de Vivek Malhotra (EEUU, actualmente en España) son los que han contribuido a entender la morfología y comportamiento del aparato de Golgi en este organismo, con pequeñas contribuciones tangenciales de otros grupos, como los que estudian glicosilación de proteínas necesarias para la señalización y secreción de morfógenos y el de Thomas Kaufman (EEUU) quién estudia el ciclo de los centrosomas durante la mitosis.

La morfología y el comportamiento mitótico del aparato de Golgi es variable, dependiendo de las proteínas de *cis*-Golgi analizadas y el tipo de tejido investigado. Durante la embriogénesis sincicial las membranas de Golgi provisionadas por la madre están distribuidas preferentemente en la corteza del embrión y son reconocibles como una multitud de estructuras punteadas que se mantienen sin cambios durante las divisiones nucleares sinciciales sincrónicas (Frescas y col., 2006; Ripoche y col., 1994; Stanley y col., 1997). Así mismo, el retículo endoplásmico está presente en la corteza organizado como una red de membranas interconectadas a través del citoplasma del ovocito recién fertilizado (Bobinnec y col., 2003). Adicionalmente, tanto el retículo como el Golgi cortical se disponen como una red continua en embriones preblastodermo sincicial, la que se fragmenta a unidades individuales asociadas a los núcleos a lo largo de su migración hacia la corteza en embriones en estado de blastodermo sincicial (Frescas y col., 2006). En embriones celularizados y en células en cultivo (S2) de *Drosophila* el Golgi existe como unidades discretas en el citoplasma durante la interfase, las cuales se rompen y dispersan en mitosis (Stanley y col., 1997). Finalmente, en las células de los discos imaginales, progenitores de las estructuras adultas del animal, el aparato de Golgi se distribuye en múltiples unidades

discretas túbulo-vesiculares a través de los tres estadios larvarios y solo durante la pupación alcanza su organización en unidades discretas formadas por múltiples cisternas apiladas, las cuales se originan desde las unidades de Golgi pre-existentes (Kondylis y col., 2001). Estas unidades presentan polaridad durante todo el desarrollo, sugiriendo que el Golgi de *Drosophila* tiene distintos compartimientos funcionales (Yano y col., 2005).

El punto de control dependiente de la fragmentación del aparato de Golgi, también ha sido sugerido en *Drosophila* en células S2, durante un análisis del número de unidades de Golgi durante la mitosis, encontrándose que estas unidades se duplicaban durante ésta manteniéndose los niveles de fluorescencia totales, sugiriendo que se producía una división de éstas, en vez de una formación *de novo*. Encontraron que esto dependía de citoesqueleto de actina, ya que tratamientos con citocalasina D o latrinculina B, ambos depolimerizantes de actina, llevaba a la duplicación en número de las unidades de tER-Golgi. Esto era independiente del transporte anterógrado y era originado de las membranas preexistentes, ya que tratamientos con BFA junto a citocalasina D y cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), mantenían la duplicación del número de unidades de Golgi. Expresión de dominantes negativos de Cdc42 y Rac1, provocan también la duplicación en número de las unidades de tER-Golgi, reguladores de Scar/WAVE y WASP, los que a su vez regulan al complejo Arp2/3, generador de las ramificaciones de actina. Esto los llevó a razonar que la duplicación de las unidades de Golgi en G2, antes de la dispersión mitótica podría ser esencial para la entrada a mitosis. Para probar esto sobreexpresaron Abi (*Abelson interacting protein*, proteína capaz de acoplar la fosforilación en tirosina con la dinámica de citoesqueleto, regulando la formación de actina filamentosa a través de Scar/WAVE (Kunda y col., 2003) y modulando además la actividad de Abl, *Abelson tyrosine kinase*) impidiendo de esta forma la despolimerización de actina, inhibiendo la fragmentación del Golgi y la progresión del ciclo celular al disminuir el número de figuras mitóticas observadas (Kondylis y col., 2007).

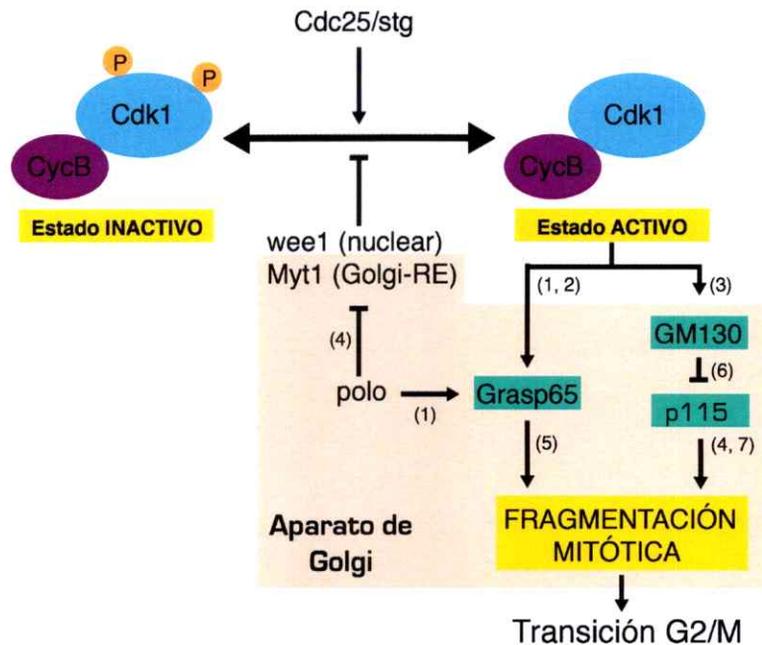


Figura 2. Relaciones establecidas entre la fragmentación mitótica del Golgi y progresión de la mitosis en células de mamíferos.

El esquema muestra los componentes y las interacciones descritas en relación a la activación de Cdk1 y la fragmentación del aparato de Golgi en la mitosis. En el esquema las proteínas de matriz de Golgi, sobre las cuales actúa Cdk1/ciclina B, esenciales en el proceso, están indicadas en verde.

Myt1, inhibidor de Cdk1 se localiza en el aparato de Golgi. Durante la transición mitótica, Myt1 es inactivado por la fosforilación por Plk1 (polo en *Drosophila*) y la defosforilación de Cdk1 por Cdc25/String resulta en la activación de Cdk1. GRASP65 fosforilado recluta a Plk1 al Golgi, promoviendo la inactivación de Myt1 y en consecuencia la activación de Cdk1/ciclina B, la que fosforila a GRASP65 produciendo una retroalimentación positiva. La fosforilación de GRASP65 impide su oligomerización, lo cual promueve la fragmentación del aparato de Golgi. Por otro lado se ha visto que Cdk1/ciclina B es capaz de fosforilar a GM130, lo cual bloquea la interacción con p115 promoviendo de esta forma también la fragmentación del aparato de Golgi.

Los números indican las referencias bibliográficas de cada uno de los procesos: (1) Preisinger y col., 2005; (2); (3) Lowe y col., 1998; Lowe y col., 2000 (4) Dirac-Svejstrup y col., 2000 (5) Sütterlin y col., 2001; (6) Sohda y col., 2005 (7) Shorter y col., 1998.

2.2.1. Biogénesis del aparato de Golgi en los discos imaginales durante el desarrollo en *Drosophila*.

Durante el desarrollo de los discos imaginales de *Drosophila* el aparato de Golgi se encuentra fragmentado con una estructura túbulo-vesicular hasta el estadio de pupa blanca, adquiriendo durante este periodo la conocida estructuración en cisternas (Kondylis y col., 2001). Esta transición en la estructura del aparato de Golgi es gatillada por el primer alza de ecdisona que ocurre previo a la pupación. Experimentalmente el fenómeno puede ser inhibido en condiciones de falta de NSF (factor sensible a N-etilmaleimida), la que es una ATPasa necesaria para la fusión de vesículas de Golgi *in vitro*, o bien estimulada a temperaturas más altas (incubación a 30°C), a través de la sobreexpresión de NSF (*hsp70>dNSF1*) o mediante la adición de ecdisona exógena (Kondylis y col., 2001) (Figura 3).

Como ya se mencionó la estructuración en cisternas ocurre por el incremento en los niveles de ecdisona. Larvas homocigotas para una mutación termosensible en el gen *ecdysoneless* (*ecd^l*), un elemento necesario para la señalización por esta hormona esteroidal, no entran en pupación y son capaces de mantenerse hasta 3 semanas en el tercer estadio larvario (Garoia y col., 2000), manteniendo la estructura túbulo-vesicular del aparato de Golgi, incluso al incubarlas a 30°C.

Dentro de los efectos del aumento de los niveles de ecdisona está el incremento en la expresión del complejo transcripcional *Broad-Complex* (Dunne y col., 2002). Este complejo promueve la expresión de una variedad de genes relacionados con la transición del estado larval al de pupa, entre los que se encuentran genes involucrados con la generación de vesículas tipo COPII (a través del aumento de Sec23), importantes para el transporte anterógrado, y genes que favorecen la fusión de vesículas (NSF y SNAP), lo que conjuntamente explicaría la formación y agrupamiento de las cisternas (Dunne y col., 2002). Como parte de esta respuesta, p115 aumenta sus niveles de expresión al doble, sugiriendo que podría estar participando en el proceso de estructuración del Golgi en su configuración de cisternas (Dunne y col., 2002).

2.2.2. Golginas en *Drosophila*.

En *Drosophila* varias golginas de *cis*-Golgi han sido investigadas funcionalmente en células S2 (GM130, Grasp65, p115), a través de transfección con RNAs doble hebra, encontrándose efectos principalmente sobre la arquitectura del aparato de Golgi (Kondylis y Rabouille, 2003, Kondylis y col., 2005).

En el caso de Grasp65, se determinó que ésta se localiza en los sitios transicionales del RE y en las membranas del aparato de Golgi. Al ser depletada, se produce una conversión de las cisternas a túbulos en un 30% de las células, lo cual se incrementa al 100% de las células en condiciones de doble depleción de Grasp65 y GM130, esto sin afectar el transporte anterógrado de proteínas (Kondylis y col., 2005). Posteriormente, se generaron animales mutantes para Grasp65 los cuales presentan dos fenotipos distinguibles en ala: en el primero las capas dorsal y ventral del ala no se aponen correctamente (generándose burbujas y las denominadas "ampollas" en el epitelio), debido a la falta de la secreción no convencional (sin pasar por el aparato de Golgi) de la integrina α PS1 y el segundo es que el ala se hace aparentemente más pequeña, efecto que no ha sido analizado en profundidad (Schötman y col., 2008).

Otra golgina, esta vez de *trans*-Golgi, analizada experimentalmente en embriones de *Drosophila* fue *centrosomin's beautiful sister* (*Cbs*). Esta proteína contiene un dominio GRIP 57% idéntico a la golgina-97 de mamíferos. *Cbs* pasa de una distribución citoplasmática a asociarse a los cromosomas durante la mitosis por un mecanismo que requiere del dominio GRIP y la GTPasa pequeña Arl1. Cuando los niveles de *Cbs* son reducidos, los centrosomas fallan en su maduración y cuando se sobreexpresa el dominio GRIP los centrosomas sufren hipertrofia (Eisman y col., 2006), sugiriendo la participación del aparato de Golgi en el ciclo de duplicación de los centrosomas durante el ciclo celular.

2.2.3. p115 en *Drosophila*.

El homólogo de *Drosophila* de la proteína p115 se encuentra localizada en el lado citosólico de las cisternas del aparato de Golgi y en los sitios transicionales del retículo endoplasmático (Kondylis y Rabouille, 2003). El análisis funcional mediante su depleción por RNA de interferencia en células S2 provoca fragmentación del aparato de Golgi, transformándose en grupos de vesículas y túbulos, afectando además la

organización de los tER (tER, por sus siglas en inglés: *transitional ER sites*) (Kondylis y Rabouille, 2003), definidos inicialmente como sitios en el retículo endoplasmático libres de ribosomas y que posteriormente fueron limitados a los subdominios del RE donde las proteínas destinadas al aparato de Golgi son empaquetadas en las vesículas de transporte cubiertas por COPII (Orci y col., 1991; Barlowe y col., 1994). A pesar de lo anterior, el transporte anterógrado, determinado mediante el transporte de la proteína membrana Delta no es alterado, sugiriendo que la modificación de los tER y del aparato de Golgi en estas condiciones, no afectaría la ruta exocítica (Kondylis y Rabouille, 2003). De acuerdo a esto, p115 no fue identificada en una búsqueda generalizada de proteínas, mediante una estrategia de falta de función, que afectan la secreción de HRP (Björklund y col., 2006).

En *Drosophila*, el gen *p115* (CG1422) se localiza en el cromosoma X en la posición citológica 7C2. Posee una organización simple, con solo un exón y pequeñas regiones UTR predichas. La predicción señala un único transcrito codificante de 2751 nt y un polipéptido de 836 aa (<http://www.flybase.net/reports/FBgn0040087.html>).

Como aproximación genético-molecular para abordar el análisis funcional *in vivo* de este gen en *Drosophila*, se obtuvieron dos cepas que expresan de forma inducible mediante el sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) RNAs de doble hebra (dsRNA, *double strand RNA*) contra *p115* (Vienna *Drosophila* RNAi Center, VDRC) y se generó además una cepa transgénica con una construcción inducible de *p115* que permite sobreexpresar una versión de esta proteína fusionada a un epítipo utilizando el sistema Gal4/UAS. Los resultados obtenidos con estas cepas son los que se presentan en esta tesis.

Los antecedentes bibliográficos discutidos sugieren que existe una relación entre la arquitectura del Golgi determinada por las golginas y las proteínas asociadas a este organelo con la activación del complejo Cdk1/ciclina B y la transición G2/M del ciclo celular. En consecuencia, siendo p115 una golgina capaz de modificar la arquitectura del Golgi, podría tener influencias en la activación del complejo Cdk1/ciclina B y en la transición G2/M.

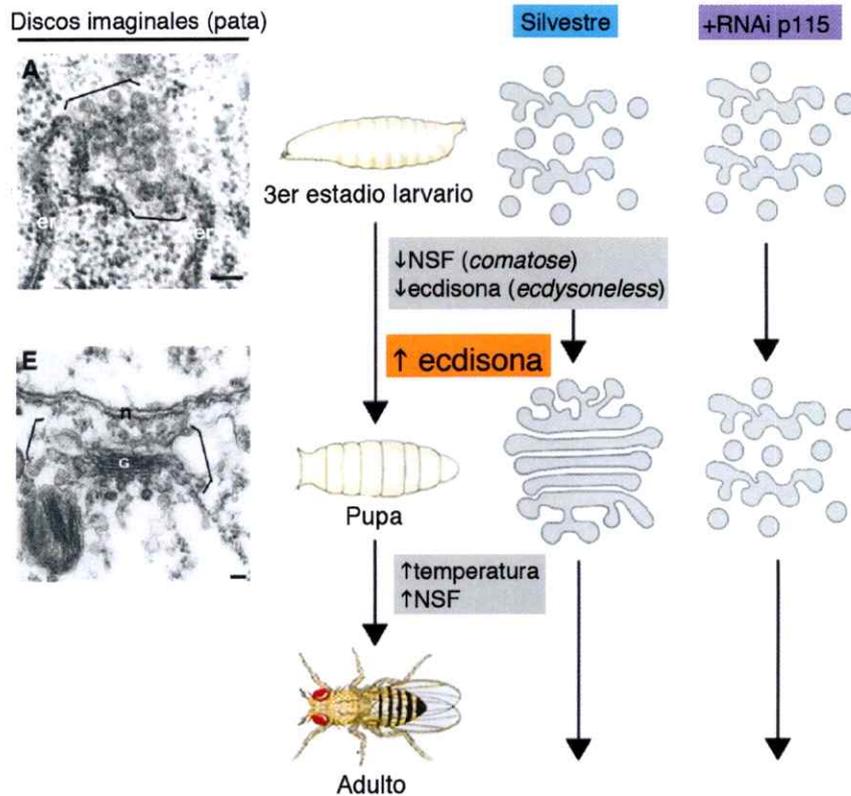


Figura 3. Biogénesis del aparato de Golgi en *Drosophila* y los posibles efectos de la depleción de niveles de p115.

El aparato de Golgi se encuentra fragmentado en una estructura túbulo-vesicular durante los estadios larvarios de *Drosophila*, siendo funcional en este estado. Durante el inicio de la pupación se produce una alza en los niveles de ecdisona (recuadro naranja), que produce la expresión de genes relacionados con la fusión de las vesículas y túbulos, induciéndose la estructura en cisternas múltiples apiladas (*stacks*) de este organelo. Esto también es posible de ser inducido en estadios larvarios al crecer las larvas a mayor temperatura, al sobreexpresar NSF o al añadir ecdisona exógena. La fusión y la formación de las cisternas apiladas se bloquea en mutantes termosensibles para NSF (*comatose^{ts}*) o ecdisona (*ecdysoneless^{ts}*).

La depleción de p115 produce un fenómeno similar a lo que se produce cuando la fusión es bloqueada en el aparato de Golgi en células S2 (Kondylis y Rabouille, 2003), suponiendo que el aparato de Golgi es incapaz de fusionarse en respuesta al alza de ecdisona en el inicio de la pupación, pero a diferencia de lo que ocurre con la depleción de NSF 1 o 2 no tiene efectos notorios sobre la secreción (Stewart y col., 2001).

*La existencia de un mecanismo de control del ciclo celular dependiente de la fragmentación del Golgi es especialmente llamativa en el tejido imaginal de *Drosophila* ya que aquí el aparato de Golgi posee una arquitectura túbulo-vesicular (Figura 3), distinta a la organización en cisternas descrita en células de mamífero y para las cuales este tipo de control de ciclo ha sido demostrado.*

Hipótesis

Existe un mecanismo de control de la transición G2/M en las células de los discos imaginales de *Drosophila* dependiente de la presencia de p115.

Objetivo general

Determinar a través de la falta de función de p115 si existe algún efecto sobre la transición G2/M en *Drosophila* e investigar los mecanismos implicados en ésta.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Establecer los efectos de la falta de función de p115 sobre la proliferación celular y la transición G2/M.

Objetivo específico 2: Determinar si los efectos sobre la progresión del ciclo celular dependen de la presencia de p115, defectos en exocitosis/secreción o estado de fragmentación del Golgi.

Objetivo específico 3: Determinar las interacciones funcionales de p115 con componentes de ciclo celular, principalmente respecto a la activación del complejo Cdk1/ciclina B.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DROSOPHILA COMO MODELO GENÉTICO

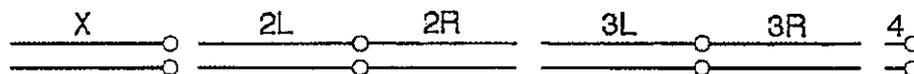
Drosophila, como modelo de estudio, posee el potencial de poder combinar aproximaciones genéticas y moleculares para responder preguntas acerca de la expresión y función de genes, de biología celular, biología del desarrollo y de neurobiología.

Dentro de sus ventajas están su corto ciclo de vida, el bajo costo de mantención, la posibilidad de obtener una progenie numerosa y que su desarrollo sea externo y altamente estereotipado, lo cual hace que cualquier diferencia fenotípica sea fácilmente reconocible. Su genoma se encuentra secuenciado y muy bien anotado, lo que evidenció que muchos de los genes presentes en *Drosophila* están conservados en vertebrados, permitiendo estudiar genes relacionados con fenómenos celulares y del desarrollo, y extrapolar los hallazgos a otros organismos. Además, existe la posibilidad de generar fácilmente transgénicos y mutantes (insercionales y puntuales), y combinarlos con herramientas genéticas, dentro de las cuales se encuentra el sistema UAS/Gal4, utilizado en esta tesis.

1.1. Cromosomas.

Drosophila posee 4 pares de cromosomas. Un par sexual, X e Y y 3 somáticos, 2, 3 y 4.

Hembra



Macho



L se refiere al brazo izquierdo y R al derecho. El cromosoma X y el cuarto cromosoma tienen un brazo izquierdo muy grande y casi no tienen brazo derecho. El cromosoma 4 es alrededor de 1/5 del largo, respecto a los otros.

La determinación del sexo en *Drosophila* depende de la razón de los cromosomas X a los grupos autosomales. En los machos, un X con 2 grupos autosomales (II y III) da una razón de 0,5, mientras las hembras tienen una razón de 1,0. El cromosoma Y contiene pocos genes y no es requerido para la mayor parte de los aspectos del desarrollo del macho, siendo necesario solo para el movimiento de los espermatozoides.

Algo importante para trabajar en genética de mosca y poder mantener las mutaciones o transgenes por generaciones, es que los machos no sufren recombinación meiótica y en el caso de las hembras, que sí son capaces de realizarla, es posible evitar las consecuencias de ésta, mediante el uso de **cromosomas balanceadores**. Los cromosomas balanceadores son cromosomas cuya secuencia está tan reordenada (por inversiones y translocaciones), que el resultado de cualquier recombinación meiótica que ocurra durante la ovogénesis no es viable, asegurando la transmisión del cromosoma homólogo intacto a la siguiente generación. Además, tienen un marcador dominante fácilmente reconocible. Existen balanceadores para los cromosomas X, 2 y 3.

Otros rearrreglos que pueden poseer los cromosomas son: inversiones, translocaciones, cromosomas compuestos (dos brazos del mismo tipo unido a un centrómero), deficiencias (también llamadas deleciones, en el cual dos quiebres de doble hebra ocurren en el mismo cromosoma y el evento de reparación excluye el trozo escindido) y duplicaciones.

Los cromosomas politénicos de las glándulas salivales tienen patrones de bandeo distintivos. Esto hizo posible, en los inicios, poder correlacionar las posiciones de los genes con marcas físicas del cromosoma y determinar los puntos de quiebre de los rearrreglos. A partir del bandeo establecido en las glándulas salivales, cada uno de los brazos de los cromosomas fue dividido en 20 segmentos: 1-20 para el X, 21-40 para 2L, 41-60 para 2R, 61-80 para el 3L y 81-100 para el 3R. El cromosoma 4 está

dividido en las regiones 101-104. Cada región esta subdividida en regiones más pequeñas, denominadas con letras (A, B, C, D, E) (Greenspan, 2004).

1.2. Sistema Gal4/UAS.

El sistema Gal4/UAS, usa el factor de transcripción Gal4 para dirigir la expresión de los constructos que están acoplados a la secuencia activadora UAS (*Upstream Activating Sequence*) (Brand y Perrimon, 1993). Moscas que contienen la mayoría de los constructos mencionados están disponibles como recursos para la comunidad a través de distintos centros de *stocks* localizados en múltiples lugares del mundo (*BDSC, Bloomington Drosophila Stock Center; VRDC, Vienna RNAi Drosophila Center*).

1.3. Nomenclatura.

Posiblemente la forma más fácil de entender la nomenclatura de *Drosophila* es con un ejemplo (el ejemplo es utilizando el sistema UAS/Gal4).

$$\frac{y\ w}{w}; \frac{+}{UAS - p115i}; \frac{hh - gal4, UAS - mCD8 :: GFP}{UAS - p35}$$

Tenemos los cromosomas X; 2; 3, la línea horizontal separa a los cromosomas homólogos. El signo (+) se refiere a que ese cromosoma es silvestre. *y* es la mutación recesiva *yellow*, que produce que la cutícula del animal tenga un color amarillo. *w* corresponde a la mutación recesiva *white*, que produce moscas de ojos blancos. Muchos de los transgénicos realizados en *Drosophila* llevan como marcador un *mini-white*, que da distintos tonos de ojos dependiendo del lugar de inserción. En este caso *hh-gal4* localizado en el cromosoma 3, produce la expresión de Gal4 en el compartimiento posterior del ala, el cual va a activar la transcripción de lo que esta rio debajo de los UAS: el RNA interferente contra p115, la proteína fluorescente de membrana CD8::GFP y la proteína inhibidora de la apoptosis p35 en estas células.

2. MATERIALES BIOLÓGICOS.

2.1. Animales y su mantención.

A 25°C el ciclo de vida de la mosca del vinagre (*D. melanogaster*) tarda aproximadamente 10 días (Figura 4). La embriogénesis y los primeros dos estadios larvarios demoran un día cada uno; el tercer estadio larvario, dos días; y los estadios pupales de 4 a 5 días. A los dos días de la eclosión, las hembras adultas comienzan a poner huevos fertilizados. Las cepas se mantienen a 17°C en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con 50 g/L harina, 100 g/L levadura fresca, 11 g/L agar-agar, 80 g/L azúcar (dextrosa monohidratada), 6 mL/L ácido propiónico y 1,56 g/L nipagin (bactericida). Todos los experimentos se realizaron a 25°C, a menos que se indique de otra forma.

2.2. Cepas de *Drosophila melanogaster*.

Se utilizaron animales adultos y larvas de tercer estadio (L3) de *Drosophila melanogaster* de la cepa *yellow white* (*yw*) y de otras cepas transgénicas (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas UAS de *D. melanogaster* usadas en la presente tesis.

Nombre	Origen	Aplicación
UAS-HA::p115	Transgénico creado en el laboratorio (esta tesis)	Sobre-expresión de p115, fusionado con el epítipo HA. Inserciones en el cromosoma II y III.
UAS-p115 ^{GD}	VRDC #44510	Pérdida de función de p115 mediante RNAi de horquilla.
UAS-p115 ^{KK} /CyO	VRDC #103350	Pérdida de función de p115 mediante RNAi de horquilla. Inserción letal.
UAS-Grasp65i (III)	BDSC #34082	Pérdida de función de Grasp65i mediante de horquilla.
UAS-Cdk1::myc (III)	BDSC #6638	Sobre-expresión de Cdk1, fusionado con el epítipo 6xmyc. (Mayer y col., 2000)
UAS-p35 (III)	BDSC #5073	Expresión de la proteína de baculovirus p35, inhibidor de apoptosis.
UAS-dcr (X)	BDSC #24648	Sobre-expresión de la proteína Dicer, RNasa III que aumenta el procesamiento de los interferentes.

Tabla 2. Cepas Gal4 de *D. melanogaster* usadas en la presente tesis.

Nombre	Utilidad
<i>engrailed-Gal4 (en-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en el compartimiento posterior del disco imaginal.
<i>hedgehog-Gal4 (hh-Gal4)</i> , <i>UAS-GFP/TM6b</i>	Expresión de Gal4 y GFP (obtenida por recombinación meiótica) en el compartimiento posterior del disco imaginal.
<i>Cg25C-Gal4 (Cg-gal4)</i>	Expresión de Gal4 en hemocitos y cuerpo graso (zonas donde se expresa el colágeno IV).
<i>nubbin-Gal4 (638-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en la región presuntiva de ala.
<i>daughterless-Gal4 (da-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 ubicua
<i>pannier-Gal4 (pnr-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en la región presuntiva del notum.
<i>Glass Multimer Reporter (GMR-Gal4)</i>	Expresión de Gal4 en los fotorreceptores
<i>CD8::GFP; Act>CD2>Gal4</i>	Generación de tejidos mosaicos que expresan Gal4 controlado por el promotor de actina mediante clones <i>FLPout</i> .

Tabla 3. Cepas obtenidas por recombinación meiótica realizadas en la presente tesis

Nombre	Utilidad
<i>en>p115^{KK}</i>	Expresión del interferente de p115 (KK) en el compartimiento posterior del disco imaginal, Utilizado para la búsqueda de supresores e incrementadores del fenotipo del interferente de p115.

Tabla 4. Cepas obtenidas por segregación de cromosomas realizadas en la presente tesis

Nombre	Utilidad
<i>eyeless-FLP (ey-FLP) /CyO;</i> <i>Act>CD2>Gal4/TM6b</i>	Expresión de la flipasa en toda la cabeza del insecto induciendo la activación de Gal4 a través de la escisión de CD2
<i>UAS-p115^{KK}; UAS-p35/T(2;3)</i> <i>SM6a, Cy, TM6b, Tb</i>	Co-expresión del inhibidor de la apoptosis proteína de baculovirus p35 e interferente de p115 (KK)
<i>UAS-p115^{KK}; UAS-Cdk1::myc/</i> <i>T(2;3) SM6a, Cy, TM6b, Tb¹</i>	Co-expresión de Cdk1::myc e interferente de p115 (KK).
<i>UAS-dcr; UAS-p115^{KK}/CyO;</i> <i>Act>GFP</i>	Co-expresión de Dicer e interferente de p115 (KK)
<i>y hsp70-FLP ^{f⁰}; CD8-GFP/</i> <i>CyO; Act>CD2>Gal4/+</i>	Expresión de la flipasa en inducida por calor (37°C) activando la expresión de Gal4 a través de la escisión de CD2

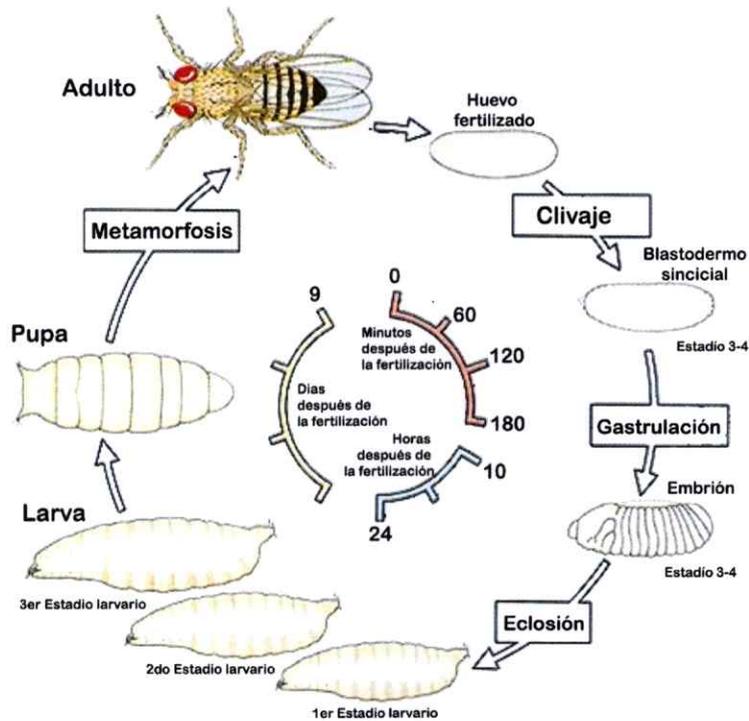


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Hay cuatro estadios en el ciclo de vida de la mosca del vinagre: huevo, larva, pupa y adulto. Entre cada estadio larvario ocurren periodos de muda. En el pupario es donde ocurre la metamorfosis. A 25°C, *D. melanogaster* producirá nuevos adultos en aproximadamente 10 días. La vida de la mosca puede durar varias semanas. (Wolpert y cols., 1998).

Tabla 5. Otras cepas de *D. melanogaster* usadas en la presente tesis

Nombre	Utilidad
<i>yellow white</i>	Marcadores recesivos <i>yellow</i> (cuerpo) y <i>white</i> (ojos).
<i>w; ii/CyO; MKRS/TM6b</i>	Balaceador de los cromosomas II y III.
P{lacW}p115 ^{G0306}	Alelo P presente en el 5'UTR de p115, <i>promoter-trap</i> acoplado a la expresión de β -galactosidasa
<i>Df(1)ct4b1/Binsn</i>	Déficiencia en la región genómica 7B2-7C4

3. REACTIVOS, SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES.

3.1. Reactivos.

De Abcam (Cambridge, Massachusetts, EEUU). Anti-GM130 policlonal conejo (ab30637).

De Alpha DNA (Montreal, Canadá). Partidores 3' BGHR y 3' myc.

De Becton Dickinson and Co. (Franklin Lakes, New Jersey, EEUU). Peptona, bacto-triptona, extracto de bacto-levadura.

De Calbiochem (Darmstadt, Alemania) Anti-conejo-HRP (DC03L) Anti-ratón -HRP (DC02L), Anti-KDEL monoclonal ratón (10C3) (420400), Tween-20

De Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, EEUU). Anti-Caspasa 3 clivada policlonal conejo (9661). Anti-Cdk1 fosforilado (Y15) policlonal conejo (9111).

De Corn Products (Santiago, Chile). Dextrosa monohidratada.

De Dako (Glostrup, Dinamarca) Anti-Bromodeoxiuridina monoclonal ratón (M0744)

De Fermentas (Glen Burnie, Maryland, EEUU). dNTP, MgCl₂, marcador de peso preteñido para proteínas "Page Ruler Plus" (SM1811), agarosa grado analítico, enzimas de restricción (SacII, PvuI).

De Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, Iowa, EEUU). Anti-E-Cadherina monoclonal ratón (5D3).

De Insumos Químicos Nacionales (Santiago, Chile). Nipagin

De Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU). DNA polimerasa Taq Platinum® (alta fidelidad), Anti-ratón 488 (A11001), Anti-ratón 568 (A11004), Anti-ratón 647 (A21235), Anti-conejo 488 (A11008), Anti-conejo 568 (A11011), Anti-conejo 633 (A21086), Topro-3 iodide 642 (T3605).

De Invitrogen (Sao Paulo, Brasil). DNA polimerasa Taq, partidores (M13F, M13R, pUAS-s, pUAS-a). Reactivos para el sistema Gateway® de clonamiento: LR clonasa, pENTR-TOPO

De Lefersa (Santiago, Chile). Levadura fresca.

De Merck (Darmstadt, Alemania). Bromuro de etidio, glicerol, isopropanol, Tween-20, paraformaldehído, ácido acético, EDTA.

De Millipore (Billerica, Massachusetts, USA) Anti Cdk1 policlonal conejo

De Mont Blanc (Victoria, Chile). Harina sin polvos de hornear.

De Omega Bio-tek (Norcross, Georgia, EEUU). Set para mini preparaciones "E.Z.N.A."

De Pierce (Rockford, Illinois, EEUU) Inhibidor Halt de proteasas y fosfatasas. Super West Pico ECL (enhanced chemiluminescence)

De Promega (Madison, Wisconsin, EEUU). Wizard SV Gel and PCR Clean-up (A1330), RT-PCR Improm II (A3800).

De Roche (Indianapolis, Indiana, EEUU). In situ Cell Death Detection Kit, TMR red (12156792910).

De Sanderson (Santiago, Chile). Agua bidestilada libre de nucleasas.

De Santa Cruz Anti actina monoclonal ratón, Anti HA monoclonal ratón

De Sigma (St Louis, Missouri, EEUU). Aceite Halocarbon 700, Triton X-100, Faloidina-TRITC (P1951), anticuerpo HA conejo, bolitas de agarosa acopladas a anticuerpo myc conejo, kanamicina, persulfato de amonio.

De TCL (Santiago, Chile). Algodón hidrofóbico.

De Quality Biological (Gaithersburg, Maryland, EEUU). Tampón de carga para DNA 5X.

De Upstate. Anti fosfohistona H3 policlonal conejo

De Vector Labs (Burlingame, California, EEUU). Medio de montaje para fluorescencia "Vectashield".

De Watt's (Santiago, Chile). Néctar de manzana.

De Winkler (Santiago, Chile). Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, marcador de peso molecular para DNA 1Kb, NaCl, CaCl₂, ampicilina. Acrilamida/Bisacrilamida 29:1, Albúmina de suero bovino (BSA), TEMED.

3.2. Soluciones.

3.2.1. Soluciones para métodos de biología molecular.

- Medio Luria-Bertani (bacto-triptona 10 g/L, extracto de bacto-levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L)
- Agar Luria (medio LB más agar-agar 15 g/L)
- TAE 50X (242 g/L Tris; 57,1 mL/L ácido acético concentrado; 200 mL/L EDTA 0,5M)
- EDTA 0,5 M pH 8

3.2.2. Soluciones para otros métodos.

- PBS 10X (NaCl 1,3 M, Na₂HPO₄ 0,07 M, NaH₂PO₄, 0,03 M pH 7)
- Tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%)
- Reactivo de Bradford (Coomasie Blue G 0,5 mg/mL, metanol 25%, H₃PO₄ 42,5%)
- Tampón de Carga para proteínas 5X (Tris-HCl pH 6,8 0,312 M, SDS 10%, b-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05%)
- Tris HCl 1M pH 8,8 y pH 6,8
- Tampón de corrida (Tris HCl 25 mM pH 8,8, Glicina 192 mM, 0,1% SDS)
- Tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM pH 7,4, glicina 39 mM, metanol 20%)
- TBS 10X (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, NaCl 1,5 M)
- TTBS 0,1% Tween-20 (TBS 1X, 0,1% Tween-20)
- Persulfato de amonio 10%

3.2.3. Otros materiales.

De A. Dumont & Fils Switzerland. Pinzas N°5 no magnéticas.

De BioRad. Vidrios y sistema para separación por electroforesis de proteínas e inmunoblot.

De Delta Lab (Barcelona, España). Porta objetos 26x76mm 1mm de espesor.

De Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, EEUU). Capilares de vidrio borosilicato 1,00 mm O.D. x 0,78 mm I.D.

De Orange Scientific. Placas plásticas de 96 pocillos.

De Fuji Film. Películas Rayos-X Super HR-U 100 NIF.

De Marienfeld (Lauda-Königshofen, Alemania). Cubreobjetos 24x24mm.

De Maybelline (New York, EEUU). Esmalte de uñas transparente.

4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR BACTERIANA.

4.1. Medios y condiciones de cultivo bacteriano.

Las bacterias XL-1 quimiocompetentes se cultivaron a 37 °C en forma aeróbica en medio Luria-Bertani (LB). También se realizaron cultivos en agar Luria (AL). Los antibióticos se utilizaron en los medios de selección a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) 100 µg/mL y kanamicina (Kan) 50µg/mL.

4.2. Transformación bacteriana.

A 30 µL de bacterias quimiocompetentes descongeladas en hielo se agregaron 270 µL de CaCl₂ 1M, y se utilizaron 100 µL de esta mezcla para cada transformación. Se añadieron 0,2 – 1 µg de DNA plasmidial, se incubó 30 minutos en hielo y luego se realizó un *shock* térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias se recuperaron en medio LB a 37°C durante 30 minutos con agitación, luego se centrifugaron y plaquearon en AL con antibiótico. Se incubaron O/N a 37°C.

4.3. PCR de colonias.

Para corroborar la transformación bacteriana y además conocer el sentido de orientación del inserto clonado, se realizó una reacción de polimerasa en cadena (PCR, *polymerase chain reaction*) de colonias con el siguiente protocolo:

	µL
H ₂ O	8
Tampón 10x	1
MgCl ₂ (25 mM)	0,3
dNTP (10 mM)	0,2
Partidor 1 (100 mM)	0,2
Partidor 2 (100 mM)	0,2
DNA polimerasa Taq	0,1
Volumen total	10

Los volúmenes corresponden a una reacción, se realizó al menos una reacción por colonia y un control negativo. Los partidores utilizados para estas reacciones se

encuentran en la tabla 4. Para agregar el DNA templado a estos 10 μL totales, se picó una colonia directamente desde la placa de AL. A la vez se preparó una réplica de las colonias en otra placa de AL con el antibiótico de selección que se cultivó a 37°C durante 6 horas. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Tabla 6. Partidores utilizados en PCRs y/o secuenciación de las construcciones.

Nombre	Secuencia (5' - 3')
M13F	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13R:pUC	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
pUAST-s	TGAATCAATTAAAAGTAACCAGC
pUAST-a	CAATTCATCAGTTCCATAGGTTTG
CG1422s1F	CAGCTATATCCAGCGATTGTCCG
CG1422s2F	CTACCTGACCGCTCAACTTTG

4.4. Extracción de DNA plasmidial.

Para la extracción de plásmidos se utilizó el sistema comercial *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep* de Omega Bio-Tek, siguiendo el protocolo de los fabricantes. En breve, se centrifugó un cultivo de 5 mL crecido a 37°C O/N en LB con antibiótico, el cual se resuspendió en 250 μL de solución de resuspensión con RNAsa A, luego se añadieron 250 μL de la solución de lisis y, seguido de una breve incubación a TA, se añadieron 350 μL de solución neutralizadora y se centrifugó durante 10 minutos a TA. El lisado clarificado se transfirió a una columna equilibrada con 100 μL de tampón de equilibrio y se centrifugó durante 1 minuto. Se lavó la columna con 500 μL de tampón HB y luego con 700 μL de tampón de lavado de DNA diluido en etanol 70%. Finalmente, el DNA plasmidial se eluyó con 50 μL de agua destilada y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.5. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa al 1% para visualizar DNA o al 2% para visualizar RNA en tampón TAE 1X con bromuro de etidio (0,25 - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las muestras de interés se mezclaron con el tampón de carga y luego se cargaron en el gel en paralelo con un marcador de peso molecular de 1 Kb. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15 - 45 minutos. Las bandas de DNA o RNA se visualizaron y se fotografiaron en un transiluminador UV.

4.6. Digestión con enzimas de restricción.

Para realizar cortes enzimáticos se usaron 0,5 - 3 μg de DNA plasmidial, 0,5 - 2 μL de enzima(s) de restricción y la cantidad adecuada (10% del volumen total) de tampón correspondiente a la(s) enzima(s) en un volumen total de 20 - 30 μL completados con agua destilada. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas. Luego, se confirmó la digestión mediante electroforesis de DNA en geles de agarosa.

4.7. Construcción de pTHW-HA::p115 (ganancia de función).

Para la generación de la construcción para realizar la ganancia de función de p115, se utilizó el sistema de recombinación Gateway. Este se basa en el uso de la integrasa de fago lambda para recombinar el marco de lectura abierto del gen de interés, flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2 en el vector de entrada con los sitios attR1 y attR2 del vector de destino. El resultado es un intercambio del marco de lectura abierto del gen de interés con el casete que contiene el gen *ccdB* (el producto de este gen es tóxico para *E. coli* estándar de laboratorio) en el vector de destino. Los clones de expresión exitosamente recombinados pueden ser seleccionados en base a su resistencia a ampicilina y la falta de toxicidad a las cepas de *E. coli* estándar de laboratorio.

En *Drosophila* existe una librería de vectores pUAST (y otros) con diferentes epítopos y proteínas fluorescentes para generar fusiones en el N-terminal y C-terminal de la proteína de interés, utilizando este sistema. En este caso, se utilizó un pUAST con el epítipo HA en el N-terminal (pTHW) para generar una ganancia de función de la proteína p115, el cual fue amplificado en cepas de *E. coli* DB 3.1 (resistentes al producto del gen *ccdB*)

Para la creación del clon de entrada: pENTR/D-TOPO p115, se diseñaron partidores para amplificar la secuencia codificante de CG1422 a partir de DNA genómico. El partidor GW1422F posee la secuencia CACC para su clonamiento orientado en el vector pENTR/D-TOPO, esta secuencia también funciona como secuencia *kosak* para el inicio de la traducción (Tabla 7).

Tabla 7. Partidores diseñados para la construcción de la ganancia de función (pTHW HA::p115).

Nombre	Secuencia (5' - 3')
GW1422F	CACCATGGAGTTCCTGAAGAGTGGC
GW1422R	TTCCTGCTGGCGGTGCCACTTGG

La amplificación de la secuencia codificadora se realizó según la siguiente PCR:

	μL
Tampón 10X con MgCl_2	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Partidor 1 (100 mM)	0,75
Partidor 2 (100 mM)	0,75
DNA templado (minipreparación 1:50)	1
H_2O	19
Taq de alta fidelidad	0,5
Volumen total	25

El programa de amplificación fue el siguiente:

	$^{\circ}\text{C}$	t (min)	
Desnaturación	94 $^{\circ}$	3	
Amplificación	94 $^{\circ}$	1	30 repeticiones
	50 $^{\circ}$	0,67	
	72 $^{\circ}$	1	
Elongación final	72 $^{\circ}$	7	
Término	16 $^{\circ}$	-	

El producto amplificado fue ligado a pENTR/D-TOPO según las instrucciones del fabricante.

La orientación del inserto fue comprobada mediante PCR de colonia y cortes con enzimas de restricción (SacII y PvuI).

Para la reacción de recombinación con el vector de destino (pTHW) se utilizó el kit *LR Clonase Plus II* de Invitrogen. En un tubo de centrifuga de 1,5 mL. se mezcló lo siguiente:

Clon de entrada (pENTR/D-TOPO p115)	10 fmoles (1 μL)
Clon de destino (pTHW)	20 fmoles (2 μL)
TE 1X pH 8,0	Para completar 8 μL

Se descongeló la enzima clonasa en hielo. Se vortexeó el mix de enzima y se añadieron 2 μ L sobre la mezcla de vector entrada-destino. La reacción se incubó durante 16 horas a 25°C. Posteriormente, se añadió 1 μ L de proteínasa K, la cual se incubó por 10 minutos a 37°C. Se transformaron 4 μ L de la reacción en bacterias competentes comerciales (TOP10).

Se comprobó la correcta inserción y fusión con el epitopo HA de p115 a través de cortes con enzima de restricción (HindIII) y secuenciación.

Tabla 8. Plásmidos utilizados en esta tesis

Nombre	Fuente	Descripción
pTHW	The Drosophila Vector Gateway collection	Vector pUAS-T modificado con un casete Gateway (sitios attL-attR) y un epitopo HA en el N-terminal
pENTR/D-TOPO	Invitrogen	Vector de entrada para el sistema Gateway

4.8. Secuenciación de la construcción.

Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmidial y se enviaron junto con los partidores respectivos (Tabla 6) a Macrogen (Seúl, Corea) para su secuenciación. La concentración de las minipreparaciones se estimó utilizando un equipo Nanodrop (Nanophotometer, Implen). La información de las secuencias obtenidas se analizó con Serial Cloner 2.1.

5. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES PARA *D. melanogaster*.

5.1. Extracción de DNA genómico a partir de individuos adultos.

Se homogenizaron 15 moscas adultas en un tubo de centrifuga de 1,5 mL con 400 μ L de tampón de extracción (Tris HCl 0,1M pH 7,5, EDTA 0,1M pH 8,0, NaCl 0,1M, SDS 0,5%). Se incubó durante 30 minutos a 65°C. Se añadió 800 μ L de LiCl 4,2M/KAc 1,4M e incubó 10 minutos en hielo. Se centrifugó durante 15 min a 13000 x g a temperatura ambiente. Se repartió 1 mL del sobrenadante en dos tubos de centrifuga de 1,5 mL nuevos (500 μ L cada uno), al cual se le añadió 400 μ L de isopropanol. Se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado

se lavó con 500 μL de etanol 70% frío. Se centrifugó 5 minutos a 13000 x g y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejan secar y se resuspenden en 50 μL de agua. El DNA fue almacenado a -20°C hasta su uso en la amplificación de la región codificante de *p115*.

5.2. Extracción de RNA total de larvas.

Se homogeneizaron 5 larvas de estadio 3 en tubos de centrifuga de 1,5 mL en 100 μL Trizol en hielo. Se centrifugó a 13.670 x g durante 10 minutos a 4°C . Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se incubó a TA durante 20 minutos. Se añadieron 20 μL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó a TA durante 2 minutos. Se centrifugó a 9.500 x g durante 15 minutos a 4°C , se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron 50 μL de isopropanol y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 9.500 x g durante 10 minutos a 4°C , luego se lavó el precipitado con 100 μL etanol 75%, se dejó secar a TA y el RNA se resuspendió en 10 μL de agua libre de RNAsa. El RNA almacenó a -80°C hasta su uso.

5.3. Síntesis de cDNA y PCR semi-cuantitativa.

Se utilizó el sistema comercial RT-PCR Improm II de Promega y se siguieron las recomendaciones de los fabricantes. En resumen, se realizó una mezcla que contenía 2 μg de RNA total, 1 μL partidores al azar y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 5 μL . Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C y luego durante 5 minutos en hielo. Se realizó una mezcla de reacción de RT (*reverse transcription*) que contenía 4 μL tampón de reacción 5X, 3 μL MgCl_2 , 1 μL dNTPs, 1 μL RNAsin, 1 μL transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas para completar un volumen total de 15 μL . Se agregaron estos 15 μL de mezcla de RT a los 5 μL de mezcla de RNA con partidores y se realizó el siguiente programa:

	$^{\circ}\text{C}$	t (min)
Alineación	25	5
Extensión	42	60
Inactivación	70	15

La PCR se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

	μL
H ₂ O	19
Tampón 10X con MgCl ₂	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Partidor 1 (100 mM)	1
Partidor 2 (100 mM)	1
cDNA templado	3
DNA polimerasa Taq	0,5
Volumen total	27,5

Se extrajeron muestras de 5 μL en los ciclos número 20, 23, 26, 30 y 35, y fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa. En paralelo se realizó la misma PCR sin RT (con RNA como templado) como control negativo.

Tabla 9. Partidores utilizados para las PCR semi-cuantitativas

Nombre	Secuencia (5'-3')
CG1422F-RT	GGAGTTCCTGAAGAGTGG
CG1422R-RT	GACACCACTGCTCATCAG

5.4. Extracción de proteína total de larvas y discos imaginales.

Se colectaron 5 larvas en PBS 1X frío (en hielo) y luego se homogenizaron en 200 μL de tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fósforas (Pierce, USA). Se incubaron 10 min a 4°C y se centrifugaron a 14000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado en un segundo tubo de microcentrífuga y almacenado a -80°C. Para la obtención de proteínas desde discos imaginales, quince larvas de los diferentes genotipos fueron disectadas en PBS 1X extrayendo los discos (30 para inmunoblot - 400 en grupos de a 100 para la inmunoprecipitación). Estos fueron transferidos a un tubo con 50 μL de tampón de lisis (RIPA para la inmunoprecipitación) con inhibidores de proteasa y fosfatasa, incubados 10 min en hielo y almacenados a -80°C.

Se determinaron las concentraciones de proteínas por el método colorimétrico de Bradford, utilizando albumina de suero bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración.

5.5. Inmunoprecipitación de extractos proteicos

Extractos proteicos provenientes de 400 discos imaginales de genotipo: 638>HA::p115, Cdk1::myc y 638> HA::p115, GFP como control, fueron inmunoprecipitados utilizando bolitas de agarosa acopladas a anticuerpo contra myc (Sigma). Para esto 50 μL de bolitas fueron lavadas cuatro veces con PBS 1X con inhibidores de proteasa (Thermo) frío, para luego ser incubadas con los extractos proteicos a 4°C durante toda la noche con agitación. El sobrenadante fue almacenado para realizar el input de la inmunoprecipitación. Las bolitas junto a lo inmunoprecipitado fueron lavadas 5 veces con PBS 1X con inhibidores de proteasa (Thermo) frío, incubadas en 40 μL de buffer de carga 2X a 95°C por 5 minutos y cargadas en un SDS-PAGE para su análisis a través de inmunoblot.

5.6. Análisis de extractos proteicos mediante inmunoblot.

Los extractos proteicos fueron preparados en tampón de carga para electroforesis de proteínas a una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se incubaron a 95°C durante 5 minutos y mantuvieron en hielo hasta cargar el gel.

Se prepararon geles SDS-PAGE a diferentes concentraciones dependiendo de la proteína a analizar, siguiendo las indicaciones de Mellick y Rodgers, 2002:

Se cargaron entre 10 - 40 μg de proteína y 3 μL de marcador de peso molecular (Fermentas, PageRuler Prestained Molecular Weight Marker Plus SM1811). El gel fue sometido a electroforesis durante 15 minutos a 70V y durante 2 horas a 100V. Luego se realizó la transferencia a 400 mA durante 2 horas en tampón de transferencia utilizando membranas de nitrocelulosa 0,45 μm de poro (Whatman, USA). La membrana se tiñó con rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,1% (Sigma), ácido acético glacial 5%), para confirmar la ausencia de burbujas y que la transferencia de las proteínas ocurrió de forma adecuada. Las membranas se lavaron 3 veces con TTBS 0,1% (500 mL TBS 1X, 500 μL Tween-20). El bloqueo se realizó con 5% a 7% leche o BSA en TTBS 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) o toda la noche a 4°C con agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo deseado diluido en 1% a 5% leche o BSA en TTBS 0,1% durante 2 - 3 horas a TA o toda la noche a 4°C con agitación constante. Se lavó 3 veces con TTBS 0,1% con agitación y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en 1% a 5% leche o BSA en TTBS 0,1% durante 2 - 3 a

TA con agitación constante, para finalmente lavar 3 veces con TTBS 0,1% con agitación. Las membranas se almacenaron en TBS 1X a 4°C hasta su revelado.

Para el revelado, se incubó la membrana con partes iguales de los reactivos A y B del kit de ECL (Pierce, Super West Pico ECL (enhanced chemiluminescence)) durante 1 minuto. Luego se eliminó el exceso de reactivo de la membrana, y se coloca entre plástico. Las películas para rayos X se expusieron entre 1 – 15 minutos y fueron reveladas utilizando máquina para revelado (AGFA).

Tabla 10. Anticuerpos primarios usados en inmunoblot.

Anticuerpo primario	Bloqueo	Dilución para Inmunoblot
Anti epitopo HA (F-7) (sc-7392, Santa Cruz) ratón, monoclonal	5% leche en TTBS 0,1%	1:1000
Anti-Cdk1/Cdc2 (PSTAIR) (06-923, Millipore) conejo, policlonal	5% leche en TTBS 0,1%	1:1000
Anti cdc2-P (Tyr15) (9111; Cell Signaling) conejo, policlonal	5% BSA en TTBS 0,1%	1:500
Anti-β-actina (Santa Cruz) ratón, monoclonal	5% leche en TTBS 0,1%	1:1000
Anti-p115 (NN7) (regalo del Dr. Martin Lowe) conejo policlonal	5% leche en TTBS 0,1%	1:1000

Tabla 11. Anticuerpos secundarios usados en inmunoblot.

Anticuerpo secundario	Dilución para Inmunoblot
Anti-conejo-HRP (DC03L, Calbiochem)	1:1000
Anti-rabbit-HRP (DC02L, Calbiochem)	1:1000

5.7. Inmunofluorescencia y microscopia confocal.

Para cada experimento, se disectaron bajo lupa 10-15 larvas de estadio tres (que aun estén en la comida) en PBS 1X utilizando pinzas, tardando como máximo 30 minutos y manteniendo las carcasas en hielo. Luego las carcasas se fijaron en 500 µL de PFA (paraformaldehído) 4% en PBS durante 20 minutos a TA, se lavaron 3 veces durante 5 minutos con solución de lavado (PBS 1X, 0,3% Triton X-100), se bloquearon por al menos 1 hora en solución de bloqueo (PBS 1X, 1% BSA, 0,3% Triton X-100) y se incubaron con anticuerpo primario (Tabla 11) diluido en solución de bloqueo a 4°C O/N sin agitación. Se lavaron 4 veces durante 20 minutos cada una, se bloquearon una hora y se incubaron con anticuerpo secundario (Tabla 12) diluido en solución de bloqueo durante 2 horas a TA con agitación. En algunos casos se realizaron tinciones

de F-actina con Faloidina-TRITC (Sigma) para visualizar el citoesqueleto de actina y de DNA con Topro-3 (Invitrogen) para visualizar los núcleos (Tabla 13). Finalmente se lavaron 3 veces durante 15 minutos con solución de lavado. Los discos imaginales de ala y las glándulas salivales se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories), y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Las muestras se guardaron a 4°C para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

Las imágenes confocales se capturaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta con objetivo 20x para discos imaginales de ala y aumento digital de 0.7 para glándulas salivales. Para observar las células presentes en los discos, se utilizó un aumento de 63X y aumento digital de 3.9. Se analizaron utilizando LSM Image Browser Versión 4.2.0.121, ImageJ y Adobe Photoshop Versión CS5.

Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución para Inmunofluorescencia
Anti-E-cadherina: rata, monoclonal	DSHB	1:100
Anti-Fosfohistona H3: conejo, policlonal	Upstate	1:500
Anti-Caspasa 3 clivada: conejo, policlonal	Cell Signaling	1:100
Anti-Bromodeoxiuridina: ratón, monoclonal	Dako	1:200
Anti-GM130: conejo, policlonal	Abcam	1:1000
Anti-epitopo HA: ratón, monoclonal	Santa Cruz	1:500
Anti-epitopo HA: conejo, policlonal	Sigma	1:500
Anti- α -tubulina: ratón, monoclonal	Sigma	1:100
Anti- γ -tubulina; ratón, monoclonal	Sigma	1:100

Tabla 13. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo secundario	Dilución para Inmunofluorescencia
Anti-ratón AlexaFluor 488 (A11001, Invitrogen)	1:200
Anti-ratón AlexaFluor 568 (A11004, Invitrogen)	1:200
Anti-ratón AlexaFluor 647 (A21235, Invitrogen)	1:200
Anti-conejo AlexaFluor 488 (A11008, Invitrogen)	1:200
Anti-conejo AlexaFluor 568 (A11011, Invitrogen)	1:200
Anti-conejo AlexaFluor 633 (A21086, Invitrogen)	1:200

Tabla 14. Otros tintes

Tinte	Dilución para Inmunofluorescencia
Faloidina-TRITC (P1951, Sigma)	1:200
Topro-3 yoduro 642 (T3605, Invitrogen)	1:200

5.8. Detección de la replicación del DNA a través de bromodeoxiuridina.

Se disectaron seis larvas de tercer estadio para los distintos genotipos analizados. Estas se incubaron en un tubo de centrifuga de 1,5 mL en PBS 1X con 0,05 mM de bromodeoxiuridina durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente fueron fijados con solución de Carnoy (Etanol 100%:Acido acético glacial 3:1) durante 15 minutos y lavados 4 veces con PBT (PBS 1X, 0,3% Triton X-100). Se denaturó el DNA incubando con HCl 2N durante 1 hora a TA. Para neutralizar se añadió una gota de tetraborato de sodio 100 mM, procediéndose a lavar 5 veces con PBTW (PBS 1X, 0,1% Tween-20) y se incubaron con anticuerpo contra bromodeoxiuridina diluido en solución de bloqueo a 4°C O/N sin agitación. Se lavaron 4 veces durante 15 minutos cada una en solución de bloqueo y se incubaron con anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 2 horas a TA con agitación. Finalmente se lavaron 3 veces durante 15 minutos con solución de lavado. Los discos imaginales de ala y ojo (como control) se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories), y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Las muestras se guardaron a 4°C para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

5.9. Determinación de la muerte celular a través de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

La técnica de TUNEL es un método común para detectar la fragmentación del DNA que resulta de la activación de cascadas de señales apoptóticas. Este ensayo detecta la presencia de cortes en el DNA, los cuales pueden ser identificados por la transferasa de deoxinucleótidos terminales, una enzima que cataliza la adición de dUTPs que están secundariamente marcados en este caso con un fluoróforo (tetrametil-rodamina). También puede marcar células que han sufrido daño severo al DNA.

Se disectaron ocho larvas del tercer estadio temprano de los genotipos analizados. Se fijaron en PFA al 4% y lavadas posteriormente 3 veces con PBS 1X. Se

permeabilizó el tejido mediante una incubación con citrato de sodio 0,1% - Triton X-100 0,3% durante 30 minutos a 65°C. Se lavó 3 veces con PBS 1X. Para la reacción de TUNEL se ocupó el kit "*In Situ Cell Death Detection Kit*" (Roche) según las instrucciones del fabricante. En este se mezclan una parte de solución de enzima en 9 partes de solución de marcaje, usándose 50 μ L de esta mezcla por cada genotipo. Esto se incubó durante 1 hora a 37°C, se lavó tres veces con PBS y se procedió al paso de bloqueo de inmunofluorescencia. Como control positivo se usaron larvas *SalP>Hep^{act}/CyO*, las cuales presentan una muerte celular masiva en la región central del área presuntiva de ala y como control negativo se añadió sólo la solución de marcaje en larvas de este mismo genotipo.

5.10. Citometría de flujo (Neufeld y col. 1998).

Se disectaron quince larvas de tercer estadio temprano para las distintas proteínas e interferentes expresados en el compartimiento posterior del disco imaginal de ala junto a GFP, lo cual nos permite separar la población control (GFP negativo).

Se desprendieron con pinzas los discos imaginales de ala, retirándose cuidadosamente las tráqueas y estos fueron transferidos a un tubo de centrifuga de 1,5 mL con 500 μ L de Tripsina/EDTA 10X (Sigma) y 10 μ M de DRAQ5 (Biostatus, tinción de DNA en rojo lejano, 1 μ L). La disociación de las células se llevo a cabo a 25°C durante 2 horas con agitación. Para detener la acción de la Tripsina se añade suero fetal bovino al 2%. Las células son filtradas a través de una malla Nythal de 0,35 μ m, transferidas a un tubo de citómetro y llevadas inmediatamente para su análisis en un citómetro FACSCanto (BD, Laboratorio de Inmunología, Universidad de Chile). Se recogieron los parámetros de *forward scattering* (FSC, que refleja el tamaño celular), *side scattering* (SSC, que refleja la rugosidad celular), además de la fluorescencia en los canales de GFP y PerCP (rojo lejano, correspondiente al DNA).

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando la herramienta de comparación de poblaciones del programa FlowJo (TreeStar) respecto al tamaño celular (número de células vs. FSC) y al contenido de DNA (número de células vs. PerCP)

5.11. Obtención de hemocitos larvarios.

Para la obtención de hemocitos larvarios, estos se drenan desde las larvas con genotipo de interés rompiendo la cutícula con una pinza en 120 μ L de medio Schneider (Sigma) sobre un cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Estos se dejan adherir al cubreobjetos por 1 hora y 15 minutos. Luego se fijan con PFA 4% por 15 minutos y son lavados en placas de 24 pocillos con PBS 1X. Para permeabilizar las células se usa PBS 1X+Triton X-100 0,1% por 10 minutos y se lavan con PBS 1X. El bloqueo se realiza con PBS 1X+BSA 1% durante mínimo una hora. El anticuerpo primario (Tabla 14) es disuelto en PBS 1X+BSA 1% incubándose las células toda la noche. Al día siguiente, se lavan 1-3 veces con PBS 1X durante 5 minutos. El anticuerpo secundario se incuba (1:150) en PBS 1X+BSA 1% durante 2 horas. Posteriormente para marcar los núcleos se incuban con To-Pro3 (1:150) durante 20 min y se lavan 3 veces con PBS durante 10 minutos. Los cubreobjetos se montan con Vectashield en el portaobjetos y se sellan con esmalte de uñas. Finalmente, éstos se almacenan a 4°C hasta su visualización.

Tabla 15. Anticuerpos utilizados en hemocitos

Anticuerpo primario	Origen	Dilución para Inmunofluorescencia
Anti-GM130: conejo, policlonal	Abcam	1:1000
Anti-KDEL: ratón monoclonal	Calbiochem	1:200
Anti-epitopo HA: ratón, monoclonal	Santa Cruz	1:500

5.12. Análisis del tamaño celular en alas adultas.

Se fijaron hembras adultas con el genotipo de interés durante al menos dos horas en etanol 96%. Las alas izquierdas se disectaron y se montaron para análisis microscópico en portaobjetos con ácido láctico: etanol (1:1). En ellas se analizaron dos parámetros: tamaño del compartimiento posterior y número de células en un área definida (densidad celular) (Figura 5).

Para determinar el área del compartimiento posterior, las alas montadas se fotografiaron utilizando una lupa de disección Olympus MVX10 a 2.5x de aumento y una cámara digital Leica DFC300FX. Las imágenes se analizaron utilizando Adobe

Photoshop Extended Versión CS5. Los promedios del área del compartimento posterior en alas experimentales se normalizaron respecto al promedio de las alas control, y se graficó en porcentajes definiendo el control igual al 100%. Se graficó con la desviación estándar del cociente calculada con la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta C}{C} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$$

Siendo A, B, C los promedios; ΔA , ΔB , ΔC las desviaciones estándar; y $C = A/B$.

Durante el desarrollo del ala de *Drosophila*, cada célula forma un tricoma o pelo, por lo cual se puede estimar el número de células contando los tricomas presentes. Para esto, se fotografiaron las alas montadas con una cámara digital Leica DFC300FX usando un microscopio Zeiss IIRS. El número de células se determinó contando los tricomas en Adobe Photoshop CS5 en un área de 124410 píxeles (10 x 15 cm). Se graficaron los promedios y sus desviaciones estándar.

Para ambos parámetros cuantificados se realizaron ANOVA. Se consideró un valor $p < 0,001$ para la significancia.

6. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MOSCAS TRANSGENICAS.

Para realizar esta tesis fue necesario obtener animales transgénicos mediante el método de transformación de la línea germinal (Spradling y Rubin, 1982) para poder realizar determinar la especificidad de los fenotipos del interferente contra p115.

6.1. Transgénesis por transformación de la línea germinal.

La transgénesis es una tecnología que permite introducir un DNA – llamado transgen – en un organismo. La transgénesis en insectos se lleva a cabo mediante transposones. En *Drosophila*, uno de los transposones utilizados es llamado Elemento P. Éste, como otros elementos transposones, contiene dos repeticiones terminales necesarias para la movilización. Además del Elemento P, es necesaria una enzima llamada Transposasa P, que cataliza la transposición a través de las repeticiones terminales.

El sistema de transformación binario consiste en dos plásmidos que deben ser co-inyectados. Uno codifica la transposasa P, denominado “pHelper”, y el otro es un

pUAS-T que contiene el elemento P, el transgen y un marcador de selección dominante (Figura 6), indispensable para identificar los eventos de transposición. Éste genera un fenotipo visible que no afecta la viabilidad de las moscas. En este caso se utilizó el marcador de color de ojos *white*, uno de los más populares.

Las etapas tempranas del desarrollo de los embriones de *D. melanogaster* se caracterizan por divisiones nucleares rápidas que ocurren sin divisiones celulares, creando un sincicio celular. Antes de la celularización, se forman las células polares que se ubican en la zona posterior del embrión y que dan origen a la línea germinal. Para que ocurra la transmisión del transgen en la línea germinal, el DNA transgénico debe ser introducido a las células polares que están destinadas a convertirse en células germinales. Así el transgen integrado en las células polares puede ser transmitido de una generación (G0) a la siguiente (progenie G1) (Figura 7).

Cuando se usa una cepa parental mutante *white* y el marcador *white*, las moscas transgénicas de la progenie G1 presentan un color de ojos más oscuro, a la cual se llama *w⁺* (*white plus*). Los eventos transgénicos son identificados por la expresión del color de los ojos, cuyo rango va desde amarillo pálido a rojo intenso, dependiendo de la dosis del gen y del efecto de la posición en un fondo mutante *white*.

6.2. Preparación del DNA y microinyección.

Las mezcla de pTHW-p115 y pHelper a inyectar fue las siguiente: 1,5 μ g pTHW-p115 con 0,7 μ g pHelper. Se llevó a un volumen final de 90 μ L con H₂O, se añadieron 10 μ L acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 μ L etanol. La mezcla se incubó a -20°C O/N para permitir la precipitación del DNA. Se centrifugó a 13.670 x g durante 15 minutos y luego se resuspendió en 20 μ L de tampón de inyección (PBS 10 mM pH 7,8, KCl 5 mM). Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Los parámetros utilizados para obtener las agujas de microinyección fueron los siguientes: R= 351, H= 345, P= 55, V= 90, T/D= 80 y P= 500 en un *puller* (Sutter Instruments Co., Modelo P-97).

Se colectaron embriones de la línea *yellow white* (*yw*) cada 40 minutos desde placas de puesta (pulpa de manzana Watt's 280 mL/L, Nipagin 1,5 g/L, glucosa 25 g/L, agar 22,5 g/L) y se descorionaron en 50% hipoclorito de sodio comercial diluido en

agua. El tiempo de desecado fue de 5 minutos. Se cubrieron con aceite Halocarbon 700 y se microinyectaron en la zona posterior con la mezcla de plásmidos.

Los adultos generados a partir de los embriones inyectados se cruzaron de forma independiente con la cepa *yw*. De los insectos en los cuales ocurrió la inserción del transgen en la línea germinal, se obtuvo la progenie w^+ (de ojos rojos, naranjos o amarillos dependiendo del lugar de inserción). Éstos se cruzaron nuevamente de forma independiente con *yw* para ampliar el cromosoma con la inserción, y luego entre sí para hacerlos homocigotos. El cromosoma donde se insertó el transgen se mapeó usando machos de la línea *w; If/CyO; MKRS/TM6b* y estrategias genéticas estándar.

6.3. Mapeo cromosómico.

La inserción del transgen mediante transposición puede ocurrir en los cromosomas X, II ó III de la mosca. La probabilidad que ocurra una inserción en el cromosoma IV es muy baja debido a su pequeña longitud. Para diferenciar entre los cromosomas X se realizó el cruce:

$$\sigma w^+ \times \varnothing yw$$

Si sólo las hembras nacidas de este cruce son w^+ (de ojos coloreados), entonces la inserción está en el cromosoma X, ya que las hembras reciben el cromosoma X del padre. Si machos y hembras nacidas del cruce son w^+ , entonces la inserción ocurrió en el cromosoma II o III.

Para diferenciar entre estos cromosomas se utilizó la línea *w; If/CyO; MKRS/TM6b*. Esta línea porta 2 cromosomas balanceadores: *CyO* y *TM6b* y 2 con mutaciones dominantes *If* y *MKRS*. Un cromosoma balanceador es una herramienta genética usada para prevenir la recombinación genética (*crossing-over*) entre cromosomas homólogos durante la meiosis. Estos cromosomas tienen tres propiedades importantes: (1) suprimen la recombinación exitosa con sus homólogos, (2) portan marcadores dominantes fácilmente visibles y (3) afectan negativamente la capacidad reproductiva cuando son portados como homocigotos (Greenspan, 2004).

En el esquema de la Figura 8 se muestran los cruces realizados para el mapeo cromosómico. Del primer cruce nacen animales de cuatro genotipos diferentes (no mostrado) y se deben seleccionar aquellos que porten el transgen (indicado por el

marcador w^+) y balanceadores para los cromosomas II y III (*CyO* y *TM6b*, respectivamente). Para simplificar el esquema no se muestra el cromosoma X. Dentro de la gama de genotipos que se obtiene con el segundo cruce (no mostrado), si el transgen está en el cromosoma II, se encontrarán adultos homocigotos para el transgen (w^+/w^+ , de ojos rojos) más el balanceador del cromosoma III (*TM6b*) y sin el balanceador del cromosoma II (*CyO*). Por el contrario, si la inserción ocurrió en el cromosoma III, se encontrarán adultos homocigotos para el transgen (w^+/w^+ , de ojos rojos) más el balanceador del cromosoma II (*CyO*) y sin el balanceador del cromosoma III (*TM6b*).

6.4. Expresión regulada de *UAS-HA::p115* y *UAS-p115i* mediante el sistema UAS/Gal4.

Se utilizó el sistema UAS/Gal4 (Brand y Perrimon, 1993) para dirigir la sobre-expresión *in vivo* de *UAS-HA::p115*, así como de la inducción del RNA interferente contra p115 (*UAS-p115i*). Este sistema adaptado de levadura consta de un factor de transcripción llamado Gal4 que induce la expresión río abajo del promotor UAS. Gal4 no se parece a otras proteínas de *Drosophila* y sólo se une a la secuencia UAS, por lo que no afecta la expresión de otros genes. La eficacia del sistema es dependiente de temperatura, siendo baja a 18°C, media a 25°C y máxima a 29°C. Este sistema también permite la expresión de forma tejido y tiempo específicos. Es tejido-específica según el promotor/enhancer que utilizamos para expresar Gal4, y/o tiempo-específica si utilizamos un sistema termosensible o activable por *shock* térmico. En esta tesis se utilizaron principalmente promotores/enhancer de compartimiento posterior del ala (*engrailed-Gal4* y *hedgehog-Gal4*), lo cual permite tener al compartimiento anterior como control.

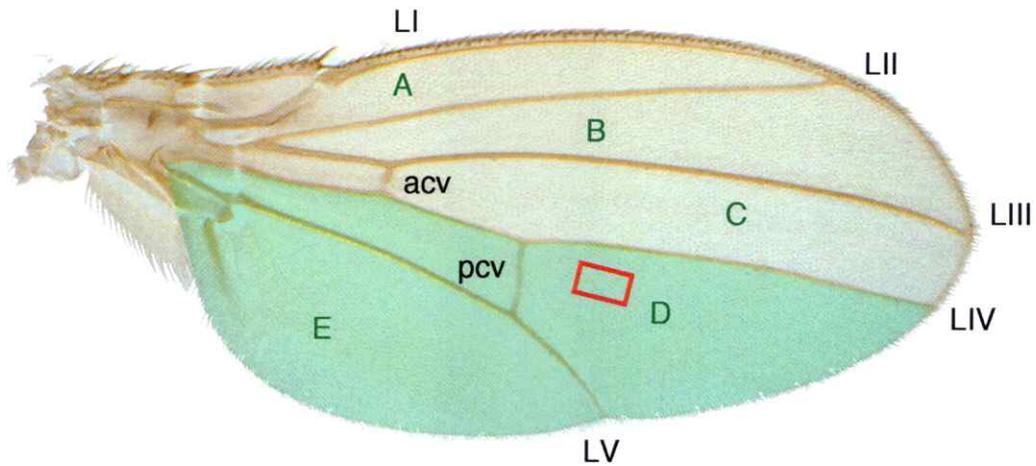


Figura 5. Anatomía del ala adulta de *Drosophila melanogaster*.

Se indican las cinco venas longitudinales formadas en una posición precisa a lo largo del eje A-P (numeradas de LI a LV) y las dos venas transversales, una anterior (acv, *anterior cross vein*) y una posterior (pcv, *posterior cross vein*). En letras verdes se indican los sectores presentes en el ala. En verde se encuentra indicada la zona considerada como compartimiento posterior y el rectángulo rojo corresponde al área en donde se contó el número de células para calcular la densidad celular (sector D).

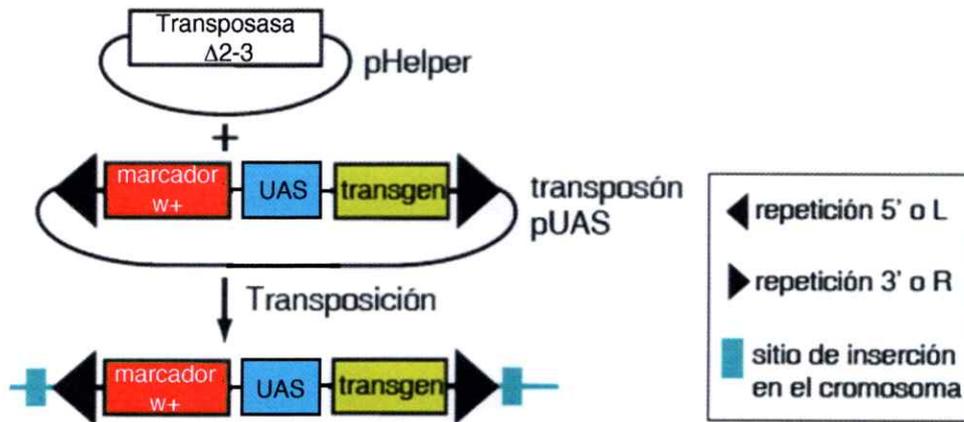


Figura 6. Sistema de transformación binario.

El plásmido pHelper porta la transposasa y el plásmido pUAS-T porta el transposón (con repeticiones 5' y 3'), el marcador dominante y el transgen. Luego de la transposición el marcador y el transgen quedan insertos en un cromosoma.

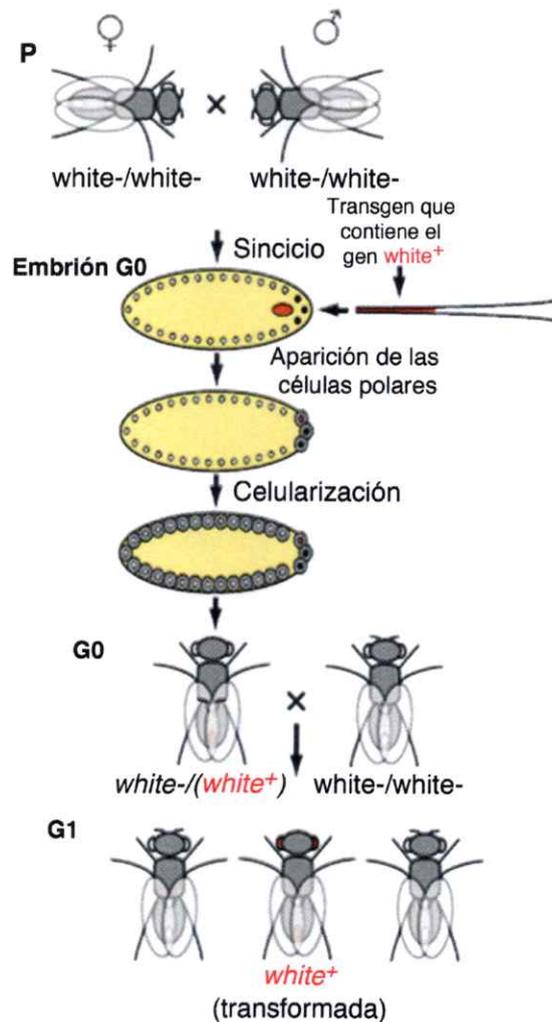


Figura 7. Esquema representativo de la transgénesis en *D. melanogaster*.

Los parentales son *yw* (*white⁻/white⁻*). Los embriones de la generación G0 son co-inyectados en estado sincicial, antes de la celularización, con una mezcla de dos plásmidos: uno que porta el transgen y el gen *white⁺* (representado en rojo) y otro que contiene la transposasa y que no puede integrarse en el genoma. Dentro de la generación G0 adulta se encontrarán inserciones exitosas que darán origen a adultos de ojos rojos (transformantes) en la siguiente generación, G1. Tomado de Spradling y Rubin, 1982.

RESULTADOS

1. ESTABLECER LOS EFECTOS DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE p115 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA TRANSICIÓN G2/M.

1.1. Evaluación de las herramientas para la pérdida y ganancia de función de p115.

Para establecer en que procesos celulares sería necesario p115, se utilizó una estrategia de pérdida y ganancia de función. Para generar la condición de pérdida de función se utilizaron cepas de moscas a las cuales se les insertó en su genoma, secuencias de DNA con estructura de invertidos repetidos separados por un intrón. Al ser transcritas, estas construcciones generan RNAs doble hebra (dsRNA) con estructura de horquilla contra un mensajero específico. Estos dsRNAs inducen en las células el fenómeno de RNA de interferencia en el cual se utiliza parte de la maquinaria de procesamiento de los micro-RNA produciendo la reducción de los niveles del transcrito blanco y como consecuencia, de la proteína. Debido a que las horquillas producidas tienen un largo de aproximadamente 400 nucleótidos y el fenómeno de interferencia se produce con trozos de 22 nucleótidos, hay que confirmar la especificidad (reducción específica del transcrito seleccionado) y la eficacia (referente a cuanto reduce del transcrito) de estas cepas para el transcrito seleccionado.

Para producir la condición de ganancia de función se generó una cepa transgénica con una construcción del cDNA de p115 fusionado con un epítipo de la hemaglutinina (HA) en N-terminal. Ésta proteína de fusión se utilizó por un lado para confirmar la especificidad del dsRNA y por otra parte para ver si la sobreexpresión de p115 tenía efectos sobre los tejidos en desarrollo.

1.1.1. Eficacia y especificidad de los RNA interferentes contra p115.

Para esta tesis se pidieron dos cepas que permiten expresar RNA interferentes (RNAs de doble hebra, dsRNA) distintos que se encuentran disponibles en el *Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)*. El primero de ellos corresponde a la librería GD: p115^{i^{GD}} (Diezl y col., 2007, descrito en el Anexo 1) (400 nucleótidos con posibles blancos inespecíficos, definido como 19 nucleótidos seguidos) y el segundo a la librería KK: p115^{i^{KK}} (la cual fue diseñada posteriormente para no presentar blancos

inespecíficos). Los interferentes de ambas librerías presentan secuencias UAS (*Upstream Activation Sequences*) que permiten dirigir su expresión utilizando el sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). En la Figura 9 se muestra la estructura del locus p115 y la localización de los dsRNAs dentro de éste.

1.1.2. Fenotipos del interferente UAS-p115^{i^{KK}}.

Éste produce una disminución del tamaño del tejido y aumento de la densidad celular al ser expresado mediante el controlador *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*) (comparar *en>* contra *en>p115^{i^{KK}}*) (Figura 10A). El controlador *engrailed-Gal4* se expresa de forma temprana y continua en el compartimiento posterior, con una banda de mayor expresión justo anterior al límite antero-posterior (A-P) durante el desarrollo larvario tardío (Blair, 1993).

Dentro de los fenotipos producidos por este interferente también se evaluaron los parámetros de eficacia a través de RT-PCR semicuantitativo, expresando el interferente ubicuamente en la larva (*daughterless-Gal4*, *da-Gal4*) y comparando los niveles de transcrito de *p115* con larvas controles, encontrándose que estos estaban reducidos en la condición de expresión de *p115^{i^{KK}}* (Figura 10A) en un 50% (determinado a través de densitometría con ImageJ). Con este mismo fin se determinó el nivel de sobre-expresión de la construcción *HA::p115* de forma individual o en combinación con el interferente, a través de inmunofluorescencia en el disco imaginal de ala expresando esta construcción en el compartimiento posterior del ala usando *en-Gal4*. Al co-expresar el interferente con *HA::p115* podemos ver una reducción de los niveles de señal HA en el disco, indicándonos que el interferente es capaz de disminuir los niveles de la proteína de fusión p115, a través de un efecto sobre el número de transcritos (Figura 10C).

Por otra parte, la especificidad del fenotipo fue ensayada mediante la estrategia genética anteriormente descrita, en este caso la expresión del RNA interferente se combinó en *trans* con un alelo mutante del 5'UTR de p115 (inserción de un elemento P, de tipo *promoter-trap* con β -galactosidasa (*w^{67c23} P{lacW} p115^{G0306}/FM7c*)) o con una deficiencia del locus p115 (*Df(1)ct1b1/Binsn*). En ambos casos existió un incremento del fenotipo de reducción del tamaño del ala. Además, la co-expresión del interferente con la construcción *HA::p115* fue suficiente para revertir el fenotipo de ala (Figura 11).

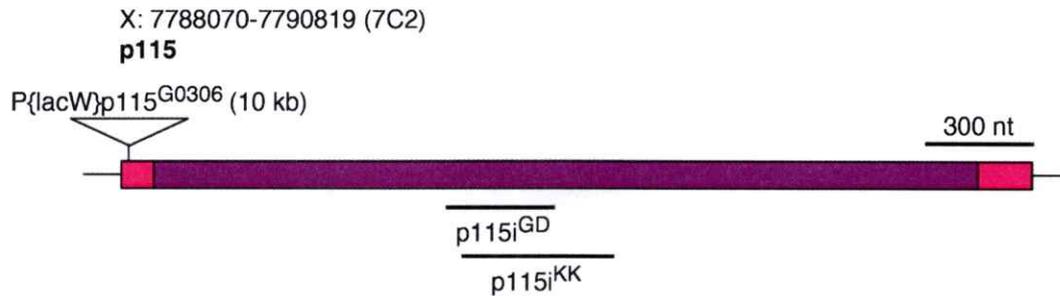


Figura 9. Estructura del locus p115 y RNAs doble hebra utilizados en esta tesis.

En este esquema se muestra la organización del gen p115, el cual está localizado en el cromosoma X en la posición citológica 7C2. Los números corresponden a la localización molecular dentro del genoma de *Drosophila*. Además se indica la localización de los blancos de ambos RNA de doble hebra utilizados durante el desarrollo de esta tesis. Además se muestra la localización en el 5' UTR de un alelo insercional de tipo *enhancer-trap* acoplado al gen que codifica para la proteína β -galactosidasa (P{lacW}p115^{G0306}). Los datos utilizados para realizar el esquema provienen de Flybase (<http://flybase.org/reports/FBgn0040087.html>).

La construcción de ganancia de función HA::p115 es capaz de rescatar los efectos observados respecto al tamaño del tejido y a la densidad celular (Figura 11). Esto sugiere que los fenotipos observados de reducción del tamaño del tejido y aumento en la densidad celular son causados específicamente por la disminución de la función del gen p115.

Los análisis genéticos y moleculares descritos arriba nos permitieron establecer que los fenotipos observados por expresión del dsRNA: *UAS-p115^{KK}*, a diferencia de los producidos por *UAS-p115^{GD}* (ANEXO1), son generados y corresponden específicamente a la disminución de los niveles de p115. Esta cepa se utilizó para determinar los fenotipos celulares y en el tejido producidos por reducciones en p115, e identificar los procesos celulares y del desarrollo en que p115 participaría.

1.2. Descripción de la localización subcelular de p115.

Aprovechando de que generamos una construcción de ganancia de función (HA::p115), la que permite expresar una proteína de fusión que podemos detectar a través del epitopo HA, determinamos si la localización subcelular de p115 coincide con la descrita anteriormente en el aparato de Golgi (Kondylis y Rabouille, 2003). Para esto realizamos inmunofluorescencias en distintos tejidos junto a los marcadores de matriz de Golgi: GM130 (*cis*-Golgi) y Grasp65-GFP; ambas golginas de la misma familia que p115.

Nuestros resultados indican que, al igual que en mamíferos, p115 se localiza principalmente en el aparato de Golgi co-distribuyendo con los otros marcadores analizados. No pudimos analizar su co-distribución con el marcador de sitios transicionales del RE por no disponer de un anticuerpo contra Sec23 u otro componente del coatómero (COPII) (Figura 12).

1.3. Fenotipo celular de p115.

El fenotipo celular descrito para el *knockdown* de p115 en células S2 de *Drosophila*, aparte de la fragmentación del aparato de Golgi, es una desorganización de los sitios transicionales del retículo (tER) (Kondylis y Rabouille, 2003). Desde estos sitios salen las proteínas cargo desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi (Orci y col., 1991). Para ver si estos fenotipos también se producen con el dsRNA

utilizado por nosotros, se planteó utilizar como el modelo celular a los hemocitos embrionarios, los cuales son células similares a los macrófagos presentes en la hemolinfa de embriones y larvas.

Para dirigir la expresión de dsRNA p115^{KK} en los hemocitos y colateralmente en cuerpo graso se utilizó el controlador Cg25C-Gal4, que recapitula el patrón de expresión del colágeno tipo IV (*Cg-Gal4*) presente en ambos tipos celulares.

Sobre estos hemocitos (*Cg>p115^{KK}*) se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo contra KDEL (marcador de ER) y GM130 (proteína de matriz de Golgi), observándose fragmentación del ER similar a lo descrito en células S2 (Kondylis y Rabouille, 2003). Esto podría ser consecuencia de la desorganización de los sitios transicionales del ER (Figura 13). Idealmente, para poder concluir esto sería necesario realizar inmunofluorescencias contra alguno de los componentes del coatómero COPII (por ejemplo, Sec23).

En estos experimentos, observamos que los hemocitos no parecen tener el aparato de Golgi fragmentado bajo las condiciones de depleción de p115, lo cual si es posible de observar en las células S2 con este método, a través de inmunofluorescencias con un anticuerpo contra la proteína de 120 kDa (Kondylis y Rabouille, 2003)). Esto podría ser una consecuencia de poca eficacia en el silenciamiento que hace que el fenotipo sólo se manifieste en la estructura del retículo endoplasmático o que debido a que estas células son incapaces de proliferar (son células terminalmente diferenciadas, Evans y col., 2003) no sea visible el fenotipo descrito (Figura 13).

1.4. Fenotipos del interferente contra p115 en diferentes tejidos de *Drosophila* durante el desarrollo.

En *Drosophila* existen dos tipos de tejidos con características de crecimiento específicas: el tejido larvario e imaginal. El tejido larvario crece principalmente por endorreplicación del DNA (mecanismos revisados en Lee y Orr-Weaver, 2003), mientras que los discos imaginales, precursores de las estructuras del adulto, como el ojo, el ala y del exoesqueleto en general, se desarrollan desde primordios embrionarios compuestos por alrededor de 15 a 40 células y que típicamente experimentan un

incremento de 1000 veces en el número de células durante el desarrollo larvario mediante proliferación (Bryant, 1984).

Al escrutar los niveles de expresión de p115 en las bases de datos (FlyBase), observamos, en consistencia con una función de p115 en secreción, que los niveles más altos de expresión de este gen durante los estadios larvarios se alcanzan en glándulas salivales larvarias, tejido netamente secretor. Nosotros fuimos incapaces de observar algún fenotipo en estos tejidos, sugiriendo que p115 en *Drosophila* no participaría de este proceso (Figura 14 A, D).

Por otra parte, cuando la expresión del RNA interferente contra p115 se realiza de forma ubicua, a través del controlador *daughterless-Gal4* a 25°C, las moscas sólo alcanzan el estadio larva II, siendo incapaces de pupar. Si se reduce la eficiencia del sistema de expresión, creciendo los animales a 22°C, éstos alcanzan a pupar pero no consiguen llegar a la adultez. Esto indica que p115 es esencial durante el desarrollo de *Drosophila*.

Para saber si los fenotipos de disminución del tamaño del tejido observados en el ala se presentaban además en otros órganos de *Drosophila*, se realizó un experimento de *flip-out* utilizando una flipasa que solo se expresa en los progenitores de la capsula cefálica (*Ey>FLP; UAS-CD8::GFP/UAS-p115i; Act<CD2<Gal4/+*), lo que produce la expresión de Gal4 solamente en este tejido. No se obtuvieron individuos adultos con el genotipo, apropiado lo que indica que la reducción de los niveles de p115 provocan letalidad.

Otro análisis realizado fue observar en individuos adultos, si la expresión del interferente en células ya diferenciadas a fotorreceptores (*Gmr-Gal4*) tenía algún fenotipo respecto al número de células o secreción de algún pigmento (Shoup, 1966; Li y col., 2007) (Figura 14 B, E). Al expresar el interferente bajo este controlador no observamos ningún fenotipo, indicando que las células una vez ya diferenciadas (no proliferativas) no sufren alteraciones que se manifiesten en cambios fenotípicos del tejido. Además probamos ordo tejido proliferativo, para lo cual expresamos el dsRNA en el notum, la parte del disco imaginal que va a dar origen al tórax, observándose defectos en el cierre dorsal de este, confirmando los defectos en proliferación observados en las alas adultas (Figura 14 C, F).

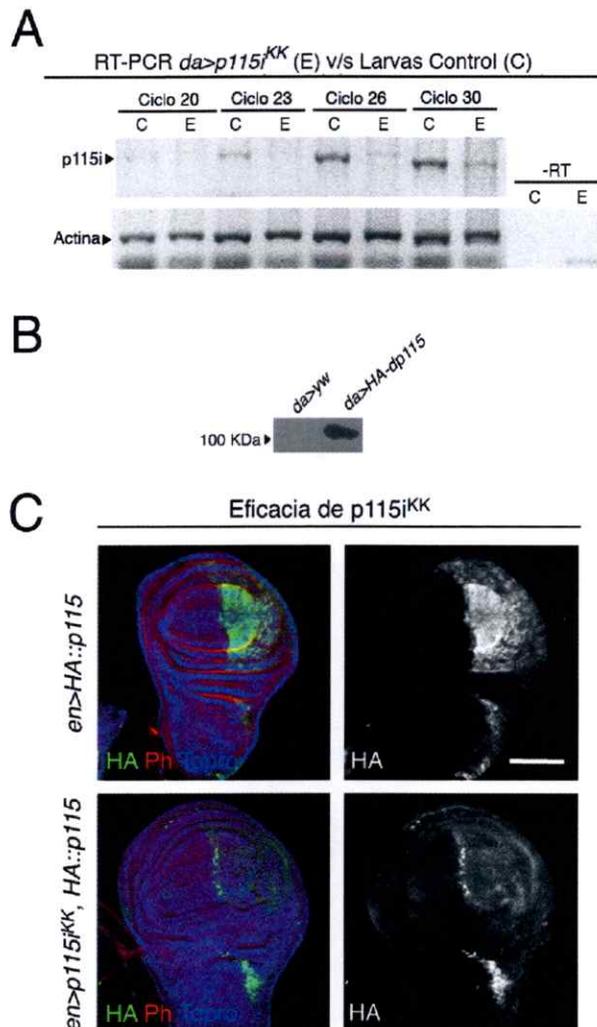


Figura 10. Eficacia de silenciamiento del segundo RNA doble hebra (*UAS-p115^{KK}*) sobre los niveles de p115.

(A) RT-PCR semicuantitativo que muestra la disminución de los niveles de transcrito de p115 en larvas *da>p115^{KK}* ((E): *w; UAS-p115^{KK}/+; da-Gal4/+*) respecto a larvas controles ((C): *w/w; +/+; da-Gal4/+*). Se utilizó para el control de carga de cDNA, un RT-PCR semicuantitativo con partidores contra actina y como control negativo del RT-PCR, el RNA utilizado para hacer el cDNA como templado, descartándose la presencia de DNA genómico en las muestras. (B) Inmunoblot usando el anticuerpo contra hemaglutinina (HA), el cual reconoce específicamente una proteína de 100 kDa al sobreexpresar *HA::p115* en toda la larva (*da>HA::p115; w/w; UAS-HA::p115/+; da-Gal4/+*). El control corresponde al mismo genotipo de larvas utilizadas como control en el RT-PCR: *w/w; +/+; da-Gal4/+*. (C) Inmunofluorescencia contra la etiqueta HA presente en la fusión *HA::p115* expresada en el compartimiento posterior de discos imaginales de ala, mostrando que *p115^{KK}* es eficiente en disminuir los niveles de proteína sobreexpresada. En este experimento, *en>HA::p115* corresponde a larvas de genotipo *w/w; en-Gal4/UAS-HA::p115* y *en>p115^{KK}, HA::p115* corresponde a larvas *w/w; en-Gal4, UAS-p115^{KK}/UAS-HA::p115*. Barra: *en>HA::p115* = 50 μ m, *en>p115^{KK}, HA::p115* = 30 μ m.

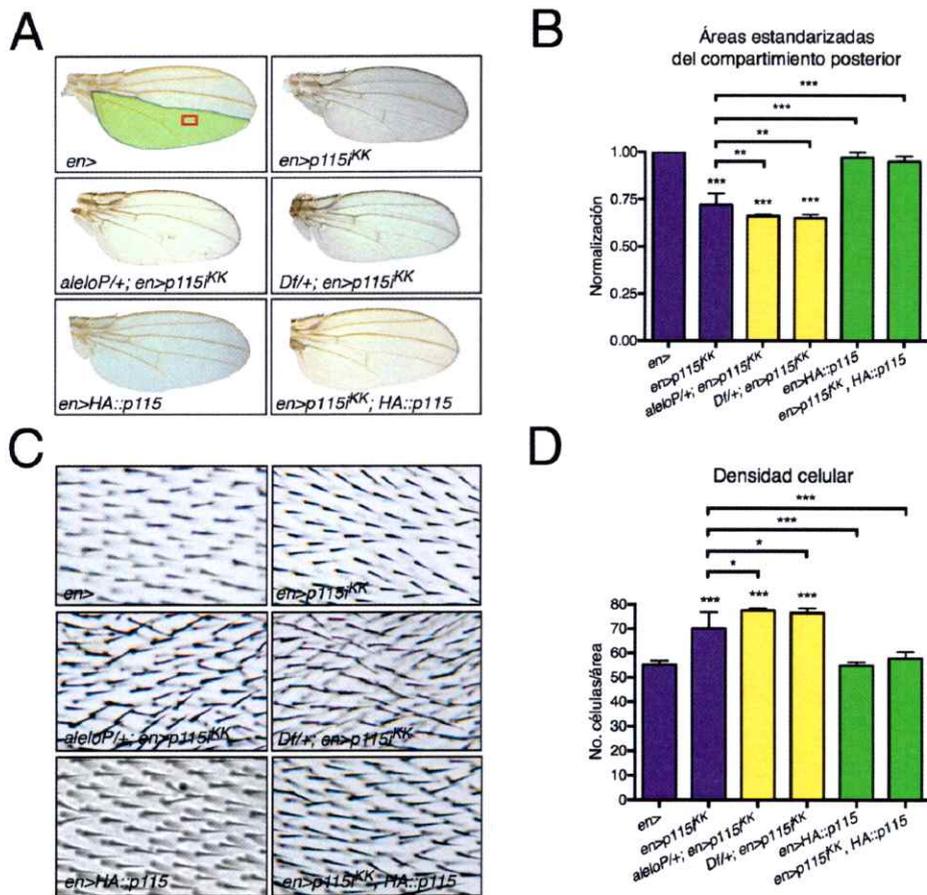


Figura 11. Fenotipos del RNA interferente $p115i^{KK}$, de éste en combinación con los alelos y deficiencias disponibles en transheterocigosis, y en el rescate con la construcción $HA::p115$.

(A) Fenotipos observados en el compartimento posterior de alas provenientes de hembras adultas de los genotipos indicados. Observamos que la expresión del interferente $UAS-p115i^{KK}$ es capaz de reducir el tamaño del tejido y que esto se incrementa cuando se expresa el interferente en presencia del alelo insercional en la región 5' UTR de $p115$ o la deficiencia del locus de $p115$. Este defecto se revierte al co-expresar el interferente y la construcción $HA::p115$. (Genotipos: *en>*; y *w*; *en-Gal4/+ - en>p115i^{KK}*; y *w*; *en-Gal4/UAS-p115i^{KK} - aleloP/+; en>p115i^{KK}*; *w^{67c23} P{lacW} p115^{G0306}/+; en-Gal4,UAS-p115i^{KK}/+ - Df/+; en>p115i^{KK}*; *Df(1)ct1b1/+; en-Gal4,UAS-p115i^{KK}/+ - en>HA::p115*; y *w/w*; *en-Gal4/UAS-HA::p115 - en>p115i^{KK}, HA::p115*; y *w/w*; *en-Gal4, UAS-p115i^{KK}/UAS-HA::p115*) (B) Cuantificación del tamaño del compartimento posterior normalizado respecto al tamaño del compartimento posterior del control (*en>*) para todos los genotipos presentes en (A). (C) Densidad celular. Cada célula del ala diferencia un único tricoma (pelo), así contando el número de estos en un área determinada (indicado con un rectángulo rojo en el sector D) podemos establecer la densidad celular y obtener una idea del tamaño celular. Podemos observar que la densidad celular aumenta cuando se expresa $p115i^{KK}$ y disminuye a los niveles normales cuando co-expresamos el RNA interferente ($p115i^{KK}$) junto a la ganancia de función de $p115$ ($HA::p115$). (D) Cuantificación de la densidad celular. (n=20) El análisis estadístico se realizó a través de ANOVA de una vía (* $p < 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).

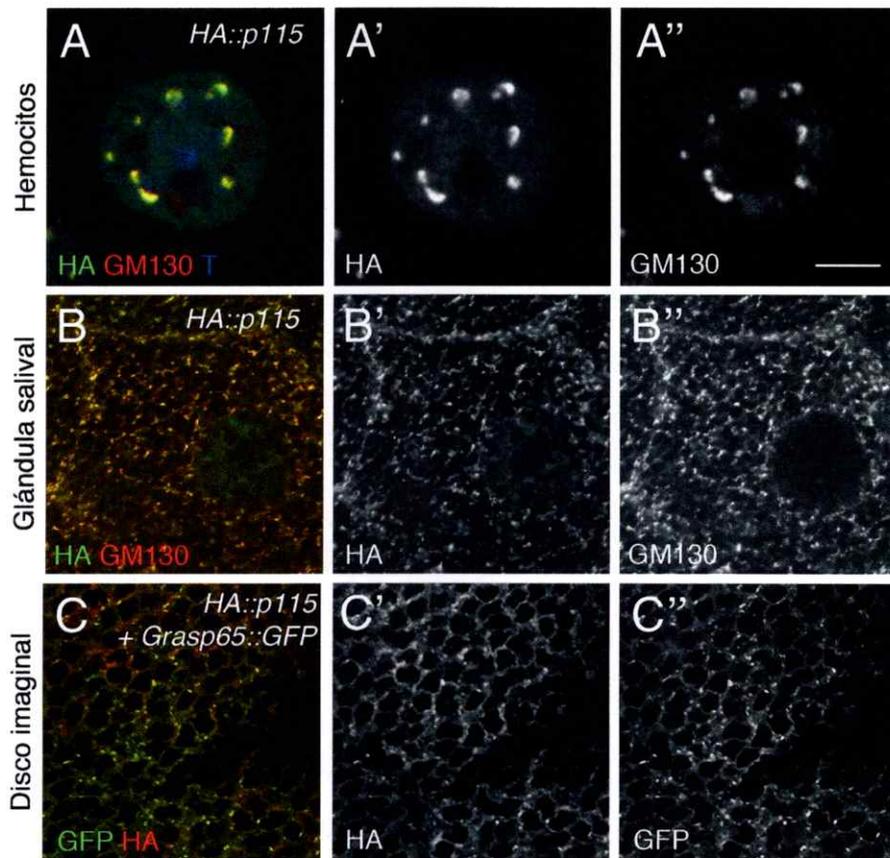


Figura 12. Co-distribución de p115 con aparato de Golgi en diferentes tejidos de *Drosophila*.

(A, A', A'') Inmunofluorescencia contra HA, GM130 (marcador de *cis*-Golgi) y ToPro en hemocitos que sobreexpresan HA::p115 (Genotipo: *y w/w; Cg-Gal4/UAS-HA::p115*). (B, B', B'') Misma inmunofluorescencia en glándula salival (Genotipo: *y w; salP-Gal4/UAS-HA::p115*). (C, C', C'') Inmunofluorescencia contra HA en discos imaginales de ala que sobreexpresan Grasp65-GFP (Genotipo: *y w/w; sal-Gal4, UAS-Grasp65::GFP/HA::p115*). La co-distribución es casi completa en hemocitos y glándulas salivales, siendo parcial (78% calculado a través de correlación de Pearson) en discos imaginales. Barra: (A, A', A'')= 5 μ m, (B, B', B'')= 15 μ m, (C, C', C'')= 15 μ m.

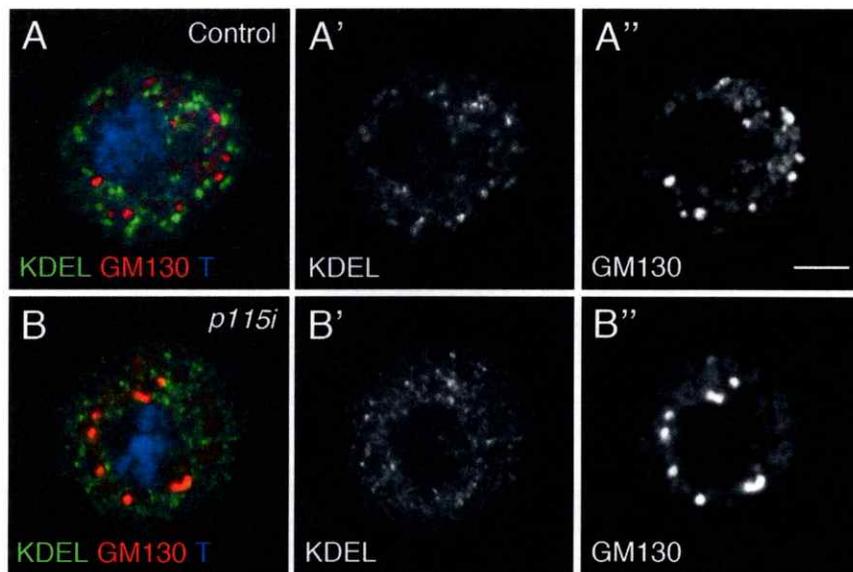


Figura 13. Fenotipos de la depleción de p115 en hemocitos provenientes de larvas de *Drosophila*.

(A, A', A'') Inmunofluorescencia contra KDEL (marcador de retículo endoplasmático) y GM130 (marcador de *cis*-Golgi) y ToPro (núcleos) en hemocitos controles (Control: *Cg-gal4/+*). (B, B', B'') Misma inmunofluorescencia en hemocitos deficientes para p115 (*p115i*: *Cg-gal4/UAS-p115i*). Podemos observar un cambio en la apariencia del retículo endoplasmático (mayor fragmentación), pero no en el aparato de Golgi, el cual se ve muy similar en ambas condiciones. Barra= 5 μ m

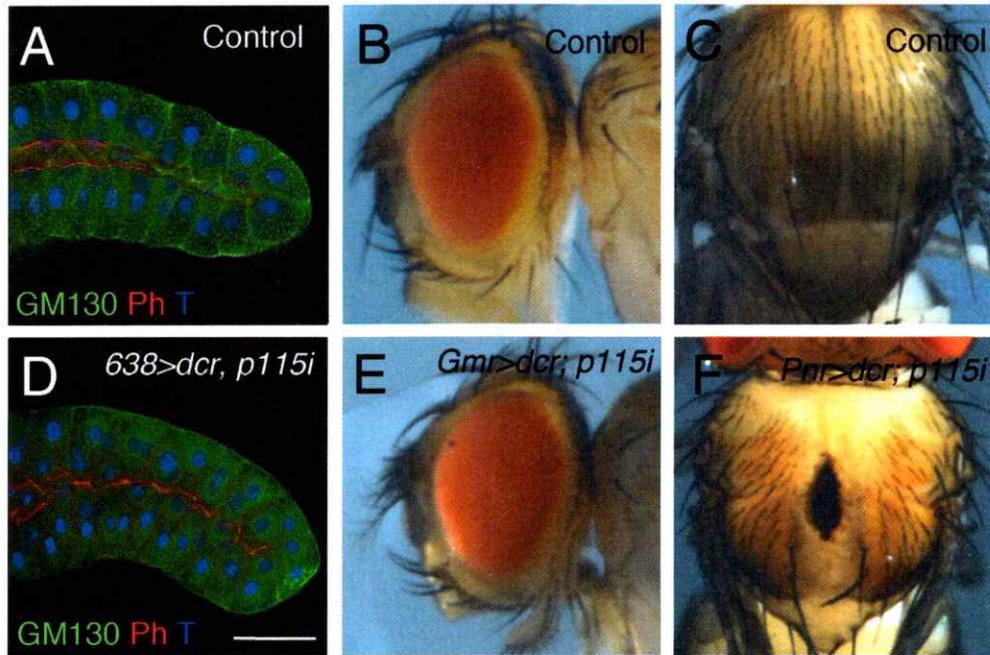


Figura 14. Fenotipos observados en distintos tejidos causados por la depleción de p115 a través de RNA interferente.

(A)-(E) Inmunofluorescencia de glándula salival con anticuerpos contra GM130 (marcador de *cis*-Golgi), faloidina (Ph, citoesqueleto de actina) y ToPro (núcleos). Genotipos de (A) Control: *nub-Gal4/UAS-dcr; +/+*. (E) *638>dcR, p115i*: *nub-Gal4/UAS-dcr; UAS-p115i/+*. Se observa que la depleción de p115 no tiene efectos sobre la formación del lumen de las glándulas salivales. (B)-(F) La depleción en de p115 en los fotorreceptores de moscas hembras adultas no causa ningún fenotipo visible, sugiriendo que las células ya diferenciadas no son sensibles a la falta de función de p115. Genotipos de (B) Control: *Gmr-Gal4/UAS-dcr; +/+*. (F) *Gmr>dcR, p115i*: *Gmr-Gal4/UAS-dcr; UAS-p115i/+*. (C)-(F) La depleción en el notum (tórax) produce defectos en el cierre dorsal de los tejidos de éste, mostrando que p115 es requerido en otros tejidos proliferativos, no solamente en el ala. Genotipos de (C) Control: *UAS-dcr/+; +/+; Pnr-Gal4/+*. (F) *Pnr>dcR, p115i*: *UAS-dcr/+; UAS-p115i/+; Pnr-Gal4/+*. Barra= (A, D): 20 μ m

1.5. La depleción de p115 produce defectos en proliferación.

Existen varias posibilidades para explicar como el tamaño del ala adulta puede disminuir en *Drosophila*, pudiendo ser una o más de estas opciones las que expliquen el fenómeno observado en la condición de reducción de p115.

(1) disminución del tamaño celular (células más pequeñas - mayor densidad celular)

(2) disminución del número de células en el tejido debido a un enlentecimiento de la proliferación o por un aumento de la muerte celular.

Para poder discriminar entre estas opciones, nuestro laboratorio ha implementado una variedad de herramientas: a través de imágenes y citometría de flujo.

Como ya se mencionó, al expresar el RNA interferente contra p115 en el compartimiento posterior (*en>UAS-p115i*) se produce una disminución significativa del tamaño del tejido correspondiente al $28 \pm 5,9\%$. Por otra parte, al estimar la densidad celular a través del conteo de tricomas (pelos), siendo cada tricoma producido por una célula, en un área determinada en el ala adulta, observamos que la densidad celular aumenta solo un $16 \pm 9,2\%$ (Figura 11). En consecuencia, la reducción del tamaño celular por sí sola no es suficiente para explicar la reducción del tamaño del tejido, existiendo un diferencial negativo en el número total de células, posiblemente dependiente de mayor muerte celular y/o enlentecimiento de la proliferación celular.

Este razonamiento nos llevó a postular que la proteína p115 posee un papel en la proliferación y/o sobrevida celular en *Drosophila*.

1.5.1. Efectos sobre el ciclo celular del interferente contra p115 durante el desarrollo del ala de *Drosophila*.

Debido a que los fenotipos observados en el ala adulta de *Drosophila* son un reflejo de los fenómenos ocurridos durante el desarrollo de ésta, decidimos analizar los discos imaginales de ala, los cuales dan origen al notum (tórax) y al ala de la mosca adulta (García-Bellido y col., 1973). Aquí evaluamos si al reducir los niveles de p115 ocurría alguna modificación en los parámetros de proliferación y/o muerte celular, para ello analizamos:



- (1) La replicación del DNA a través de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU).
- (2) Las células en mitosis a través de inmunofluorescencia con fosfohistona H3 (marcador de la condensación del DNA).
- (3) La muerte celular a través de inmunofluorescencias contra caspasa 3 clivada (activación de las caspasas efectoras) y a través de la reacción de TUNEL (fragmentación del DNA).

Finalmente utilizamos citometría de flujo utilizando una tinción estequiométrica para DNA (DRAQ5), con ésta aproximación podemos determinar dos parámetros relevantes: el tamaño celular a través del parámetro de *forward scattering* (FSC) y el perfil de ciclo celular a través del contenido de DNA de las células.

Todos estos experimentos los realizamos usando el controlador *hedgehog-Gal4* (*hh-Gal4*), el cual al igual que *en-Gal4*, produce la expresión de la proteína Gal4 solo en el compartimiento posterior de los discos imaginales. Este controlador se encuentra recombinado con UAS-GFP, lo que permite que la zona donde se realiza la expresión de Gal4 y el interferente quede marcada además con GFP. El compartimiento anterior sirve como control de la proliferación y supervivencia de un disco con niveles normales de p115 (Neufeld y col., 1998).

Al analizar discos *hh>p115i* y realizar inmunofluorescencias contra fosfohistona H3, marcador de mitosis (Henzel y col., 1997; Goto y col., 1999), encontramos un aumento en el número de mitosis en la zona en la cual se expresa el RNA interferente ($40\% \pm 2,3\%$). Además podemos observar que los niveles de Wg son similares en el límite dorso-ventral entre los límites antero-posterior, sugiriendo que la secreción de Wg no estaría relacionada con la reducción del tamaño del tejido deficiente en p115 (Figura 15A).

A través de la incorporación de bromodeoxiuridina, encontramos que el porcentaje de células en fase S aumenta en la zona donde se expresa el interferente (GFP positiva), observándose replicación del DNA en la zona de no-proliferación celular (ZNC). Ésta es una zona donde normalmente no existe replicación del DNA debido a que sus células se encuentran arrestadas en G1 o G2 en el compartimiento

anterior y en G1 en el compartimiento posterior (Johnston y Edgar, 1998) (Figura 15 C y C').

Respecto a la muerte celular, se observan células positivas para caspasa 3 activada repartidas en todo el compartimiento posterior del disco al expresar el interferente contra p115. Este fenómeno no se observa en condiciones normales del desarrollo del disco de ala (Milán y col., 1997) (Figura 15 E y E').

Tomando en considerando los parámetros y resultados antes descritos, existen varias posibilidades que los explican en su conjunto: 1) las células se acumulan en los estadios S y G2/M del ciclo celular, realizando un paso más lento por éstos antes de dividirse. Esto induciría muerte celular en algunas de las células, 2) las células mueran indistintamente del estadio de ciclo celular y por este hecho se produzca proliferación compensatoria que se refleja en mayor número de mitosis y mayor replicación del DNA (Haynie y Bryant, 1977; James y Bryant, 1981; Milán y col., 1997).

Previamente ha sido descrito en células de mamífero que el bloqueo de la fragmentación del aparato de Golgi hace que las células no sean capaces de progresar en mitosis (indicado, al igual que nuestro resultado de acumulación fosfohistona 3 fosforilada) y esto gatillarían la muerte celular (Sütterlin y col., 2002). En nuestro caso, al depletar de p115 estaríamos provocando el fenómeno opuesto, que las células tuviesen su aparato de Golgi permanentemente fragmentado (Kondylis y col., 2001). Esto introdujo la pregunta si las células se estaban muriendo antes o durante la mitosis; para resolver este punto se realizaron tinciones dobles de TUNEL y inmunofluorescencia contra PH3. Observamos que el porcentaje de células positivas para TUNEL y PH3 era muy bajo (aproximadamente 1 a 2 células por disco analizado (n=4)), lo que sugiere que las células mueren en otros estadios del ciclo celular (Figura 15 G, G').

Para distinguir que estaba ocurriendo con las células que expresan el interferente contra p115 respecto a su contenido de DNA realizamos el análisis de éste utilizando citometría de flujo. Para esto las células de los discos (*hh>gal4, UAS-GFP*) fueron dissociadas con tripsina y marcadas con una tinción para DNA, distinguiendo las células control de las depletadas de p115, a través de la fluorescencia del GFP: GFP(+), células depletadas de p115 y GFP(-), células control. Observamos a

través del parámetro de FSC, que el tamaño celular no varía entre células controles y experimentales (Figura 15D), sugiriendo que el cambio en este parámetro observado en las alas adultas se produce posteriormente en el desarrollo y que diferencias en el tamaño celular no son las causantes de los fenotipos observados.

Al analizar los perfiles de ciclo celular observamos que existe una población de células sub-G1, aneuploides, correspondiente posiblemente a células apoptóticas (Chen y col., 2007), una disminución del porcentaje de células en G1 y un aumento de células en G2, además destaca la existencia de un grupo de células supra-G2 que posiblemente corresponden a endorreplikaciones del DNA (Figura 15E).

1.5.2. Fenotipos de la ganancia de función de p115 durante el desarrollo del ala de *Drosophila*.

A pesar de no manifestar un fenotipo macroscópico evidente, analizamos si la sobreexpresión de HA::p115 tenía algún efecto en proliferación y/o muerte celular.

El análisis a través de inmunofluorescencias y citometría de flujo arrojó que la sobreexpresión de p115 no producía ningún fenotipo detectable. Esto nos permite pensar que p115 no tiene una función instructiva sobre el ciclo celular, sino más bien una función permisiva sobre otros componentes de éste (Figura 16).

1.5.3. Fenotipos de la co-expresión del interferente de p115 con el inhibidor de apoptosis p35.

Para descartar que fuese la muerte celular la responsable de la reducción del tejido y además que los efectos de la depleción de p115 sobre el ciclo celular fuesen consecuencia de proliferación compensatoria provocada por la muerte celular en el tejido, co-expresamos junto con el interferente de p115 un inhibidor de la apoptosis mediada por las caspasas efectoras (DrICE), la proteína de baculovirus p35 (Lannan y col., 2007; Hay y col., 1994). Bloquear la apoptosis no es suficiente para rescatar la reducción del tamaño del ala, sugiriendo que el fenotipo observado en condiciones de expresión del RNA interferente no se debe a la inducción de muerte celular, por el contrario el bloqueo de la muerte celular exagera los fenotipos observados, ya sea en tanto densidad celular o tamaño del tejido (Figura 17).

En este caso, a través de inmunofluorescencias contra PH3 se reveló que las células en mitosis aumentan en el compartimiento donde se expresa el RNA interferente y p35, de forma similar a lo observado en la condición de la expresión del RNA interferente por si solo (Figura 18A, A'). Del mismo modo, la incorporación de bromodeoxiuridina reveló la presencia de una mayor cantidad de células replicando el DNA, siendo esto análogo a lo producido por la expresión individual de p115i (Figura 15). Finalmente, al analizar la muerte celular vemos que p35 efectivamente bloquea la muerte celular en el tejido.

La expresión de la proteína p35 genera una condición de "células no-muertas" (*"undead" cells*), que son incapaces de proliferar pero que son capaces de generar un aumento de los niveles en factores de crecimiento, por ejemplo *wingless*, el cual promueve la proliferación de las células circundantes (Huh y col., 2004; Perez-Garijo y col., 2004; Ryoo y col., 2004). No fuimos capaces de detectar un incremento de *wingless* fuera de su patrón normal de expresión (límite dorsal/ventral y la zona que va a dar origen a la bisagra del ala) (Figura 18A).

Al analizar los efectos sobre ciclo celular a través de citometría de flujo, observamos que las células *p115i+p35* alcanzan un mayor tamaño que las control (células provenientes del compartimiento anterior). En tanto al analizar por citometría el contenido de DNA, observamos que las células aneuploides desaparecen, y existe un incremento de las células retenidas en G2-M junto a un incremento en la población supra-G2 (endorreplicación del DNA), lo cual podría explicar el mayor tamaño celular observado por citometría (Figura 18F). Estos parámetros de ciclo celular son similares a lo observado en la pérdida parcial de reguladores positivos de la transición G2/M, como son Cdk1 o *cdc25/string* (Weigmann y col., 1997; Björklund y col., 2006).

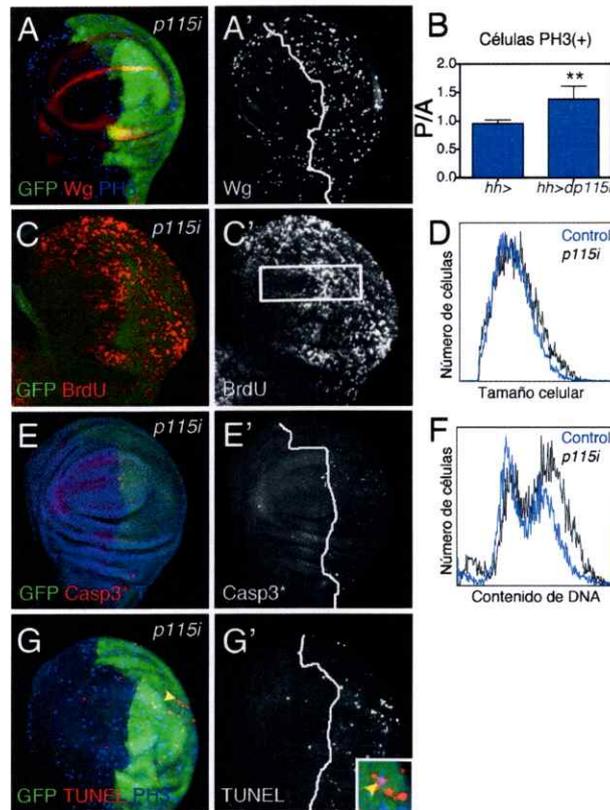


Figura 15. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala del tercer estadio depletados de p115 en el compartimiento posterior.

(A, A', C, C', E, E', G, G') Discos imaginales de ala que presentan una depleción de p115 en el compartimiento posterior indicado por la expresión de GFP (*w; UAS-p115i/+; hh>gal4, UAS-GFP/+*), lo cual nos permite usar el compartimiento anterior como control de proliferación. Las imágenes presentadas son proyecciones en Z de todos los planos del ala. (A, A') Inmunofluorescencia contra fosfohistona H3 (PH3) y wingless (Wg). En (A') se observa claramente que el número de células PH3 positivas incrementa en la región depletada de p115. (B) Cuantificación del incremento en el número de células PH3 (n=6) a través de la razón del número de células PH3 positivas posterior/anterior determinada dentro del tejido presuntivo del ala (región circular que marca wingless). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó t-student de dos colas, donde ** indica un valor- $p < 0.01$. (C, C') Incorporación de bromodeoxiuridina en discos imaginales de ala que presentan una depleción de p115 en el compartimiento posterior. Podemos observar un aumento de ésta en el compartimiento posterior, lo que se hace aún más claro en el rectángulo blanco que encierra la ZNC (*zone of non-proliferating cells*). (D, F) Citometrías de flujo realizadas a partir de células de discos imaginales teñidas con DRAQ5 (tinción estequiométrica de DNA) que presentan una depleción de p115 en el compartimiento posterior indicado por la expresión de GFP (*w; UAS-p115i/+; hh>gal4, UAS-GFP/+*), lo cual nos permite usar el compartimiento anterior como control de proliferación disociados en tripsina. (D) Tamaño celular (FSC) vs. número de células. Podemos observar que la población que expresa el interferente tiene un tamaño celular similar al control. (F) Contenido de DNA (DRAQ5) vs. número de células. Podemos observar la presencia de células aneuploides (supra-G1) y células que presentan cantidades de DNA mayores a G2 (super-G2), las cuales pueden ser debido a endorreplicación, explicando de esta forma el incremento en la tinción por BrdU. (E, E', G, G') Determinación de la existencia de muerte celular a través de inmunofluorescencia contra caspasa 3 clivada (apoptosis) (E, E') y TUNEL (fragmentación del DNA) junto con inmunofluorescencia de fosfohistona H3, sugiriendo que la muerte ocurre indistintamente del estadio de ciclo celular.

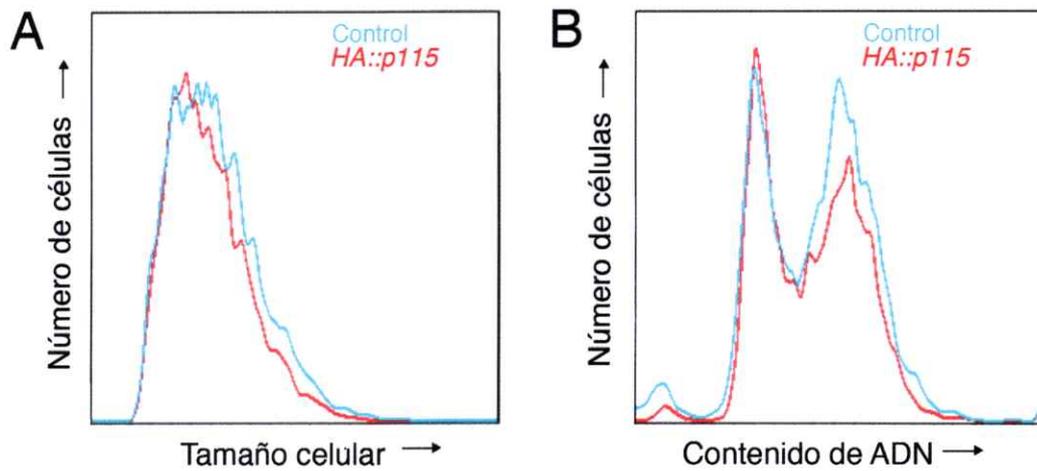


Figura 16. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala del tercer estadio determinados mediante citometría de flujo de discos imaginales que sobreexpresan p115 en el compartimiento posterior.

Discos imaginales del genotipo (*w; UAS-HA::p115/+; hh-Gal4, UAS-GFP/+*) fueron disociados con tripsina y analizados mediante citometría de flujo correspondiendo la población GFP+ a la experimental y la GFP- a la control. (A) Tamaño celular (FSC) vs. número de células. Podemos observar que la población que sobreexpresa p115 tiene un tamaño celular similar al control. (B) Contenido de DNA (DRAQ5) vs. número de células. Se muestra un histograma representativo ($n=3$) del experimento. No se observaron diferencias significativas, a pesar de que se observan algunas en el histograma presentado.

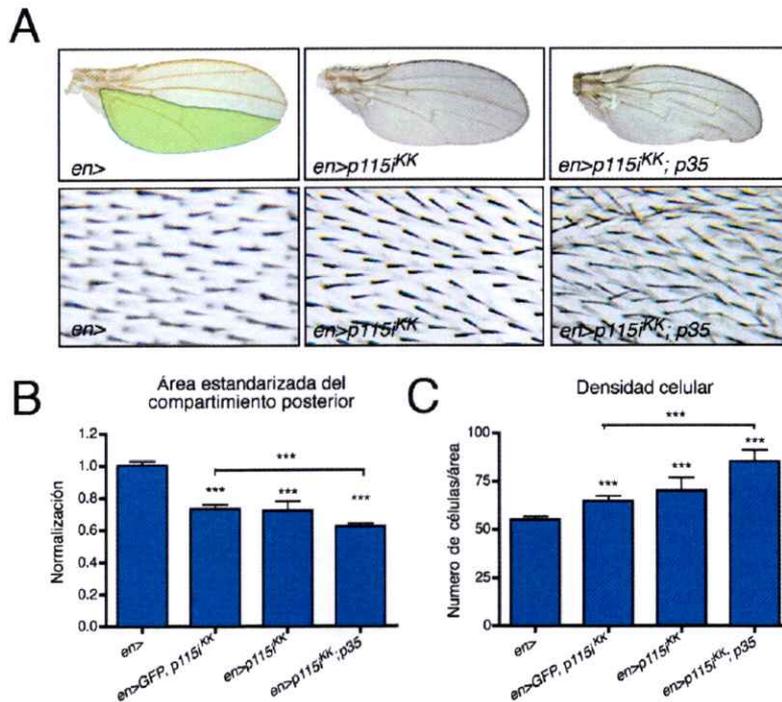


Figura 17. La reducción del tamaño del tejido causada por la depleción de p115 no es debida a la existencia de muerte celular.

(A) Arriba: Alas hembra adultas que expresan lo indicado en la figura (ver genotipos). Podemos observar que al co-expresar p35 (inhibidor de las caspasas efectoras) junto a la depleción de p115, los fenotipos de reducción del compartimiento posterior se incrementan, sugiriendo que la reducción del tamaño del tejido no es una consecuencia de la muerte celular. Abajo: Acercamiento a los tricomas, mostrando los incrementos en la densidad celular al co-expresar el RNA de doble hebra de p115 junto al inhibidor de muerte celular p35. (B) Cuantificación del tamaño del compartimiento posterior, para los distintos genotipos analizados (n=20). (C) Cuantificación de la densidad celular en los mismos genotipos (n=20). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía, donde *** indica un valor-p<0,001, observándose que las diferencias son significativas para tamaño del tejido y densidad celular respecto a sólo la depleción de p115. (Genotipos: *en>*; y *w*; *en-Gal4/+*, *en>GFP, p115^{KK}*; y *w*; *en-Gal4, UAS-p115^{KK}/UAS-mCD8::GFP, en>p115^{KK}*; y *w/w*; *en-Gal4/UAS-p115^{KK}, en>p115^{KK}, p35*; y *w*; *en-Gal4,UAS-p115^{KK}/+; UAS-p35/+*)

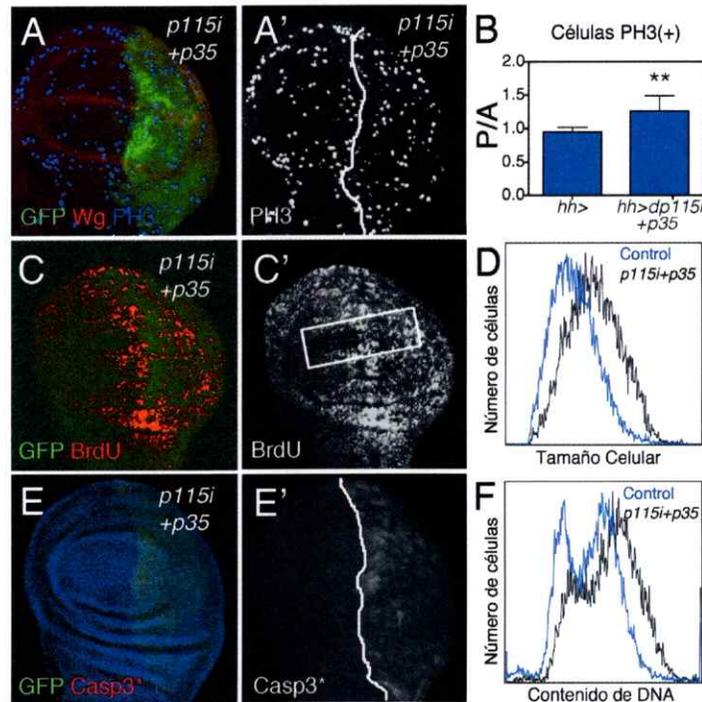


Figura 18. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario que co-expresan el RNA doble hebra contra p115 junto al inhibidor de la apoptosis p35.

(A, A', C, C', E, E') Discos imaginales de ala que presentan una depleción de p115 junto a la expresión de p35 en el compartimiento posterior indicado por la expresión de GFP (*UAS-p115i/+; hh>gal4, UAS-GFP/UAS-p35*), lo cual nos permite usar el compartimiento anterior como control de proliferación. Las imágenes presentadas son proyecciones en Z de todos los planos del ala. (A, A') Inmunofluorescencia contra fosfohistona H3 (PH3) y wingless (Wg). En (A') se observa claramente que el número de células PH3 positivas se incrementa en el lado posterior del disco imaginal de ala al expresar el RNA interferente contra p115 + p35. (B) Cuantificación del incremento en el número de células PH3 positivas (n=6) a través de la razón posterior/anterior determinada dentro del tejido presuntivo de ala (región circular demarcada por la expresión de la proteína wingless). Se muestra el promedio \pm desviación estándar. Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó t-student de dos colas, donde ** indica un valor $p < 0,01$. (C, C') Incorporación de bromodeoxiuridina, el rectángulo blanco encierra la ZNC (*zone of non-proliferating cells*), donde se observa claramente que los niveles de incorporación de BrdU es mayor en la zona donde se co-expresa el RNA doble hebra junto a p35. (E, E') Inmunofluorescencia contra caspasa 3 clivada, la cual corresponde a una caspasa efectora indicadora de la activación de la muerte celular por apoptosis. Observamos que caspasa 3 no se encuentra activada al co-expresar el inhibidor de la apoptosis en la zona posterior del ala. (el sombreado ya ha sido observado en la literatura, Perez-Garijo y col., 2004) (D, F) Citometrías de flujo realizadas a partir de células de discos imaginales teñidas con DRAQ5 (tinción estequiométrica de DNA) que presentan una depleción de p115 junto a la expresión de p35 en el compartimiento posterior indicado por la expresión de GFP (*UAS-p115i/+; hh>gal4, UAS-GFP/UAS-p35*), lo cual nos permite usar el compartimiento anterior como control de proliferación disociados en tripsina. (D) Citometría para determinar el tamaño celular (FSC) vs. número de células. Podemos observar que la población que expresa el interferente tiene un tamaño celular mayor a la población control. (F) La citometría de flujo para determinar el contenido de DNA de las células muestra que las células son acumuladas en la fase G2 del ciclo celular y existen además células con un contenido mayor probablemente como resultado de eventos de endorreplicación.

2. DETERMINAR SI LOS EFECTOS SOBRE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DEPENDEN DE LA PRESENCIA DE p115, DEFECTOS EN EXOCITOSIS/SECRECIÓN O ESTADO DE FRAGMENTACIÓN DEL GOLGI.

El punto de partida de este trabajo fue tratar de explicar la disminución del tamaño del tejido causada al disminuir la función de p115, relacionando esto con los papeles conocidos de p115 en la dinámica del aparato de Golgi y el ciclo celular. Si consideramos los antecedentes mencionados, podemos pensar en que los fenotipos observados al depletar p115 sobre la progresión celular sean causados por las siguientes opciones:

- (1) defectos en exocitosis/secreción.
- (2) defectos en la estructura del aparato de Golgi durante el desarrollo.
- (3) directamente por la ausencia de la proteína p115 y que esta posea un papel sobre el ciclo celular.

2.1. Defectos en la exocitosis/secreción.

Los principales fenotipos celulares descritos para reducciones de p115 en mamíferos y levaduras son defectos en la secreción (Nakajima y cols, 1991; Sohda y cols, 2005). En *Drosophila*, no se han observado defectos en la secreción relacionados con alteraciones en la función de esta proteína (Kondylis y Rabouille, 2003). Sin embargo podría ser posible que la reducción del tamaño del ala y el aumento de la densidad celular en este tejido pudiesen ser consecuencia de un defecto en el tráfico de algún componente relevante para estos procesos.

Para descartar que este tipo de alteraciones globales en secreción pudiesen tener importancia en nuestro análisis, comparamos los fenotipos generados por la reducción de la función de p115 con los descritos para las faltas de función de proteínas que son exocitadas a través de los distintos tipos de unidades de Golgi presentes en *Drosophila*, cada una de las cuales tiene cargos específicos (Yano y col., 2005).

Yano y col. (2005) definió al menos la existencia de tres tipos distintos de unidades de Golgi en *Drosophila* capaces de glicosilar específicamente a ciertos cargos, a través de la presencia de solo ciertas glicosiltransferasas: *fringe connection*

(*FRC*), *rhomboid* (*RHO*) y *sulfateless* (*SFL*), las cuales son requeridas para glicosilar a *Notch* (proteína transmembrana que sirve como receptor de señales extracelulares y que participa en varias rutas de señalización durante el desarrollo animal, controlando los destinos celulares mediante la amplificación y consolidación de diferencias entre células adyacentes), *spitz* (ligando de EGF-R) y proteoglicanos, respectivamente (Yano y col., 2005; Goto y col., 2001; Selva y col., 2001).

Cuando observamos los fenotipos producidos por reducción de cada una de estas rutas de tráfico en el ala adulta, podemos decir que ninguno es similar al fenotipo producido por la depleción de p115 (Figura 19A), sugiriendo que p115 no afecta ninguna de estas rutas de exocitosis. Además no observamos efectos sobre el *patterning* del ala adulta, la cual para su formación depende de la secreción y endocitosis de los diferentes morfógenos.

Para confirmar que la exocitosis no estuviese alterada en reducciones de los niveles de la proteína p115 durante el desarrollo del ala, al menos macroscópicamente, realizamos la depleción en el compartimiento posterior del disco de ala y usamos el compartimiento anterior como control. Observamos a través de inmunofluorescencia que la localización y niveles de E-cadherina, una proteína transmembrana requerida para la adhesión celular, no varían (Figura 19C y C'). Esta proteína es N- (revisado en Niessen y col., 2011) y O-glicosilada (Zhu y col., 2001) durante su paso por la ruta exocítica. Este resultado sugiere que, al igual a lo observado en células S2, la depleción de p115 no produce defectos evidentes sobre la exocitosis (Kondylis y Rabouille, 2003).

Cuando se bloquea la secreción de proteínas en los tejidos grasos de la mosca, por ejemplo a través de la reducción de NSF1, *N-etilmaleimida soluble factor 1* (*Cg>NSF1*), se produce una acumulación de proteínas en el retículo endoplasmático que produce una sobrecarga del sistema y se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response, UPR*) (revisado en Moore y Hollien, 2012). Es posible detectar la activación de la UPR a través de la acumulación nuclear de una versión de *xbp1* fusionada a la proteína fluorescente verde (*UAS-xbp1::GFP*), que se genera solo cuando el mensajero es procesado por el sensor de UPR *Ire1α* (Ryoo y col., 2007). No fuimos capaces de observar GFP al co-expresar *xbp1::GFP* con el

interferente de p115 (*Cg>dcr; xbp1::GFP, p115i*) (Álvaro Glavic, datos no mostrados), sugiriendo que la depleción de p115 en las células del cuerpo graso no afecta de forma considerable la secreción.

Toda esta evidencia sugiere que los fenotipos observados al depletar p115 sobre la progresión celular no son causados por defectos en la secreción/exocitosis.

2.2. Defectos en la estructuración del aparato de Golgi.

Como se señaló en la introducción, la señalización por ecdisona es requerida para la formación de las cisternas del aparato de Golgi. Esto es mediado por el aumento de expresión de proteínas requeridas para la fusión de las vesículas. Además los niveles de ecdisona son capaces de regular el ciclo celular a través de la señalización a través de Wingless (Wg) (Mitchell y col., 2008). La señalización por Wg es capaz de reprimir la actividad de String, que participa en la transición G2/M (Edgar y Datar, 1996) y del homólogo en *Drosophila* del factor de transcripción Myc: *diminutive* (*dm*), quien dirige el crecimiento celular y la progresión del paso G1/S (Johnston y col., 1999).

La falta de componentes río debajo de la Ecdisona como *crooked-legs* quien reprime los niveles de *wingless* tienen fenotipos en el ala adulta muy similares a la falta de p115 (en cuanto a la reducción del tamaño del tejido) (Mitchell y col., 2008). Como Wg es una proteína secretada existe la posibilidad de que los procesos de fusión vesicular dependiente de p115 y la regulación del ciclo celular por Wg estén acoplados y que la reducción del tamaño del tejido pueda estar directamente relacionado con las consecuencias de la no-formación de las cisternas.

Para analizar esta posibilidad sobreexpresamos NSF 1 y 2 (*N-ethylmaleimida soluble factor*, cepas donadas por Barry Ganesky y Richard Ordway, respectivamente), componentes que sabemos están relacionados con el proceso de la formación de cisternas (Kondylis y col. (2001), Figura 11). Al realizar la sobreexpresión de ellos de forma individual no se obtuvo ningún fenotipo evidente.

Por otra parte, al coexpresarlos con el interferente contra p115, el fenotipo de este último no se modificó. De esta forma, podemos sugerir que la reducción del tamaño del tejido no es consecuencia de un cambio en la capacidad de organización en cisternas del aparato de Golgi (Figura 20A, B, C, D, I).

Como experimentos complementarios intentamos bloquear la señalización por ecdisona, a través de la sobreexpresión de un dominante negativo para su receptor, en el progenitor del ala de *Drosophila*. Sin embargo, esta sobreexpresión produce letalidad, impidiéndonos observar los fenotipos de la interacción (por lo cual debemos realizarla en mosaicos). Al expresar una versión dominante negativa del receptor de ecdisona en clones, se produce un aumento en los niveles de Wg y disminuye la proliferación en los clones (Mitchell y col., 2008).

Posteriormente, al realizar los análisis del ciclo celular sobre los discos depletados de p115 en el compartimiento posterior, pudimos observar que, a diferencia de las reducciones de señalización de ecdisona, los marcadores se comportan como si existiese un aumento de la proliferación (incremento del número de mitosis e incorporación de BrdU) y no se detecta un incremento en los niveles de Wg (Figura 15), sugiriendo que la señalización por Ecdisona y Wg no están implicadas en la disminución del tamaño del tejido adulto causada por la depleción de p115.

Además redujimos la función de las golginas Grasp65 y GM130, a través de la expresión de sus respectivos dsRNAs para determinar si tenían algún efecto sobre la reducción del tamaño. Grasp65 es una proteína que ha sido relacionada en *Drosophila* con otro proceso celular, denominado secreción no convencional, que es un tipo de secreción que ocurre directamente entre el retículo endoplasmático y la membrana celular (Schötman y col., 2008). En mamíferos, los fenotipos producidos por la depleción de Grasp65, GM130 y p115 son similares y consistentes en la formación de husos multipolares (Sütterlin y col., 2005; Kodani y col., 2008; Radulescu y col., 2011), lo cual sugiere de que estas golginas son requeridas en el mismo proceso. Nuestro análisis evidenció que la depleción parcial de Grasp65 a través de RNA doble hebra co-expresado con p115i (Figura 20F) tenía efectos sobre el tamaño del tejido, sugiriendo que ambas proteínas funcionan sobre el mismo proceso celular, lo cual coincide con los antecedentes mencionados. Sin embargo la reducción de Grasp65 por si sola a través de este interferente, no modifica el crecimiento del ala, ni presenta los fenotipos descritos en *Drosophila* para las mutantes de Grasp65 (falta de adhesión entre los epitelios dorsal y ventral, reducción del tamaño del tejido) (Schötman y col.,

2008), sugiriendo que esta no es capaz de disminuir los niveles de la proteína lo suficiente como para observar los fenotipos de los alelos nulos de Grasp65.

Nuestras observaciones sugieren que los fenotipos observados al depletar p115 sobre la progresión celular son causados directamente por la ausencia de ésta proteína y la posibilidad que esta posea un papel sobre el ciclo celular.

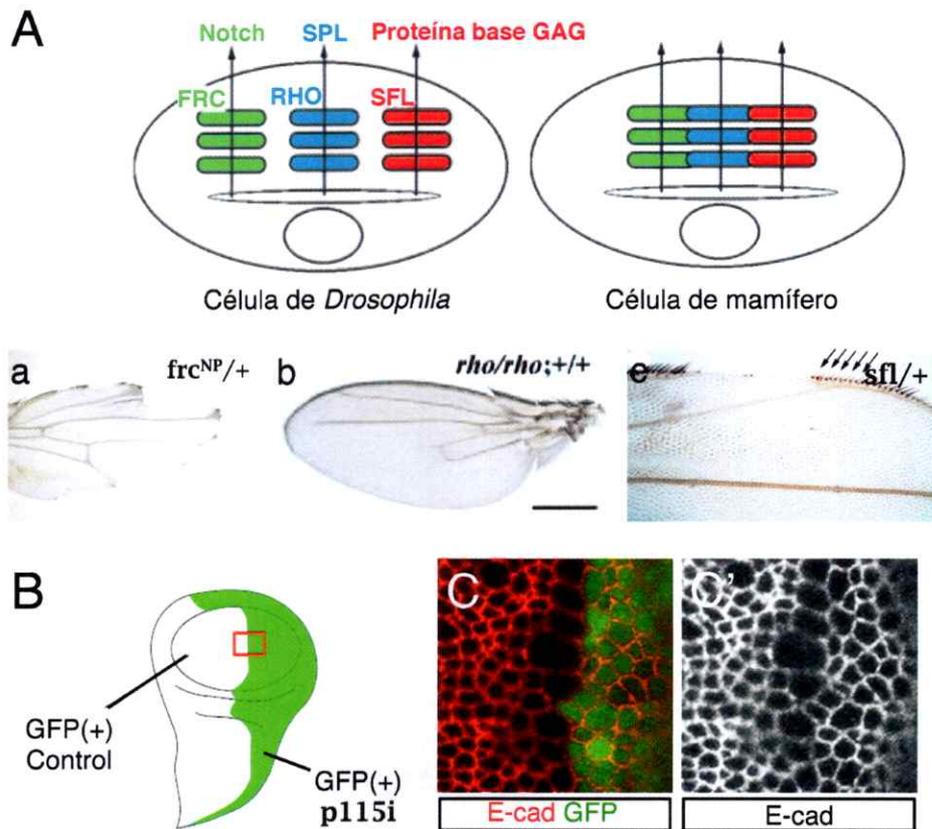


Figura 19. La depleción de p115 no afecta la secreción a través de las diferentes unidades de Golgi especializadas presentes en *Drosophila*.

(A) Se ha propuesto la existencia de diferentes unidades de Golgi, especializadas en la glicosilación particular de diferentes proteínas (Yano y col., 2005). En el esquema se muestran los tres casos identificados, unidades de Golgi enriquecidas en *fringe connection* (*frc*) para la glicosilación de Notch, en *rhomboïd* (*rho*) para *Spitz* (*spi*) o en *sulfateless* (*sfl*) para la glicosilación de la proteína base de los glucosaminoglicanos (GAG). En mamíferos se ha propuesto que todas estas funciones serían llevadas a cabo por solo un aparato de Golgi. En (a) se muestra el fenotipo de las alas heterocigotas mutantes de *frc* (*frc*^{NP/+}) (Yano y col., 2005). En (b) se muestra el fenotipo de alas mutantes para *rho* (Goto y col., 2001) y en (c) se muestran clones homocigotas mutantes (indicados con las flechas negras) para *sfl* (Silva y col., 2001). (Podemos comparar los fenotipos observados con los de la depleción de p115 (Figura 18) en el compartimiento posterior y ver que no es similar a ninguno de estos).

(B) Utilizando el controlador *Hh>gal4*, es posible expresar el RNA de doble hebra en el compartimiento posterior del disco imaginal de ala (*UAS-p115i*), marcando al mismo tiempo a través de la expresión de GFP esta zona (*UAS-GFP*).

(C, C') Experimento realizado para ver si la secreción se encuentra afectada al depletar p115. Se realizó una inmunofluorescencia contra E-cadherina en discos que poseían el marco experimental descrito en (B) Si hubiesen defectos en la secreción se espera observar acumulaciones de E-cadherina en el interior de las células y una menor intensidad de ésta en las membranas plasmáticas, lo cual no se observa. (Genotipo: *w; UAS-p115i/+; hh-gal4, UAS-GFP/+*)

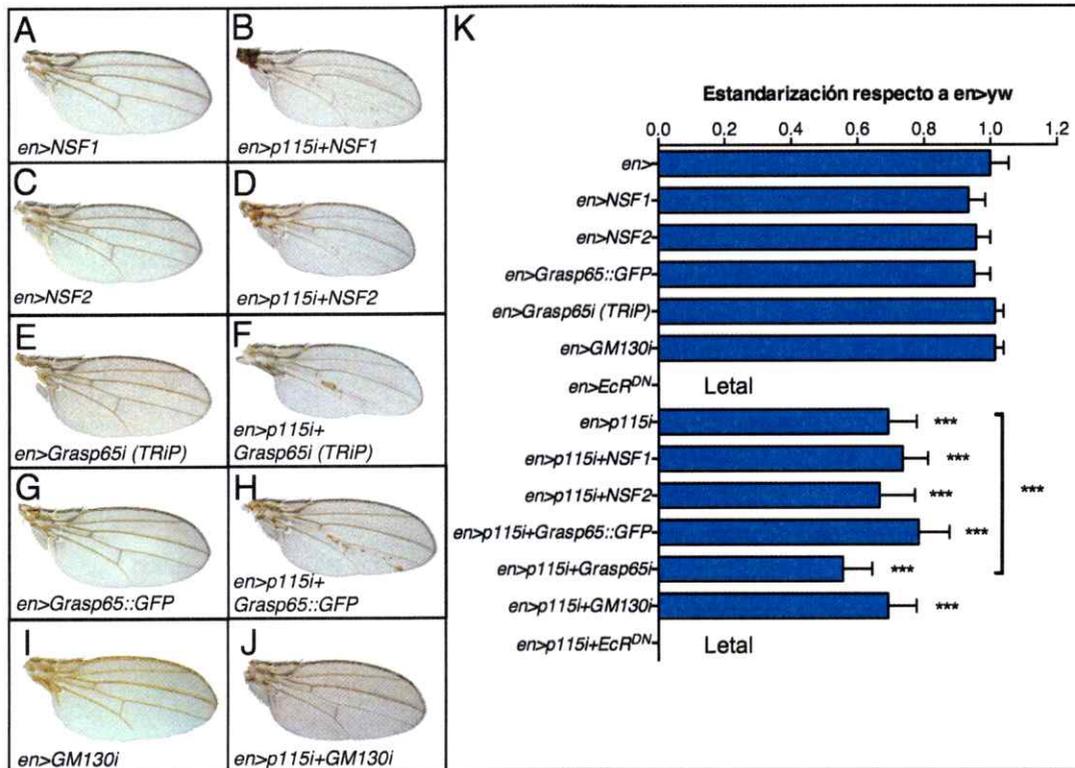


Figura 20. Efectos de modificadores de la dinámica del aparato de Golgi sobre la depleción de p115.

(A-J) Alas de moscas adultas hembras que expresan en el compartimiento posterior lo indicado en cada una de las figuras. (K) Cuantificación del área del compartimiento posterior de cada una de los genotipos mostrados. Se presenta el promedio \pm desviación estándar ($n=20$). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía, donde *** indica un valor $p < 0,001$. De esta forma encontramos que sólo la depleción de Grasp65 es capaz de modificar los fenotipos, incrementándolos, sugiriendo que ambas proteínas participan del mismo proceso en el establecimiento del tamaño del tejido. (Genotipos: (A) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-NSF1* (B) y *w/w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-NSF1* (C) y *w/w*; *en-Gal4/+; UAS-NSF2/+* (D) y *w/w*; *en-Gal4, UAS-p115i/+; UAS-NSF2/+* (E) y *w/w*; *en-Gal4/+; UAS-Grasp65i (TRiP)/+* (F) y *w/w*; *en-Gal4, UAS-p115i/+; UAS-Grasp65i (TRiP)/+* (G) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-Grasp65::GFP* (H) y *w/w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-Grasp65::GFP* (I) y *w/w*; *UAS-GM130i* y *w/w*; *en-Gal4/+* (J) *UAS-GM130i/+; en-Gal4, UAS-p115i/+*)

3. DETERMINAR LAS INTERACCIONES FUNCIONALES DE p115 CON COMPONENTES DE CICLO CELULAR, PRINCIPALMENTE RESPECTO A LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO CDK1/CICLINA B.

Hemos establecido que el fenotipo generado por el RNA interferente contra p115 es una reducción en el tamaño del tejido, principalmente debido a un enlentecimiento del ciclo celular, con células retenidas en G2-M y fenómenos de endorreplicación del DNA de ellas. Esto junto con los antecedentes que poseíamos sobre la relación entre la fragmentación del aparato de Golgi y el ciclo celular en mamíferos, nos llevó a analizar si la modificación de los niveles de proteínas requeridas para la progresión del ciclo celular tenían algún efecto sobre los fenotipos del interferente contra p115.

3.1. Activación de la progresión G2/M.

La transición G2/M depende principalmente de la regulación del complejo CycB/Cdk1. Dentro de las estrategias para activar a Cdk1 disponemos de construcciones que nos permiten realizar la sobreexpresión de la fosfatasa *string* (*cdc25*), el silenciamiento de la quinasa Myt1 (*UAS-Myt1i*), y una cepa que permite realizar la sobreexpresión de una versión etiquetada de Cdk1 (*Cdk1::myc*) y de la ciclina B1. Para analizar si alguna de estas construcciones era capaz de modificar el fenotipo de la depleción de p115, se co-expresaron en el compartimiento posterior del ala junto al dsRNA de p115.

En general, se encontró que la mayoría de las modificaciones de los reguladores positivos de Cdk1 no muestran fenotipo por sí solas. Respecto a esto, se ha mostrado que se debe a una compensación en los tiempos de residencia en G1 y G2. Si una de las etapas del ciclo se alarga, la otra se acorta, manteniendo el tiempo de duplicación celular constante (Neufeld y col., 1998).

Al co-expresarlas con el interferente de p115, se encontró que la disminución de Myt1 (quinasa necesaria para inactivar a Cdk1 localizada en el aparato de Golgi) es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo de crecimiento del ala (Figura 21B), así también la sobreexpresión de *Cdk1::myc* (Figura 21H), sugiriendo la participación de

p115 en la transición G2/M, pero no así otros activadores de la actividad quinasa de Cdk1 ensayados como Cdc25/String.

3.2. Efectos de la co-expresión de Cdk1 con el interferente de p115.

Ya sabemos que la falta de función de p115 es posible de ser rescatada a través de la sobreexpresión de Cdk1. Ahora la pregunta es ¿cómo Cdk1 es capaz de hacer esto? ¿Es capaz de devolver a los parámetros de progresión de ciclo celular a su normalidad?

Para analizar esto co-expresamos p115i junto a Cdk1::myc en el compartimiento posterior del disco de ala, siempre utilizando el compartimiento anterior como control del experimento.

A través del indicador de células en mitosis fosfohistona H3 encontramos que en la condición de co-expresión ya no se observa un aumento en el número de mitosis en la zona en la cual ésta se realiza (Figura 22A y A'). Por otra parte, mediante la incorporación de bromodeoxiuridina, observamos que el porcentaje de células en fase S en la zona donde se realizó la co-expresión (GFP positiva) también se reduce, siendo más evidente en el ZNC (Figura 22C y C'). Por último, respecto a la muerte celular, se observan una clara reducción del número de células positivas para caspasa 3 activada y sólo son evidentes en el límite del compartimiento posterior del disco (Figura 32E y E').

Al analizar los efectos sobre ciclo celular a través de citometría de flujo, observamos que las células provenientes del compartimiento anterior y posterior son del mismo tamaño (Figura 22D). El análisis por citometría del contenido de DNA mostró que las células aneuploides aparecen en menor cantidad, y que los perfiles de ciclo celular son similares entre las células p115i+Cdk1::myc (provenientes del compartimiento posterior) y las células control (provenientes del compartimiento anterior) (Figura 22F).

Podemos concluir que la sobreexpresión de Cdk1::myc es capaz de revertir completamente la mayoría de los fenotipos observados al expresar el interferente de p115, exceptuando la muerte celular, la cual se rescata solo parcialmente (Figura 22E y E').

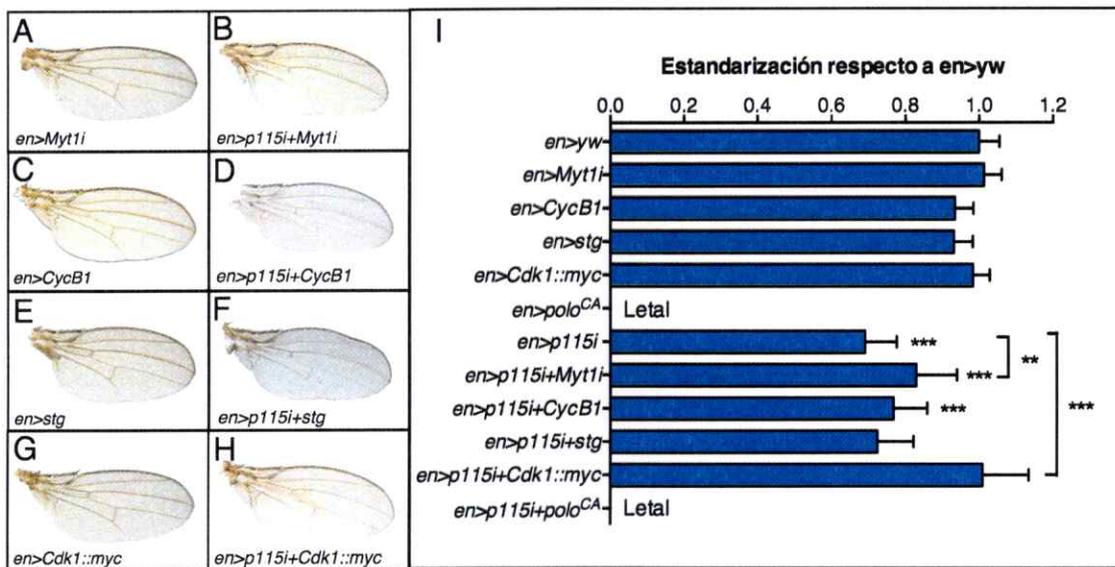
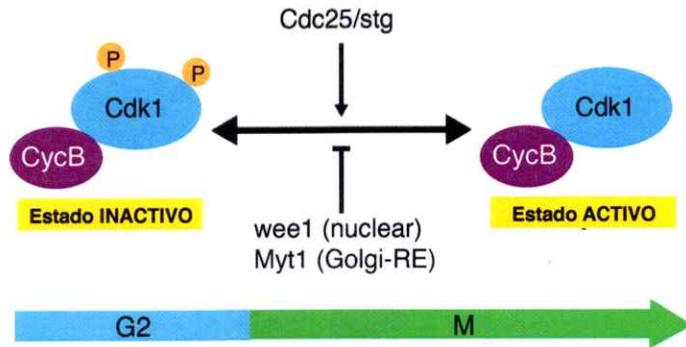


Figura 21. Efectos de la modificación en los niveles de reguladores positivos de la activación de Cdk1 (transición G2/M) y sus efectos sobre el tamaño del tejido en alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior

Arriba: Esquema de la activación de Cdk1 durante la mitosis en la cual se encuentran indicadas los activadores e inhibidores de esta. (A-H) Alas de moscas hembras que expresan en el compartimiento posterior lo indicado en cada una de las figuras. (ver genotipos) (I) Cuantificación del área del compartimiento posterior de cada una de los genotipos mostrados. Se presenta el promedio ± desviación estándar (n= 20). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía, donde *** indica un valor-p<0,001 y ** p<0,01. Podemos ver que la reducción de los niveles de Myt1 es capaz de rescatar parcialmente los fenotipos, en cambio la sobreexpresión de Cdk1 es capaz de rescatarlos completamente. La sobreexpresión de *cdc25/string* (*stg*) no tiene ningún efecto sobre los fenotipos. La sobreexpresión de una versión constitutivamente activa (CA) de polo es letal sobre ambos fondos genéticos. (Genotipos: (A) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-Myt1i* (B) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-Myt1i* (C) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-CycB1* (D) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-CycB1* (E) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-stg* (F) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-stg* (G) y *w/w*; *en-Gal4/+; UAS-Cdk1::myc* (H) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-Cdk1::myc*).

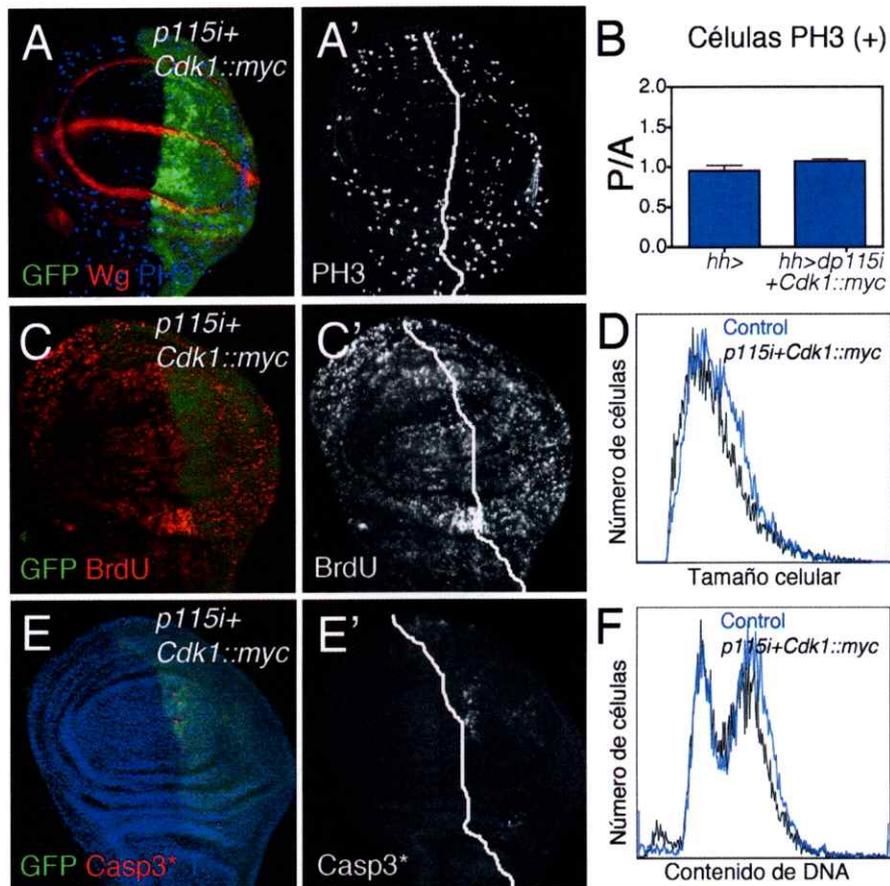


Figura 22. Parámetros de proliferación en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario que co-expresan el RNA doble hebra contra p115 junto a la sobreexpresión de una versión etiquetada de Cdk1.

(A, A', C, C', E, E') Discos imaginales de ala que presentan una depleción de p115 junto a la sobreexpresión de Cdk1::myc en el compartimento posterior indicado por la expresión de GFP (*w; UAS-p115i/+; hh-gal4, UAS-GFP/UAS-Cdk1::myc*), lo cual nos permite usar el compartimento anterior como control de proliferación. Las imágenes presentadas son proyecciones en Z. (A, A') Inmunofluorescencia contra fosfohistona H3 (PH3) y wingless (Wg). En (A') se observa que el número de células en mitosis es parejo en ambos casos (B) Cuantificación del número de células PH3 positivas (n=6) a través de la razón posterior/anterior determinada dentro del tejido presuntivo de ala (región circular demarcada por la expresión de la proteína wingless). Se muestra el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias no son significativas. (C, C') Incorporación de bromodeoxiuridina, el rectángulo blanco encierra la ZNC (*zone of non-proliferating cells*), donde se observa que esta continúa en el compartimento posterior. (E, E') Inmunofluorescencia contra caspasa 3 clivada, de tipo efectora que indica la activación de la muerte celular por apoptosis. (D, F) Citometrías de flujo realizadas a partir de células de discos imaginales teñidas con DRAQ5 (tinción estequiométrica de DNA) que presentan una depleción de p115 junto a la expresión de p35 en el compartimento posterior indicado por la expresión de GFP (*w; UAS-p115i/+; hh-gal4, UAS-GFP/UAS-Cdk1::myc*), lo cual nos permite usar el compartimento anterior como control de proliferación, disociados en tripsina. (D) Citometría para determinar el tamaño celular (FSC) vs. número de células, el cual no varía. (F) La citometría de flujo para determinar el contenido de DNA de las células muestra que las células se dejan de acumular en la fase G2 del ciclo celular y progresan por este de forma similar a las células controles.

3.2.1. ¿Cómo la sobreexpresión de Cdk1::myc es capaz de rescatar los fenotipos de falta de p115?

Al razonar sobre el cómo Cdk1 es capaz de revertir los efectos producidos por la reducción de p115 podemos plantearnos 2 hipótesis o la suma de ambas:

- (1) Bajo las condiciones de expresión del interferente, los niveles de **activación** de Cdk1 bajan y esto produce los fenotipos previamente descritos en el ciclo celular y la acumulación de células en G2/M y su posterior endorreplicación (similar a pérdidas parciales de Cdk1) (Weigmann y col., 1997).
- (2) La reducción de los niveles de p115 produciría un defecto en la **localización** de Cdk1, lo cual produciría la disminución en su activación y de esta forma los efectos anteriormente señalados.

3.2.1.1. Niveles de activación de Cdk1 en la condición de reducción de p115.

Bajo la premisa de la primera hipótesis podemos predecir que al reducir los niveles de p115 en las células, los niveles de Cdk1 activado, cuantificados a través de inmunoblot, deberían disminuir. No así los niveles totales de Cdk1, los cuales deberían permanecer constantes. Para poder cuantificar esto se utilizaron los datos obtenidos mediante *western blot* utilizando dos anticuerpos específicos, uno capaz de detectar la fosforilación de Cdk1 en la Tyr-15, indicador del estado inactivo de Cdk1 y el otro que nos permite revelar los niveles totales de Cdk1. A partir de estos resultados cuantificamos de forma normalizada que cantidad de Cdk1 está activa usando la expresión: $1 - [Cdk1-P/Cdk1]$. Para la preparación de las muestras utilizamos el controlador *nubbin-Gal4* (638>), el cual se expresa en todo el tejido que va a dar origen al ala.

Los análisis descritos muestran que la cantidad de Cdk1 activa disminuye en la condición deficiente en p115, siendo esta reducción no significativa en el caso de *p115i+p35* (inhibidor de la muerte celular). Esta situación se hace más evidente al reducir de manera más eficiente los niveles de p115 al co-expresar el RNA interferente junto a la RNAasa III Dicer 2. De esta manera los fenotipos asociados al ciclo celular evidenciados mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica pueden ser explicados por una reducción en los niveles de Cdk1 activo. Además la expresión de Cdk1::myc en la condición deficiente de p115 recupera los niveles de activación de Cdk1 (Figura 33),

siendo esto consistente con los parámetros de ciclo celular observados al co-expresar ambos en el disco de ala.

Esta observación es incapaz de explicar por si sola porque incrementos en la activación de Cdk1, a través de otros mecanismos como la sobreexpresión de *string* o ciclina B1 son incapaces de rescatar los fenotipos, proponiéndose que la insuficiente activación de Cdk1 se debería a problemas en su localización. Así se decidió analizar que ocurre con la formación de los husos mitóticos en presencia y cuando los niveles de p115 se encuentran disminuidos

3.2.2. p115 no es necesaria para la formación del huso mitótico en *Drosophila*.

En búsqueda de fenotipos de husos multipolares similares a los descritos en mamíferos para la depleción de p115 (Radulescu y col., 2011), al igual que los observados en la disminución indirecta de la activación de Cdk1 (Morris y Jalinet, 2005), se analizó la estructura de los husos mitóticos en depleción de p115 co-expresado con Dicer 2, o al depletar Cdk1 mediante un interferente contra éste (BSDC) a través de inmunofluorescencias con α -tubulina y tubulina junto a fosfohistona H3. Respecto a esto, no se observó ningún fenotipo evidente sobre la formación del huso mitótico en los discos imaginales de *Drosophila* con alguna de las depleciones realizadas, sugiriendo que p115 no participa de la formación de estos durante la mitosis (Figura 24).

3.2.3. Distribución de las unidades de Golgi en la condición de reducción de p115.

Resultados recientes obtenidos en líneas células de mamíferos en las cuales al disminuir los niveles de p115 mediante RNA interferentes se producen células multipolares y fallas en la citoquinesis debido a que p115 sería capaz de interactuar con γ -tubulina, uno de los componentes de los centrosomas (Radulescu y col., 2011). Por otro lado, se encontró que Cdk1 interactúa con los centrosomas durante la mitosis a través de la proteína Cep63 (no existe homólogo en *Drosophila*), decidiéndose estudiar si existía co-distribución de Cdk1 y p115 en los centrosomas, pudiendo una posible interacción explicar el efecto de activación de Cdk1, analizamos en condiciones silvestres y en condiciones donde estuviese depletado p115 si el aparato de Golgi

colocalizaba con los centrosomas durante la mitosis en *Drosophila*. No encontramos ningún defecto en distribución, incluso el aparato de Golgi no co-distribuye con los centrosomas (marcados con γ -tubulina), algo que normalmente ocurre en mamíferos (Figura 25).

.En principio, para determinar la localización de Cdk1 utilizamos en inmunofluorescencias el anticuerpo usado anteriormente en *western blots*. Este es capaz de reconocer la sobreexpresión o la reducción en los niveles de Cdk1 (Cdk1i), pero lamentablemente no es capaz de darnos resolución subcelular para determinar la localización de Cdk1, por lo cual se escogió una estrategia alternativa para ver si p115 era capaz de interactuar con Cdk1, mediante la determinación de la interacción física a través de la inmunoprecipitación de Cdk1.

3.2.4. Existencia de la interacción física entre Cdk1 y p115.

Ya que poseemos versiones etiquetadas de Cdk1 y p115, con myc y HA, respectivamente, se realizó una inmunoprecipitación a partir de discos que sobre-expresan ambas proteínas, usando como control extractos proteicos provenientes de larvas que sólo sobre-expresan HA::p115. Mediante esta técnica se encontró una interacción física entre ambas proteínas, contribuyendo a la posibilidad de que p115 sea necesario para el secuestro de Cdk1 en algún organelo (posiblemente Golgi o RE) o en el centrosoma para su activación, explicando de esta forma por que incrementos en la activación de Cdk1, a través de otros mecanismos como la sobreexpresión de *string* o ciclina B1 serían incapaces de rescatar los fenotipos.

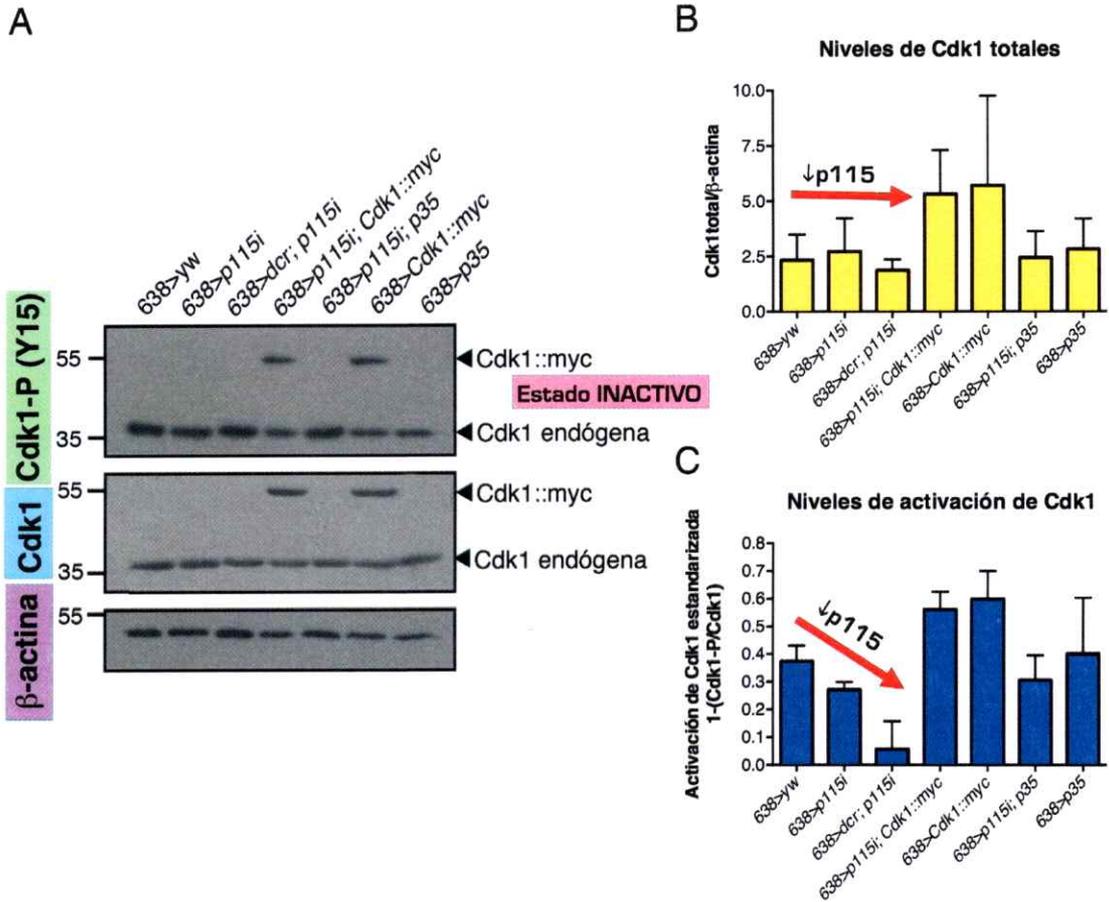


Figura 23. Determinación de la abundancia de forma activa de Cdk1 en discos imaginales controles y depletados de p115 a través de inmunoblot.

(A) Inmunoblot representativo en el cual se muestran todas las proteínas cargadas en el gel. La presencia de una doble banda en las muestras que sobreexpresan Cdk1::myc muestra el cambio en la movilidad electroforética causada por la etiqueta (siendo la de menor tamaño, la Cdk1 endógena). La cuantificación se realizó considerando la suma de ambas bandas. El anticuerpo Cdk1-P nos permite reconocer la fosforilación de la tirosina 15, la cual es la última en ser desfosforilada durante la activación de Cdk1, permitiéndonos de esta forma poder calcular los niveles de Cdk1 activa para cada uno de los genotipos. Los tres anticuerpos fueron revelados desde la misma membrana. (B) Niveles relativos de Cdk1 respecto a actina, podemos ver que los niveles de Cdk1 aumentan al sobreexpresar éste. Se muestran los promedios desviación estándar a partir de los datos obtenidos por densitometría utilizando el programa ImageJ de 4 inmunoblots distintos. (C) Cálculo de la abundancia relativa de la forma activada de Cdk1 a partir de las densitometrías obtenidas como $1 - (\text{Cdk1-P} / \text{Cdk1 total})$. (Genotipos: *638>yw*: *w nub-Gal4/y w*, *638>p115i*: *w nub-Gal4/w*; *UAS-p115i/+*, *638>dcr; p115i*: *w nub-Gal4/UAS-dcr*; *UAS-p115i/+* *638>p115i*; *Cdk1::myc*: *w nub-Gal4/w*; *UAS-p115i/+*; *UAS-Cdk1::myc/+*, *638>Cdk1::myc*: *w nub-Gal4/w*; *+/+*; *UAS-Cdk1::myc/+*, *638>p115i; p35*: *w nub-Gal4/w*; *UAS-p115i/+*; *UAS-p35/+*, *638>p35*: *w nub-Gal4/w*; *+/+*; *UAS-p35/+*).

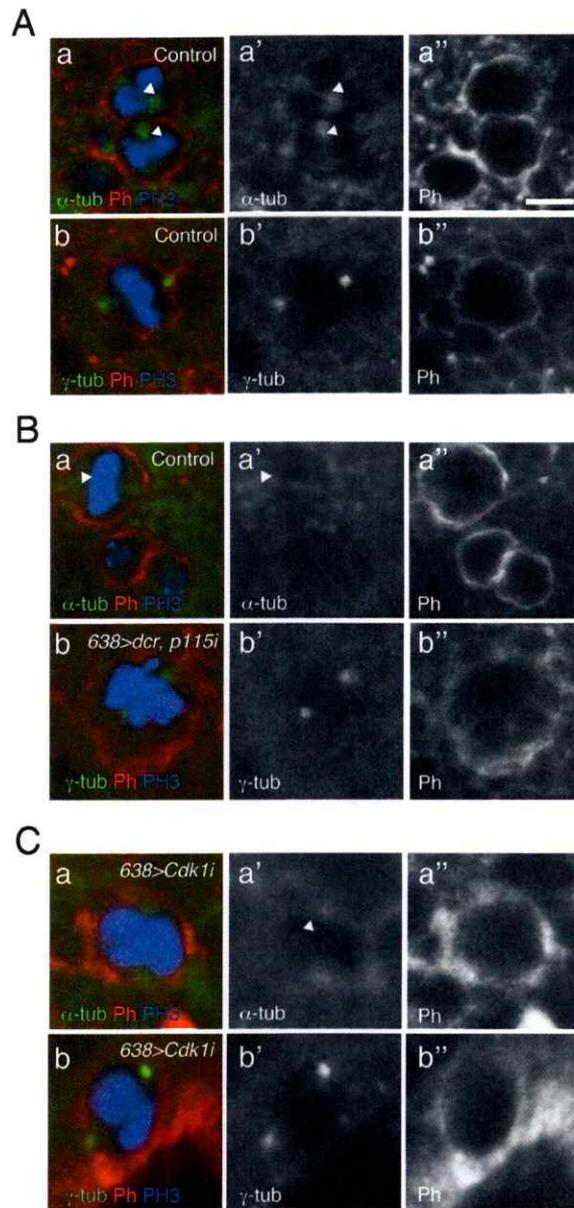


Figura 24. La depleción de p115 o Cdk1 en *Drosophila* no produce cambios observables en la formación de los husos mitóticos.

Inmunofluorescencia contra α -tubulina (marcador de microtúbulos) (a, a', a'') o γ -tubulina (marcador de los centrosomas) (b, b', b'') y fosfohistona H3 (marcador de células en mitosis). (B) Podemos ver en (a, a', a'') que los husos mitóticos se mantienen normales y en (b, b', b'') que no existen más de dos centrosomas por célula independiente al genotipo analizado. Barra: 5 μ m. (Genotipos: Control: *w nub-Gal4/y w* (A), *638>dcr; p115i: w nub-Gal4/UAS-dcr; UAS-p115i/+* (B) *638>Cdk1i: w nub-Gal4/+; UAS-Cdk1i/+* (C))

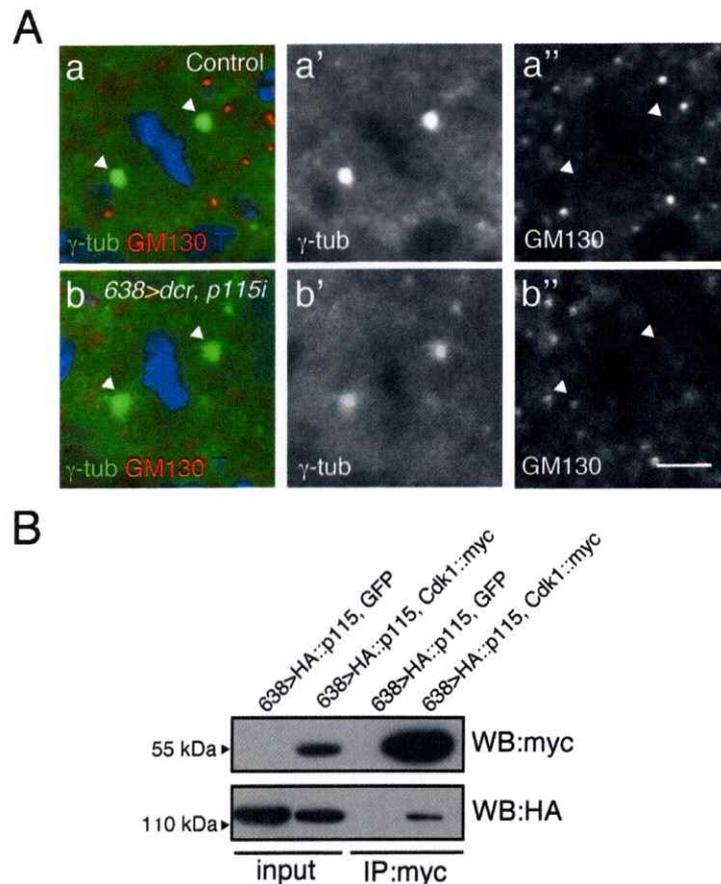


Figura 25. Distribución de las unidades de Golgi en la condición de reducción de p115 y existencia de interacción directa entre Cdk1 y p115 determinada por inmunoprecipitación.

(A) Distribución de las unidades de Golgi en la condición de reducción de p115. Inmunofluorescencia contra γ -tubulina (marcador de los centrosomas), GM130 (marcador de matriz de Golgi) y Topro (marcador de DNA, núcleos). Podemos ver que no existe una clara codistribución entre los centrosomas y las unidades de Golgi en los discos imaginales de *Drosophila* en condiciones control o experimentales. Barra = 5 μ m. (Genotipos: Control: w 638-Gal4/y w, 638>dcr, p115i: w 638-Gal4/UAS-dcr; UAS-p115i/+)

(B) Existencia de interacción directa entre Cdk1 y p115 determinada por inmunoprecipitación. Inmunoblot obtenido a partir de extractos proteicos inmunoprecipitados que sobre-expresan HA::p115 o co-expresan HA::p115 junto a Cdk1::myc usando bolitas de agarosa acopladas a myc. Se observa una interacción específica entre Cdk1 y p115. (Genotipos: 638>HA::p115, GFP: w 638-Gal4/+; UAS-HA::p115/+; UAS-mCD8::GFP/+, 638>HA::p115, Cdk1::myc: w 638-Gal4/+; UAS-HA::p115i/+; UAS-Cdk1::myc/+)

DISCUSIÓN

En esta tesis se propuso entender los mecanismos por los cuales las golginas o también denominadas proteínas de matriz de Golgi, en particular a través del estudio de la proteína p115, son requeridas para la progresión del ciclo celular en *Drosophila*. Este organismo es altamente accesible a la manipulación experimental, lo que junto a las cualidades genéticas, y técnicas moleculares disponibles, lo convierten en un modelo muy atractivo para obtener evidencias de cómo proteínas que normalmente ha sido estudiadas en el contexto de líneas celulares u organismos unicelulares (levaduras), pueden tener efectos sobre la proliferación celular y el desarrollo de un organismo.

Las diferencias de la estructuras del aparato de Golgi entre *Drosophila*, la cual presenta múltiples unidades de Golgi, y mamíferos, en cuyas células el aparato de Golgi forma sólo un organelo conectado y localizado de forma perinuclear, nos presenta una oportunidad única de poder observar si los mecanismos sobre los procesos en que participan en la estructuración de aparato de Golgi en las células de mamíferos y las de *Drosophila*, están conservados y hasta que nivel.

La transición de las unidades de Golgi en *Drosophila* desde una estructura túbulo-vesicular durante los estadios larvarios hacia la formación de cisternas durante la pupación en el desarrollo de los discos imaginales (Kondylis y col., 2001), permitió ver si esta transición tenía consecuencias sobre la proliferación, mediante la modificación de los niveles de las proteínas que favorecen o inhiben este proceso, dentro de las cuales se encuentra p115, la cual su silenciamiento es capaz de mantener un estado fragmentado de las unidades de Golgi.

En la primera parte de esta tesis, se establecieron las herramientas para el estudio de la función de la proteína p115: generar las condiciones de ganancia y pérdida de función de ésta para analizar sus efectos sobre el desarrollo del tejido. Estas herramientas se usaron para resolver cual es el papel que cumple la proteína p115 en las células imaginales de *Drosophila*, encontrándose que es requerida para la progresión del ciclo celular, principalmente durante la transición G2/M. En la segunda parte se estableció los fenotipos en ciclo celular observados eran causados por la falta de función de p115, y no por otros procesos en las que pudiese participar esta como

son la exocitosis/secreción o por la generación de defectos en la estructura del aparato de Golgi.

En la tercera parte se buscaron los posibles mecanismos del control del ciclo celular sobre los cuales ésta proteína actúa, determinando que ejerce su función en el proceso de activación de Cdk1, evento esencial para la correcta progresión de la mitosis.

El antecedente obtenido respecto la activación de Cdk1 podría explicar los fenómenos observados en células de mamíferos con pérdida de la función de cualquiera de las proteínas de matriz de Golgi: como formación de husos multipolares, detención de la mitosis y apoptosis como consecuencia de ésta (Sütterlin y col., 2005; Kodani y col., 2008; Eisman y col., 2006; Radulescu y col., 2011), sugiriendo que los mecanismos implicados en la desestructuración del aparato de Golgi durante el ciclo celular en mamíferos (donde se incluye como componente requerido la activación de Cdk1), estarían también relacionados con la transición G2/M y con su re-formación posterior a la división celular, indicando además que estos mecanismos estarían conservados ancestralmente.

En la cuarta parte, analizamos la formación de husos multipolares y la localización del aparato de Golgi durante la mitosis en *Drosophila*, en la búsqueda de antecedentes que pudiesen explicar la interacción entre Cdk1 y el aparato de Golgi. Nuestro punto de partida en este análisis fueron los antecedentes acerca de la interacción de p115 con γ -tubulina en mamíferos (Radulescu y col., 2011) y la localización de Cdk1 durante la mitosis (Loffler y col., 2011), encontrándose finalmente la existencia de una interacción física entre Cdk1 y p115, que podría explicar los fenotipos.

1. EFECTOS DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE p115 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA TRANSICIÓN G2/M.

1.1. Depleción de p115 y su relación con la proliferación celular.

A través de la herramienta UAS-p115^{i^{KK}} fuimos capaces de establecer que p115 es requerido para establecer el correcto ritmo de proliferación celular durante el crecimiento del disco imaginal de ala de *Drosophila*. La primera evidencia de esto fue la

disminución de tamaño del tejido en el adulto, que no es posible explicar por muerte celular o reducción del tamaño celular.

En las alas adultas queda sugerido que p115 pueda tener algún efecto en la transición de la forma celular desde células con 3 vértices (pentágonos y cuadrados) a células con 4 vértices (hexagónos) en el ala de *Drosophila* durante la pupación (Classen y col., 2005), por el menor tamaño de estas células observado en el tejido final, a pesar que éstas a través de citometría de flujo se observan del mismo tamaño o de mayor tamaño (Figuras 15 y 18), Esto se ha mostrado que está relacionado con la exocitosis y el reciclaje de ciertos componentes de la membrana entre los cuales se reconoce a la E-cadherina, lo cual permitiría asignarle un papel a p115 en los procesos de secreción/exocitosis.

1.2.1. Deficiencias y alelos.

El análisis de la deficiencia que contiene al locus p115: Df(1)ct4b1 que elimina en teoría el fragmento de cromosoma contenido entre la región citológica 7B2 y 7C4, pero que no ha sido definida molecularmente, arrojó una leve interacción positiva con el interferente contra p115. Se observó una mayor disminución en el tamaño del tejido adulto y un aumento de la densidad celular respecto al resultado obtenido con el interferente solo, sugiriendo que estos fenotipos son producidos específicamente por reducciones en p115 y que la deficiencia Df(1)ct4b1 incluye a p115.

Desgraciadamente, y como se mencionó anteriormente no existe en el *kit* de deficiencias de BDSC, los que si están definidos molecularmente, una deficiencia de la región genómica del locus p115.

Por otra parte, la interacción positiva entre el RNA de interferencia y el alelo de p115 disponible, generado por inserción de un elemento P en la región 5'UTR de este gen, confirmó también la especificidad del segundo interferente. Similar a lo observado con la deficiencia se produce una disminución leve del tamaño del tejido y un aumento de la densidad celular, sugiriendo que el interferente es eficiente en disminuir específicamente los niveles de la proteína p115.

1.2.2. Rescate por la ganancia de función HA::p115.

Además de las interacciones positivas del RNA de interferencia con deficiencias y el alelo mutante de p115, fuimos capaces de rescatar el fenotipo de la falta de función de p115 con la sobreexpresión del mismo. Esto junto a las interacciones con las mutaciones y deficiencias antes mencionadas confirman la noción que los fenotipos del interferente son causados específicamente por la depleción de la proteína p115.

La condición de ganancia de función, generada mediante la sobreexpresión de la proteína de fusión HA::p115, no posee por sí sola fenotipos evidentes durante el desarrollo del disco imaginal de ala o en alas adultas, sugiriendo que esta proteína tendría un papel permisivo más que instructivo en la proliferación celular y particularmente sobre la progresión de la mitosis.

2. PROCESOS EN LOS QUE PUDIERA ESTAR INVOLUCRADO p115.

2.1. Exocitosis y cambios en la estructura del aparato de Golgi.

La relación entre p115 y el fenómeno de secreción/exocitosis ha sido sugerido extensivamente en otros tipos celulares y/o organismos (Nakajima y col., 1991; Sohda y col., 2005). A pesar de las múltiples aproximaciones utilizadas, no se encontraron evidencias que p115 pudiese estar relacionada con la secreción/exocitosis, lo cual se traduciría en defectos en la formación del lumen (Figura 14A y C) y polaridad de marcadores apicales y/o basolaterales en las glándulas salivales (Szul y col., 2011), así como defectos en el *patterning* (reflejado en defectos en la venación) de tejidos como el ala adulta (Figura 11).

Determinamos que modificaciones a la estructura del aparato de Golgi generadas mediante la sobreexpresión de NSF1 o NSF2, que promueven la formación de cisternas a través de sus efectos sobre la fusión vesicular (Kondylis y col., 2001), no fueron capaces de modificar los fenotipos observados, sugiriendo que los efectos de la depleción de la proteína p115 sobre la proliferación no guardan relación directa con la posible sobrefragmentación de la estructura del aparato de Golgi causada por esta condición. En este sentido, cabe destacar que la sobreexpresión de NSF1 o NSF2 por sí solas, siendo estas capaces de llevar a las unidades de Golgi a una estructura de

cisterna (Kondylis y col., 2001), no poseen ningún efecto sobre el tamaño del compartimiento posterior, sugiriendo que la promoción de la fusión vesicular no posee efectos sobre la proliferación celular.

Por otro lado, intentamos generar una condición sostenida del Golgi en su estado túbulo-vesicular a través de la sobreexpresión de un dominante negativo del receptor de la hormona ecdisona (EcR^{DN}). La idea fue generar células insensibles al inductor de la estructuración en cisternas del aparato de Golgi. Esta aproximación fue letal. Podemos proponer aproximaciones alternativas para analizar esto, una opción sería a través de clones FLP-out para EcR^{DN}. Esto ya fue hecho por Mitchell y col., 2008, observándose una reducción del número de células fosfohistona H3 y BrdU positivas en los clones, insinuando que la falta de señalización por ecdisona reducen la proliferación, e incrementándose además los niveles de la proteína Wg en las células que se encuentran en el interior del clon, sugiriendo que a través de la señalización de esta proteína sería el mecanismo implicado para la regulación de la proliferación. El esquema propuesto acerca de este mecanismo es que ecdisona sería capaz de reducir los niveles de Wg reduciendo la represión transcripcional que éste ejerce sobre *string* (G2/M) y *dMyc*, a través de la regulación de E2F1 (G1/S). Por lo tanto, ecdisona sería un promotor de la proliferación, al incrementar los niveles de String y dMyc (Mitchell y col., 2008).

Nuestros resultados sugieren que este mecanismo no está implicado en la relación que tiene p115 con la progresión del ciclo celular, debido a que los parámetros de ciclo celular obtenidos en ausencia de p115 son diferentes (incremento de PH3/BrdU/muerte) y además no se observaron variaciones en los niveles de la proteína Wg en el compartimiento posterior de los discos imaginales depletados de p115.

Si buscamos otros organismos multicelulares donde se haya analizado el papel de la proteína p115, sólo encontramos reportes de los efectos de su depleción a través de mutaciones nulas en *A. thaliana* y mediante RNA interferente en *C. elegans*. En *Arabidopsis* se obtienen plantas viables, pero enanas (Takahashi y col., 2010) y se mostró que era requerido para un eficiente transporte anterógrado. En cambio, en *C. elegans*, se mostró que p115 sería requerido en la secreción de ciertos cargos específicos, causando la acumulación de la proteína soluble del vitelo de 170 kDa

(YP170) en la cavidad del cuerpo y la retención de receptor del vitelo RME-2 en el Golgi y retículo endoplasmático (Grabski y col., 2012). Aún no está claro el porqué algunos cargos son afectados por la depleción de esta proteína y otros no.

Para el caso de *Drosophila*, pudimos detectar que esta proteína es esencial para el desarrollo del organismo.

2.2. Otras golginas: GM130 y Grasp65.

En esta tesis no se pudo evaluar la función de otras golginas, sobre los efectos de p115 o independientemente. Quedaron pendientes como proteínas interesantes de analizar debido a su relación con p115, sus efectos en fragmentación del Golgi (Kondylis y col., 2005) y los fenotipos relacionados con múltiples husos mitóticos en líneas celulares de mamíferos. De GM130, además se ha descrito su papel en la formación del huso meiótico durante las divisiones asimétricas en la ovogénesis de ratón (Zhang y col., 2011). Ambos fenotipos celulares podrían relacionarse con el reciente hallazgo que relaciona a GM130 y el citoesqueleto de actina a través de Cdc42 (Kodani y col., 2009). No observamos que los fenotipos producido por depleción de p115 se incrementaran al combinar la expresión de este interferente con uno contra GM130 (VDRC). Acerca de Grasp65 quedó pendiente poder mirar si presentaba defectos en el ciclo celular como p115, que pudiesen explicar la reducción del tamaño final de las alas adultas, aparte de su papel en la secreción no convencional (independiente de Golgi) ya establecida (Schötman y col., 2008)

3. p115 Y LA TRANSICIÓN G2/M.

El centro experimental de esta tesis fue tratar de explicar la reducción del tamaño del tejido causado por el interferente de p115. Los hallazgos generados por nuestra experimentación fueron complementados con los antecedentes generados en levadura y líneas celulares de mamíferos.

La aproximación utilizada debido a que la reducción del tamaño del tejido no era equivalente a la disminución del tamaño celular, lo que sugería una menor cantidad de células finales en el tejido, fue analizar el ciclo celular de estas células. Esto se realizó a través de inmunofluorescencias y citometría de flujo para obtener el perfil de

los contenidos de DNA de las poblaciones analizadas. Encontramos que en condiciones de depleción de p115, se produjeron cambios en los perfiles de citometría consistentes con los resultados obtenidos mediante los análisis inmunocitoquímicos de los distintos parámetros de ciclo celular analizados: incremento en el número de células positivas para fosfohistona H3 y bromodeoxiuridina, no obstante obteniéndose un número final de células menor en las alas adultas, indicándonos que posiblemente estaban quedando retenidas en alguna etapa del ciclo celular: mitosis o replicación del DNA. Lo anterior se evidenció en los estudios de citometría de flujo, donde pudimos definir que las células estaban quedando retenidas en G2/M y entrando en re-replicaciones del DNA, situación que se observa como poblaciones super-G2.

Dentro de los análisis de ciclo celular, la preocupación más grande fue poder establecer que los fenotipos observados a través de inmunofluorescencias y citometrías de flujo no fueran consecuencia de proliferación compensatoria en el compartimiento posterior causado por la muerte celular (Perez-Garijo y col., 2004). Esto fue descartado mediante la expresión del inhibidor de la apoptosis p35 en la condición de depleción de p115. El hecho que los fenotipos se intensifiquen con el inhibidor de la apoptosis revela los efectos reales de la depleción de p115, excluyendo los potenciales efectos de proliferación compensatoria causados por la muerte celular. Se observó así un aumento en el tamaño celular a través de la citometría de flujo y la acumulación de la mayoría de las células en los estadios G2 – supraG2 del ciclo. Esto es similar a lo descrito en clones mutantes de componentes del ciclo celular, por ejemplo *string* (Neufeld y col, 1998) o con versiones termosensibles de Cdk1 (Weigmann y col., 1997), lo que nos sugirió que el proceso en el cual participaría p115 es la transición G2/M del ciclo celular. De esta forma nuestro siguiente paso fue poder confirmar el requerimiento de p115 en este proceso a través de la búsqueda de modificadores del fenotipo de tamaño dentro de los genes que participan en el ciclo celular en sus distintas etapas.

4. MODIFICADORES DEL FENOTIPO DE p115: PROMOTORES DEL ESTADO ACTIVO DE CDK1.

4.1. Cdk1 (rescate total) y Myt1 (rescate parcial).

La transición G2/M depende principalmente de la regulación del complejo CycB/Cdk1. Al buscar modificadores del fenotipo dentro de las proteínas relacionadas con la regulación positiva de este complejo encontramos la sobreexpresión de Cdk1 (rescate total), quinasa dependiente de ciclina y el silenciamiento de Myt1 (rescate parcial), quinasa necesaria para la inactivación de Cdk1.

Al realizar el análisis cómo eran los niveles de activación de Cdk1 respecto a los niveles de p115, encontramos que éstos se redujeron al disminuir los niveles de p115. De manera interesante, el incremento en la activación de Cdk1 observada cuando la sobreexpresamos no se reduce a un problema de masa ya que la cantidad activa esta normalizada respecto a los niveles totales de Cdk1 presentes en el tejido. Esto quiere decir que al sobreexpresar Cdk1 se logra activar una proporción mayor de esta quinasa, posiblemente porque la sobreexpresión permite distribuir a Cdk1 en regiones donde se produce su activación y, donde en ausencia de p115, Cdk1 se asociaría débilmente.

Cdk1 en su activación funcionaría como un circuito bistable, en el cual sería necesario alcanzar un determinado nivel de activación para que la célula inicie la mitosis y un nivel mayor de activación para la salida de ella (Linvquist y col., 2007). Bajo esta hipótesis, lo que ocurriría al disminuir la proteína p115, y por consiguiente, una reducción en los niveles de activación de Cdk1, sería que las células serían capaces de entrar en mitosis pero incapaces de salir de ésta, produciéndose de esta forma los fenotipos observados (Figura 26), lo cual sería sobrellevado al sobreexpresar Cdk1 y aumentar de esta forma los niveles de Cdk1 activado. Esto sugiere que el arresto observado no es G2/M, sino que las células quedan arrestadas en alguna etapa de la mitosis y p115 sería necesario para la progresión mitótica.

La observación de que un activador de Cdk1 citoplasmático como la fosfatasa *string*, sea incapaz de rescatar los fenotipos, nos permiten añadir un nivel de complejidad, y lo que ocurriría al depletar las células de p115 no sería solo un problema de la activación de Cdk1, sino que también tendría relación la distribución de

Cdk1 durante la mitosis, en particular su asociación con los centrosomas o el aparato de Golgi para asegurar su correcta herencia (Bailly y col., 1989; Löffler y col., 2011; Hölzenspies y col., 2009).

Sobre el mecanismo que esta relacionado con la localización de Cdk1 durante la mitosis, el rescate parcial reduciendo los niveles de Myt1 nos da luces de cómo podría ser. Myt1 esta localizada principalmente en las membranas del retículo y el aparato de Golgi a través de una modificación post-traducciona: miriostilación.

En mamíferos, se cree que dentro de los procesos que resultan como consecuencia la fragmentación del aparato de Golgi es que Myt1 disminuya su actividad, permitiendo la activación de Cdk1 por las fosfatasas del citoplasma. A pesar de que Myt1 es un regulador negativo de Cdk1, podría ser requerido para el secuestro de Cdk1 en el aparato de Golgi . Estudios han mostrado que Myt1 y Cdk1 pueden interactuar físicamente por dominios diferentes al dominio kinasa (Wells y col., 1999). Myt1 podría actuar como un reservorio para localizar a Cdk1 en el Golgi, para que en la mitosis el complejo Cdk1/ciclina B este presente en este organelo y una vez activado pueda fosforilar a las proteínas en el Golgi antes de ser transportado al núcleo (Cornwell y col., 2002). En este sentido se podría pensar que p115 sería necesario para esta interacción y que en las condiciones de falta de p115, la localización subcelular de Cdk1 se pierde reduciéndose sus opciones de activación.

Ahora esto implicaría que durante algún punto de la mitosis Cdk1 se localizaría cerca del aparato de Golgi y retículo endoplasmático, específicamente en los sitios transicionales, lo cual fue observado a través de un anticuerpo contra GM130-P, siendo esto sugerido sólo en una publicación y específicamente para el caso de las meiosis en ovocitos de cerdo (Hölzenspies y col., 2009).

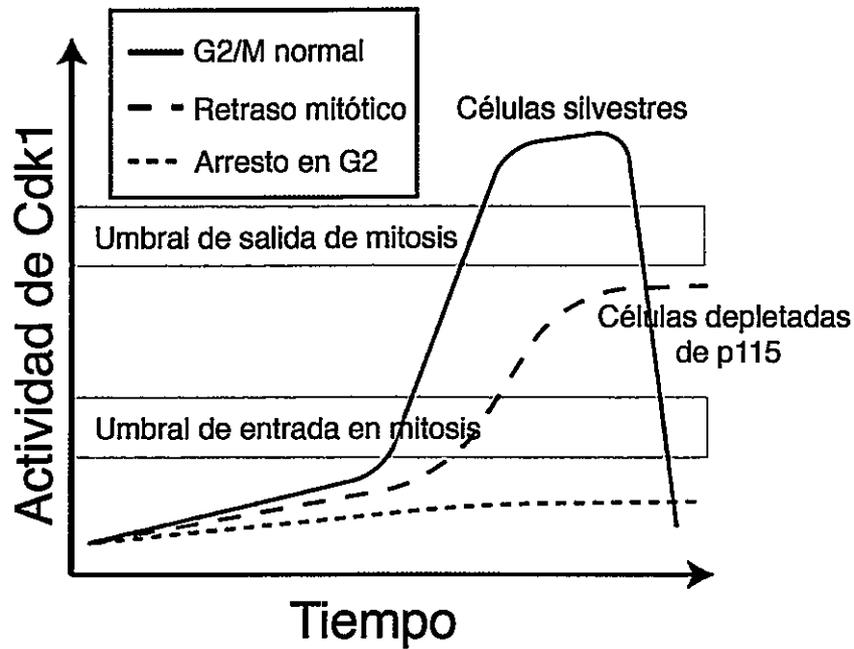


Figura 26. Efectos de la depleción de p115 sobre el ciclo celular y la activación de Cdk1.

Esquema que muestra los niveles de Cdk1 activo que se deben alcanzar durante el tiempo para una progresión normal de la mitosis y el caso de las células depletadas de p115, en las cuales los niveles de Cdk1 activados no son suficientes para permitir su salida de la mitosis. (Modificado desde Lindquist y col., 2007).

5. MECANISMOS POSIBLES DEL ACOPLAMIENTO DE LA ACTIVACIÓN DE CDK1 CON EL APARATO DE GOLGI.

5.1. Centrosomas

El nivel de identidad de secuencias entre p115 de humano y de *Drosophila* sugiere que γ -tubulina y p115, al igual que en mamíferos, interactuarían también en *Drosophila*, y esta interacción sería necesaria en la formación del huso mitótico (Radulescu y col., 2011). Al analizar la localización de Cdk1 en distintas líneas celulares, observamos que durante la mitosis éste se tiende a concentrar en los centrosomas (Lindqvist y col., 2007; Löffler y col., 2011), pudiendo ser el centrosoma el punto donde estas tres proteínas interactuarían permitiendo la activación completa de Cdk1. Además, depleciones de Cdk1 en líneas celulares de mamíferos también produce husos mitóticos multipolares similar a reducciones en p115 (Löffler y col., 2011; Radulescu y col., 2011).

Ahora, las células de mamífero que poseen un aparato de Golgi estructurado en cisternas y que se encuentra de forma juxtannuclear requieren sistemas especiales que están relacionados con el centrosoma para la polarización y partición del Golgi durante la división celular. En *Drosophila* en cambio, sus células poseen múltiples unidades de Golgi, se ha planteado que la polaridad se alcanza por exocitosis en las zonas específicas requeridas (Herpers y Rabouille, 2004) y que los centrosomas no serían en ningún caso esenciales para la división celular. Esto fue demostrado en mutantes que no poseen centriolos, las cuales se desarrollaban normalmente (Basto y col., 2006)

Nosotros no fuimos capaces de observar una correlación entre la localización de las unidades de Golgi (donde se localiza p115) y γ -tubulina. Además fuimos incapaces de detectar defectos en los husos mitóticos durante las distintas etapas de la mitosis en discos imaginales depletados de p115. Esto podría ser explicado, considerando que se han generado moscas que poseen sobreexpresión de las proteínas del centriolo, en las cuales se observa que a pesar de tener la capacidad de generar husos mitóticos multipolares, en la mayoría de las mitosis los centrosomas se tienden a juntar y generan finalmente mitosis bipolares (Basto y col., 2008), pudiendo ser así que este fenómeno oculte los fenotipos observables. Respecto a esto, es sabido que moscas que expresan un alelo termosensible de Cdk1 a temperaturas

restrictivas poseen centriolos con defectos en su estructura (Vidwans y col., 2003). Análisis de microscopía electrónica de discos imaginales con reducciones parciales en Cdk1 podría aclarar los efectos de las reducciones de p115 sobre la estructura de los centrosomas y la funcionalidad de los husos mitóticos.

En los resultados de la falta de función de p115 en líneas celulares de mamífero se evidencia que además de los defectos en la estructuración del huso mitótico, se detectan fallas en la citoquinesis (Radulescu y col., 2011), similares a lo observado en ausencia de syntaxina 5 en espermatozoides de *Drosophila* (Xu y col., 2002). Nosotros realizamos experimentos silenciando p115 en el testículo de *Drosophila*, utilizando drivers-Gal4 específicos para estas células: *nanos VP::16-Gal4* para las células germinales y *traffic jam-Gal4* para las células somáticas del testículo, junto a la sobreexpresión de Dicer (para aumentar la eficiencia del interferente) y analizamos las estructuras de la gónada y de los espermatozoides mediante microscopía de Nomarski, observándose que las estructuras eran normales y no parecían tener defectos análogos a los observados en mutantes para *syntaxina 5*. En este experimento tenemos la desventaja que las líneas pUAST, como lo son las líneas que expresan los RNAs de doble hebra utilizados, no son muy eficientes en su expresión en las células germinales (existe otro vector de transformación denominado pUASP, el cual es mucho más eficiente; Rørth, 1998).

Para evaluar si existían efectos sobre la citoquinesis, además analizamos células en anafase y telofase, en las cuales no fue posible visualizar defectos en la citoquinesis de las células en el disco imaginal depletadas de p115 (Figura 25):

5.2. Interacción física entre Cdk1 y p115.

Nuestros resultados sugieren que p115 participa en la progresión de la mitosis al actuar sobre la activación de Cdk1, lo cual sería un paso posterior al punto de control G2/M dependiente de fragmentación de aparato de Golgi descrito por otros autores en diferentes tipos celulares (Sütterlin y col., 2001; Presinger y col., 2005, observaciones en células de mamífero; Kondylis y col., 2007, observaciones en células S2)), ya que bajo la activación de este punto de control G2/M a través del bloqueo de la fragmentación por métodos genéticos o farmacológicos, las células son incapaces de entrar a mitosis, visto a través la presencia de fosfohistona H3.

En cambio, nosotros observamos que las células en *Drosophila* son capaces de entrar a mitosis (definida a través del mismo método de análisis) pero permanecen durante tiempos más prolongados en esta etapa del ciclo celular y un efecto sobre los niveles de la activación de Cdk1, sugiriendo la presencia de un punto de control posterior y si tomamos en consideración que la depleción de distintas proteínas de matriz de Golgi presentan los mismos fenotipos en mamíferos, podemos pensar que este punto de control, al parecer, depende directamente de la presencia de las proteínas de matriz de Golgi.

En cualquier caso, ya sea en los centrosomas o en el Golgi-RE existe la posibilidad de que p115 (y por extensión las otras proteínas de matriz de Golgi) interactúe en algún punto del ciclo celular con Cdk1.

Para esto se evaluó si existía interacción directa entre p115 y Cdk1 en condiciones de sobreexpresión de estas proteínas, a través de inmunoprecipitación de proteínas expresadas en discos imaginales, utilizando las etiquetas que poseen las construcciones de sobreexpresión (HA y myc, respectivamente). Se encontró la existencia de la interacción, a pesar que no podemos decir si es directa o es a través de un complejo de proteínas, pero implica que p115 podría estar secuestrando a Cdk1 en algún organelo para su activación.

5.3. Próximos pasos.

Nos encontramos desarrollando distintas cepas que permiten expresar versiones de p115 humano (insensibles al RNA de doble hebra), lo cual nos permitiría comprobar la conservación funcional de p115 y de los potenciales dominios de interacción con Cdk1. Una de las diferencias principales entre p115 de *Drosophila* y de humano, es la presencia del dominio ácido (AD), presente solo en la proteína humana, el cual interactúa con GM130 y con gigantina (no hay homólogo presente en *Drosophila*), lo cual nos permitiría estudiar los efectos de este dominio sobre la estructuración del aparato de Golgi. Otra línea de investigación sería analizar la interacción de p115 con Cdk1 en distintos niveles de activación de éste último.

Por último, sería interesante evaluar si Cdk1 es capaz de rescatar los husos multipolares generados por faltas de p115 en líneas celulares de mamíferos,

comprobando de esta forma que los mecanismos que involucran la activación de Cdk1 están conservados entre distintos organismos con estructuras de aparato de Golgi y mecanismos de herencia de éste muy distintos.

CONCLUSIONES

1. Nuestros experimentos muestran que las células imaginales, con una configuración del Golgi vesiculo-tubular, también tienen un defecto en la progresión mitótica en G2/M causado por la **ausencia de p115**.
2. Este defecto sería causado directamente por la **ausencia de p115** y no por otros posibles fenómenos asociados a su falta de función, como son defectos en la exocitosis/secreción o defectos en la estructura del aparato de Golgi.
3. **p115 es requerido para la activación completa de Cdk1**. La depleción de p115 reduce los niveles de Cdk1 activo, permitiendo a las células entrar en mitosis pero no su salida de ésta, causando un retraso en la mitosis y la endorreplicación de su ADN en el disco imaginal de ala.
4. **Existe interacción física entre p115 y Cdk1**, la que permite plantear que dentro de las funciones de p115 podría estar el secuestro o relocalización de Cdk1 durante la mitosis, para permitir su completa activación.

Esto nos permite proponer que el punto de control G2/M en Drosophila lo produce la relocalización de la proteína p115 y/o otras golginas, y al parecer no directamente el evento de fragmentación del aparato de Golgi durante la mitosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, U., Mallababarrena, A., Acharya, J. K. and Malhotra, V. (1998). Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* **92**, 183–192.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). Molecular biology of the cell, Chapter 17: The Cell Cycle. *Garland Science*.
- Bailly, E., Doree, M., Nurse, P. and Bornens, M. (1989). p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2 /M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J.* **8**, 3985–3995.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895–907.
- Barr, F. A. and Short, B. (2003). Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 405–413.
- Barr, F. A., Nakamura, N. and Warren, G. (1998). Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* **17**, 3258–3268.
- Basto, R., Brunk, K., Vinadogrova, T., Peel, N., Franz, A., Khodjakov, A. and Raff, J. W. (2008). Centrosome Amplification Can Initiate Tumorigenesis in Flies. *Cell* **133**, 1032–1042.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. and Raff, J. W. (2006). Flies without Centrioles. *Cell* **125**, 1375–1386.
- Björklund, M., Taipale, M., Varjosalo, M., Saharinen, J., Lahdenperä, J. and Taipale, J. (2006). Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nat. Cell Biol.* **439**, 1009–1013.
- Blair, S. S. (1993). Mechanisms of compartment formation: evidence that non-proliferating cells do not play a critical role in defining the D/V lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **119**, 339–351.
- Bobinnec, Y., Marcaillou, C., Morin, X. and Debec, A. (2003). Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **54**, 217–225.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Bryant, P. J. and Simpson, P. (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol* **59**, 387–415.
- Chen, F., Archambault, V., Kar, A., Lio, P., D'Avino, P. P., Sinka, R., Lilley, K., Laue, E. D.,

- Deak, P., Capalbo, L., et al.** (2007). Multiple Protein Phosphatases Are Required for Mitosis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **17**, 293–303.
- Classen, A. K., Anderson, K. I., Marois, E. and Eaton, S.** (2005). Hexagonal Packing of *Drosophila* Wing Epithelial Cells by the Planar Cell Polarity Pathway. *Dev Cell* **9**, 805–817.
- Colanzi, A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. and Malhotra, V.** (2000). A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J. Cell. Biol.* **149**, 331–339.
- Colanzi, A., Sütterlin, C. and Malhotra, V.** (2003). RAF1-activated MEK1 is found on the Golgi apparatus in late prophase and is required for Golgi complex fragmentation in mitosis. *J. Cell. Biol.* **161**, 27–32.
- Corda, D., Barretta, M. L., Cervigni, R. I. and Colanzi, A.** (2012). Golgi complex fragmentation in G2/M transition: An organelle-based cell-cycle checkpoint. *IUBMB Life* **64**, 661–670.
- Cornwell, W. D., Kaminski, P. J. and Jackson, J. R.** (2002). Identification of *Drosophila* Myt1 kinase and its role in Golgi during mitosis. *Cellular Signalling* **14**, 467–476.
- Dirac-Svejstrup, A. B., Shorter, J., Waters, M. G. and Warren, G.** (2000). Phosphorylation of the vesicle-tethering protein p115 by a casein kinase II-like enzyme is required for Golgi reassembly from isolated mitotic fragments. *J. Cell. Biol.* **150**, 475–488.
- Dunne, J. C., Kondylis, V. and Rabouille, C.** (2002). Ecdysone triggers the expression of Golgi genes in *Drosophila* imaginal discs via broad-complex. *Dev. Biol.* **245**, 172–186.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–156.
- Edgar, B. A. and Datar, S. A.** (1996). Zygotic degradation of two maternal *Cdc25* mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program. *Genes Dev.* **10**, 1966–1977.
- Eisman, R. C., Stewart, N., Miller, D. and Kaufman, T. C.** (2006). centrosomin's beautiful sister (cbs) encodes a GRIP-domain protein that marks Golgi inheritance and functions in the centrosome cycle in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* **119**, 3399–3412.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. and Banerjee, U.** (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**, 673–690.
- Frescas, D., Mavrikakis, M., Lorenz, H., Delotto, R. and Lippincott-Schwartz, J.** (2006). The secretory membrane system in the *Drosophila* syncytial blastoderm embryo exists as functionally compartmentalized units around individual nuclei. *J. Cell. Biol.* **173**, 219–230.
- García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature New Biol.* **245**, 251–253.
- Garola, F., Guerra, D., Pezzoli, M. C., López-Varea, A., Cavicchi, S. and García-Bellido, A.** (2000). Cell behaviour of *Drosophila* fat cadherin mutations in wing development. *Mech. Dev.* **94**, 95–109.

- Glover, D. M., Ohkura, H. and Tavares, A. (1996). Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? *J. Cell. Biol.* **135**, 1681–1684.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., et al. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.* **274**, 25543–25549.
- Goto, S., Taniguchi, M., Muraoka, M., Toyoda, H., Sado, Y., Kawakita, M. and Hayashi, S. (2001). UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat. Cell Biol.* **3**, 816–822.
- Grabski, R., Balklava, Z., Wyrozumska, P., Szul, T., Brandon, E., Alvarez, C., Holloway, Z. G. and Sztul, E. (2012). Identification of a functional domain within the p115 tethering factor that is required for Golgi ribbon assembly and membrane trafficking. *J. Cell. Sci.* **125**, 1896–1909.
- Greenspan, R. J. (2004). *Fly Pushing*. CSHL Press.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121–2129.
- Haynie J. L. y Bryant P.J. (1976) Intercalary regeneration in imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. **259**(5545):659-62.
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P. and Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348–360.
- Herspers, B., Rabouille, C. (2004). mRNA Localization and ER-based Protein Sorting Mechanisms Dictate the Use of Transitional Endoplasmic Reticulum-Golgi Units Involved in Gurken Transport in *Drosophila* Oocytes. *Mol. Biol. Cell* **15**(12): 5306--5317.
- Hölzenspies, J. J., Stoorvogel, W., Colenbrander, B., Roelen, B. A., Gutknecht, D. R. and van Haeften, T. (2009). CDC2/SPDY transiently associates with endoplasmic reticulum exit sites during oocyte maturation. *BMC Dev. Biol.* **9**, 8.
- Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr. Biol.* **14**, 1262–1266.
- Jackson, C. L. and Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60–67.
- James A. A. y Bryant P. J. (1981) A quantitative study of cell death and mitotic inhibition in gamma-irradiated imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster*. *Radiat Res.* **87**(3):552-64.
- Jesch, S. A. and Linstedt, A. D. (1998). The Golgi and endoplasmic reticulum remain independent during mitosis in HeLa cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 623–635.

- Jesch, S. A., Lewis, T. S., Ahn, N. G. and Linstedt, A. D.** (2001). Mitotic phosphorylation of Golgi reassembly stacking protein 55 by mitogen-activated protein kinase ERK2. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1811–1817.
- Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82–84.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. and Gallant, P.** (1999). *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell* **98**, 779–790.
- Jokitalo, E., Cabrera-Poch, N., Warren, G. and Shima, D. T.** (2001). Golgi clusters and vesicles mediate mitotic inheritance independently of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **154**, 317–330.
- Kano, F., Takenaka, K., Yamamoto, A., Nagayama, K., Nishida, E. and Murata, M.** (2000). MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic *Xenopus* extracts. *J. Cell. Biol.* **149**, 357–368.
- Kodani, A. and Sütterlin, C.** (2008). The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Mol. Biol. Cell* **19**, 745–753.
- Kodani, A., Kristensen, I., Huang, L. and Sütterlin, C.** (2009). GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1192–1200.
- Kondylis, V. and Rabouille, C.** (2003). A novel role for dp115 in the organization of tER sites in *Drosophila*. *J. Cell. Biol.* **162**, 185–198.
- Kondylis, V., Goulding, S. E., Dunne, J. C. and Rabouille, C.** (2001). Biogenesis of Golgi stacks in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2308–2327.
- Kondylis, V., Spoorendonk, K. M. and Rabouille, C.** (2005). dGRASP localization and function in the early exocytic pathway in *Drosophila* S2 cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4061–4072.
- Kondylis, V., van Nispen tot Pannerden, H. E., Hoppers, B., Friggi-Grelin, F. and Rabouille, C.** (2007). The Golgi Comprises a Paired Stack that Is Separated at G2 by Modulation of the Actin Cytoskeleton through Abi and Scar/WAVE. *Dev Cell* **12**, 901–915.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V. and Baum, B.** (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr. Biol.* **13**, 1867–1875.
- Lannan, E., Vandergaast, R. and Friesen, P. D.** (2007). Baculovirus Caspase Inhibitors P49 and P35 Block Virus-Induced Apoptosis Downstream of Effector Caspase DrICE Activation in *Drosophila melanogaster* Cells. *J. Virol.* **81**, 9319–9330.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K. and Suter, B.** (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes & Development* **12**, 370–381.
- Lee, L. A. and Orr-Weaver, T. L.** (2003). Regulation of cell cycles in *Drosophila* development:

intrinsic and extrinsic cues. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 545–578.

- Lehman, D. A., Patterson, B., Johnston, L. A., Balzer, T., Britton, J. S., Saint, R. and Edgar, B. A.** (1999). Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25. *Development* **126**, 1793–1803.
- Li, B. X., Satoh, A. K. and Ready, D. F.** (2007). Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors. *J. Cell. Biol.* **177**, 659–669.
- Li, X., Urwyler, O. and Suter, B.** (2010). *Drosophila* Xpd regulates Cdk7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics, and chromosome segregation. *PLoS Genet* **6**, e1000876.
- Lin, C. Y., Madsen, M. L., Yarm, F. R., Jang, Y. J., Liu, X. and Erikson, R. L.** (2000). Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 12589–12594.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. and Piwnicka-Worms, H.** (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 571–583.
- Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C. and Wolthuis, R. M. F.** (2007). Cyclin B1-Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *PLoS Biol* **5**, e123.
- Loffler, H., Fechter, A., Matuszewska, M., Saffrich, R., Mistrik, M., Marhold, J., Hornung, C., Westermann, F., Bartek, J. and Kramer, A.** (2011). Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance. *Cancer Research* **71**, 2129–2139.
- Lowe, M., Gonatas, N. K. and Warren, G.** (2000). The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. *J. Cell. Biol.* **149**, 341–356.
- Lowe, M. and Barr, F. A.** (2007). Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 429–439.
- Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jämsä, E., Rahman, D., Pappin, D. J. and Warren, G.** (1998). Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* **94**, 783–793.
- Lucocq, J. M. and Warren, G.** (1987). Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. *EMBO J.* **6**, 3239–3246.
- Lunde, K., Trimble, J. L., Guichard, A., Guss, K. A., Nauber, U. and Bier, E.** (2003). Activation of the knirps locus links patterning to morphogenesis of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **130**, 235–248.
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A. and Rørth, P.** (2000). Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* **101**, 511–522.
- Mellick, A. S.** (2006). *Lab Ref.* CSHL Press.

- Meyer, C. A., Jacobs, H. W., Datar, S. A., Du, W., Edgar, B. A. and Lehner, C. F. (2000). *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *EMBO J.* **19**, 4533–4542.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5691–5696.
- Mistell, T. and Warren, G. (1995). Mitotic disassembly of the Golgi apparatus in vivo. *J. Cell Sci.* **108**, 2715–2727.
- Mitchell, N., Cranna, N., Richardson, H. and Quinn, L. (2008). The Ecdysone-inducible zinc-finger transcription factor Crol regulates Wg transcription and cell cycle progression in *Drosophila*. *Development* **135**, 2707–2716.
- Moore K.A., Hollien J. (2012) The unfolded protein response in secretory cell function. *Annu Rev Genet.* **46**:165-83.
- Morris C y Jalinot P. (2005) Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. *Oncogene.* **24**(7):1203-1211.
- Nakajima, H., Hirata, A., Ogawa, Y., Yonehara, T., Yoda, K. and Yamasaki, M. (1991). A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **113**, 245–260.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* **278**, 25277–25280.
- Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C. and Warren, G. (1997). The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**, 445–455.
- Nebenfuhr, A. (2002). Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiol.* **130**, 1102–1108.
- Neufeld, T. P., la Cruz, de, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**, 1183–1193.
- Niessen, C. M., Leckband, D. and Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol. Rev.* **91**, 691–731.
- Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., et al. (2000). *Drosophila* p53 Is a Structural and Functional Homolog of the Tumor Suppressor p53. *Cell* **101**, 91–101.
- Orci, L., Ravazzola, M., Meda, P., Holcomb, C., Moore, H. P., Hicke, L. and Schekman, R. (1991). Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8611–8615.
- Papanikou, E. and Glick, B. S. (2009). The yeast Golgi apparatus: Insights and mysteries.

- Pelletier, L., Jokitalo, E. and Warren, G.** (2000). The effect of Golgi depletion on exocytic transport. *Nat. Cell Biol.* **2**, 840–846.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F. A. and Morata, G.** (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591–5598.
- Pierce, S. B., Yost, C., Britton, J. S., Loo, L. W. M., Flynn, E. M., Edgar, B. A. and Eisenman, R. N.** (2004). dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development* **131**, 2317–2327.
- Preisinger, C., Körner, R., Wind, M., Lehmann, W. D., Kopajtich, R. and Barr, F. A.** (2005). Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J.* **24**, 753–765.
- Prescott, A. R., Farmaki, T., Thomson, C., James, J., Paccaud, J. P., Tang, B. L., Hong, W., Quinn, M., Ponnambalam, S. and Lucocq, J.** (2001). Evidence for prebudding arrest of ER export in animal cell mitosis and its role in generating Golgi partitioning intermediates. *Traffic* **2**, 321–335.
- Price, D., Rabinovitch, S., O'Farrell, P. H. and Campbell, S. D.** (2000). *Drosophila* wee1 has an essential role in the nuclear divisions of early embryogenesis. *Genetics* **155**, 159–166.
- Price, D. M., Jin, Z., Rabinovitch, S. and Campbell, S. D.** (2002). Ectopic expression of the *Drosophila* Cdk1 inhibitory kinases, Wee1 and Myt1, interferes with the second mitotic wave and disrupts pattern formation during eye development. *Genetics* **161**, 721–731.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A.** (2000). Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* **100**, 435–446.
- Rabouille, C. and Kondylis, V.** (2007). Golgi ribbon unlinking: an organelle-based G2/M checkpoint. *Cell Cycle* **6**, 2723–2729.
- Radulescu, A. E., Mukherjee, S. and Shields, D.** (2011). The Golgi Protein p115 Associates with γ -Tubulin and Plays a Role in Golgi Structure and Mitosis Progression. *J. Biol. Chem.* **286**, 21915–21926.
- Ripoche, J., Link, B., Yucel, J. K., Tokuyasu, K. and Malhotra, V.** (1994). Location of Golgi membranes with reference to dividing nuclei in syncytial *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1878–1882.
- Rørth, P.** (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech. Dev.* **78**, 113–118..
- Ryoo, H. D., Domingos, P. M., Kang, M.J. and Steller, H.** (2007). Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**, 242–252.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H.** (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491–501.

- Sapperstein, S. K., Lupashin, V. V., Schmitt, H. D. and Waters, M. G.** (1996). Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. *J. Cell. Biol.* **132**, 755–767.
- Schötman, H., Karhinen, L. and Rabouille, C.** (2008). dGRASP-Mediated Noncanonical Integrin Secretion Is Required for Drosophila Epithelial Remodeling. *Dev Cell* **14**, 171–182.
- Schötman, H., Karhinen, L. and Rabouille, C.** (2009). Integrins mediate their unconventional, mechanical-stress-induced secretion via RhoA and PINCH in Drosophila. *J. Cell Sci.* **122**, 2662–2672.
- Schwartz, B. E., Larochele, S., Suter, B. and Lis, J. T.** (2003). Cdk7 is required for full activation of Drosophila heat shock genes and RNA polymerase II phosphorylation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6876–6886.
- Seemann, J., Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J. and Warren, G.** (2002). Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. *Science* **295**, 848–851.
- Selva, E. M., Hong, K., Baeg, G. H., Beverley, S. M., Turco, S. J., Perrimon, N. and Häcker, U.** (2001). Dual role of the fringe connection gene in both heparan sulphate and fringe-dependent signalling events. *Nat. Cell Biol.* **3**, 809–815.
- Sengupta, D. and Linstedt, A. D.** (2010). Mitotic Inhibition of GRASP65 Organelle Tethering Involves Polo-like Kinase 1 (PLK1) Phosphorylation Proximate to an Internal PDZ Ligand. *J. Biol. Chem.* **285**, 39994–40003.
- Shima, D. T., Cabrera-Poch, N., Pepperkok, R. and Warren, G.** (1998). An ordered inheritance strategy for the Golgi apparatus: visualization of mitotic disassembly reveals a role for the mitotic spindle. *J. Cell. Biol.* **141**, 955–966.
- Shima, D. T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R. and Warren, G.** (1997). Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J. Cell. Biol.* **137**, 1211–1228.
- Shorter, J. and Warren, G.** (1999). A role for the vesicle tethering protein, p115, in the post-mitotic stacking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system. *J. Cell. Biol.* **146**, 57–70.
- Shorter, J. and Warren, G.** (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 379–420.
- Shoup, J. R.** (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.* **29**, 223–249.
- Sohda, M., Misumi, Y., Yoshimura, S.-I., Nakamura, N., Fusano, T., Sakisaka, S., Ogata, S., Fujimoto, J., Kiyokawa, N. and Ikehara, Y.** (2005). Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem. Biophys. Res.* **338**, 1268–1274.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341–347.

- Stanley, H., Botas, J. and Malhotra, V. (1997).** The mechanism of Golgi segregation during mitosis is cell type-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14467–14470.
- Stewart, B. A., Mohtashami, M., Zhou, L., Trimble, W. S. and Boulianne, G. L. (2001).** SNARE-Dependent Signaling at the Drosophila Wing Margin. *Developmental Biology* **234**, 13–23.
- Sütterlin, C., Hsu, P., Mallabiabarrena, A. and Malhotra, V. (2002).** Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* **109**, 359–369.
- Sütterlin, C., Lin, C. Y., Feng, Y., Ferris, D. K., Erikson, R. L. and Malhotra, V. (2001).** Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9128–9132.
- Sütterlin, C., Polishchuk, R., Pecot, M. and Malhotra, V. (2005).** The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3211–3222.
- Takahashi, H., Tamura, K., Takagi, J., Koumoto, Y., Hara-Nishimura, I. and Shimada, T. (2010).** MAG4/Atp115 is a golgi-localized tethering factor that mediates efficient anterograde transport in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1777–1787.
- Uchiyama, K., Jokitalo, E., Lindman, M., Jackman, M., Kano, F., Murata, M., Zhang, X. and Kondo, H. (2003).** The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J. Cell. Biol.* **161**, 1067–1079.
- Villeneuve, J., Scarpa, M., Ortega-Bellido, M. and Malhotra, V. (2013).** MEK1 inactivates Myt1 to regulate Golgi membrane fragmentation and mitotic entry in mammalian cells. *EMBO J.* **32**, 72–85.
- Vidwans, S. J. (2003).** Anomalous centriole configurations are detected in Drosophila wing disc cells upon Cdk1 inactivation. *J. Cell Sci.* **116**, 137–143.
- Wang, Y., Satoh, A. and Warren, G. (2005).** Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J. Biol. Chem.* **280**, 4921–4928.
- Wang, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J. and Warren, G. (2003).** A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J.* **22**, 3279–3290.
- Wei, J. H. and Seemann, J. (2009).** The mitotic spindle mediates inheritance of the Golgi ribbon structure. *J. Cell. Biol.* **184**, 391–397.
- Weigmann, K., Cohen, S. M. and Lehner, C. F. (1997).** Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of Drosophila Cdc2 kinase. *Development* **124**, 3555–3563.
- Wells N.J., Watanabe N., Tokusumi T., Jiang W., Verdecia M.A., Hunter T. (1999).** The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression *J. Cell Sci.*, **112** (19) , pp. 3361-3371.

Wolpert, L., Tickle, C. and Jessell, T. (2010). Principles of Development.

Xu, H. (2002). Syntaxin 5 Is Required for Cytokinesis and Spermatid Differentiation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **251**, 294–306.

Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Kuwahara, R., Haraguchi, S., Kusaka, I., Awano, W., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H. and Goto, S. (2005). Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13467–13472.

Yoshimura, S. I. (2005). Convergence of Cell Cycle Regulation and Growth Factor Signals on GRASP65. *J. Biol. Chem.* **280**, 23048–23056.

Zhang, C.-H., Wang, Z.-B., Quan, S., Huang, X., Tong, J.-S., Ma, J.-Y., Guo, L., Wei, Y.-C., Ouyang, Y.-C., Hou, Y., et al. (2011). GM130, a cis-Golgi protein, regulates meiotic spindle assembly and asymmetric division in mouse oocyte. *Cell Cycle* **10**, 1861–1870.

Zhu, W., Leber, B. and Andrews, D. W. (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* **20**, 5999–6007.

ANEXO 1: Interferente no específico contra p115 (UAS-p115GD).

El primer interferente fue evaluado a través de la técnica de flip-out en el ojo de *Drosophila* (*ey>FLP/UAS-p115^{GD}; Act>CD2>Gal4/+*), lo que produce la expresión del dsRNA en todas las células del ojo y en parte de la cápsula cefálica de la mosca. La expresión de este interferente produjo un aumento del tamaño de la cabeza sin alteraciones del patrón (hiperplasia), causado principalmente por un incremento en el tamaño celular (Figura 16A, y datos no mostrados). Este fenotipo es similar a los fenotipos de reguladores negativos de la ruta Insulina/TOR quinasa (*tsc1^{-/-}*, *tsc2^{-/-}*, *PTEN^{-/-}*) (Potter y col., 2001; Gao y col., 2001; Ito y col., 1999; Goberdhan y col., 1999; Huang y col., 1999; Gao y col., 2000), lo cual nos llevó a proponer que p115 estaba involucrado en esta ruta de señalización, específicamente a través de un efecto sobre los compartimientos de endomembranas en los cuales se produce la activación de TOR quinasa.

El análisis de la eficacia del dsRNA, referido a la capacidad del interferente de disminuir los niveles de la proteína blanco, y ensayado mediante RT-PCR semicuantitativo e inmunoblot usando un anticuerpo contra p115 de ratón (cedido por el Dr. Martin Lowe), mostró que efectivamente el RNA interferente p115^{GD} disminuía los niveles de transcrito y de proteína (Figura 27D y E).

En el análisis genético se considera que la condición generada por un RNA interferente es análoga a la correspondiente a un alelo de tipo hipomorfo (pérdida parcial de la función génica). En términos genéticos, el fenotipo producido por un alelo hipomorfo es más severo cuando se combina en *trans* con una deficiencia que incluye la región correspondiente (alelo nulo), que cuando el alelo se encuentra en homocigosis (*m/Df > m/m*) (Muller, 1932; Wilkie, 1994). Por lo tanto, se espera que la expresión del RNAi en combinación con la deficiencia respectiva tuviese un fenotipo más fuerte que el obtenido por aumento en el número de copias del interferente. Al realizar este análisis, se encontró que el fenotipo de crecimiento del tejido se incrementaban al aumentar la dosis del interferente al doble, pero no al expresar el interferente en un fondo genético que incluye una deficiencia de la región genómica donde se encuentra p115 (Figura 27A). Esto indica que el fenotipo de crecimiento producido por el interferente no es específico y en consecuencia no es debido a la

disminución de los niveles de p115 o alternativamente, esta deficiencia definida solamente por marcadores genéticos no incluye al locus de p115.

Para poder corroborar si el fenotipo de crecimiento observado corresponde realmente a la pérdida de función de p115 (especificidad), se generó una construcción y transgénico que permiten realizar sobreexpresión de p115. La región codificante de *p115* fue clonada desde DNA genómico y etiquetada con un epitopo reconocible por el anticuerpo anti-Hemaglutinina (HA) en la región N-terminal mediante el sistema de recombinación Gateway, produciendo el vector pUAS-HA::p115. Esta construcción fue inyectada junto a un plásmido que codifica para la transposasa $\Delta 2-3$ (necesaria para la inserción del elemento P en el genoma) en embriones *yw* (mutantes para *white*) para la generación de transgénicos. Los insectos resultantes fueron cruzados individualmente con animales *yw* y en su descendencia se identificaron 2 transgénicos *w+* (rescate del color rojo de ojo) con inserciones únicas en el cromosoma 2 y en el 3. Para confirmar que la proteína de fusión HA se expresaba correctamente, además de la secuenciación del constructo inyectado, se realizó un inmunoblot contra el epitopo obteniéndose un tamaño aproximado de 100 kDa, similar a lo predicho para una fusión HA de p115 (Figura 10B).

La especificidad del fenotipo fue evaluado mediante la co-expresión del interferente contra p115, p115^{GD}, y la fusión HA::p115 usando el *driver* del compartimiento posterior del ala, *hedgehog-Gal4* (*hh>gal4*), que corresponde a la zona indicada en verde en la Figura 16B. La expresión de HA::p115 no fue capaz de rescatar el fenotipo de crecimiento producido por este dsRNA (Figura 27B y C), confirmando que si bien p115^{GD} es eficaz en disminuir los niveles de p115, no sería específico contra éste y tendría otros blancos responsables del fenotipo de crecimiento observado.

Se realizó un análisis *in silico* de los potenciales blancos no específicos para la secuencia contenida en el transcrito horquilla de p115^{GD} (un blanco no específico es cualquier gen blanco de cualquiera de los 19-mers posibles en el constructo dsRNA) mostrados en la Tabla 16.

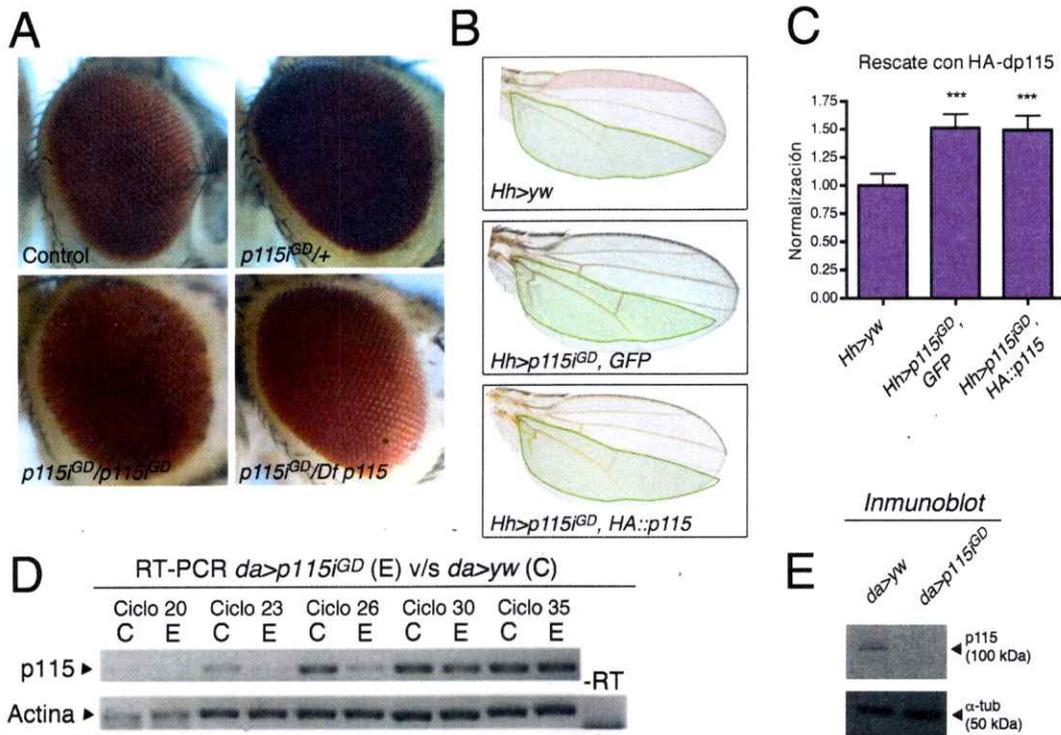


Figura 27. Determinación de la eficacia y especificidad del fenotipo del primer RNA doble hebra analizado ($p115^{iGD}$).

(A) Expresión del interferente $UAS-p115^{iGD}$ en los progenitores de la cabeza produce un incremento en el tamaño de los tejidos correspondientes (Control: $Ey-flp/+; +/+; Act>CD2>Gal4/+; p115^{iGD}/+; Ey-flp/+; UAS-p115^{iGD}/+; Act>CD2>Gal4/+$). Este efecto se incrementa con la expresión de dos copias del interferente ($p115^{iGD}/p115^{iGD}; Ey-flp/+; UAS-p115^{iGD}/UAS-p115^{iGD}; Act>CD2>Gal4/+$), pero no al expresarlo en combinación con la deficiencia de la región genómica que incluye a $p115$ (definida genéticamente) ($p115^{iGD}/Df\ p115; Ey-flp/Df(1)ct1b1; UAS-p115^{iGD}/+; Act>CD2>Gal4/+$). Esto sugiere que la deficiencia de la región genómica no incluye a $p115$ (comportándose el tejido como si estuviera presente solo la copia del interferente) o el fenotipo no es específico de una disminución en los niveles del mRNA de $p115$. (B) Expresión del interferente en el compartimiento posterior del ala (indicado en verde) también produce un aumento en el tamaño del tejido ($Hh>yw; y\ w/+; +/+; hh>gal4, UAS-GFP/+ - Hh>p115^{iGD}, GFP; UAS-p115^{iGD}/+; hh>gal4, UAS-GFP/+$), el cual no es rescatado por la ganancia de función de $p115$ ($HA::p115$) ($Hh>p115^{iGD}, HA::p115; hh>gal4, UAS-GFP/UAS-HA::p115$) (C) Gráfico del tamaño normalizado del área del compartimiento posterior (verde)/sector A (rojo) ($n=20$). La significancia estadística fue determinada mediante análisis de ANOVA de una vía (***) $p<0.001$). (D) RT-PCR semicuantitativo a partir de larvas experimentales (E, $da>p115^{iGD}; UAS-p115^{iGD}/+; da>gal4/+$) y controles (C, $da>yw; y\ w/+; +/+; da>gal4/+$) (E) Inmunoblot, usando los mismos genotipos que en el RT-PCR, muestra que efectivamente el RNA de doble hebra, $p115^{iGD}$, disminuye los niveles de acumulación de la proteína.

Los resultados presentados en (B), (C), (D) y (E) nos permiten concluir que el interferente $UAS-p115^{iGD}$ es capaz de disminuir los niveles de $p115$, pero que esta disminución no es la responsable del fenotipo observado.

Tabla 16. Blancos no específicos encontrados en la secuencia de p115i^{GD} (BLAST contra la secuencia encontrada en VRDC contra el genoma de *Drosophila* en Flybase)

Gen	Número de positivos (nucleótidos)
Pvr	19 (2)
CG31797	18 (1)
CG1826	18 (1)
knirps (kni)	18 (1)
CG10936	18 (1)

El blanco no específico más evidente es *Pvr*, un receptor tirosina quinasa relacionado con los receptores de PGDF y de VEGF de mamíferos. Ha sido descrito como necesario para la migración de las células del borde en la ovogénesis de *Drosophila*, siendo este proceso esencial para la fertilidad de las hembras (Duchek y col., 2001) y además como regulador positivo del crecimiento celular dependiente de PI3K y de la activación de TOR kinasa. Así, la falta de *Pvr* en células S2 (línea celular derivada de hemocitos embrionarios) hace que estas sean más pequeñas (Sims y col., 2009), contrario a lo que se observa al expresar p115i^{GD}, donde las células adquieren un mayor tamaño.

A pesar de lo anterior, se pidieron interferentes de *Pvr* al VRDC, para directamente evaluar si se producía el fenotipo de crecimiento. Esto no fue así (datos no mostrados). *knirps* está relacionado con la formación de la vena L2 y no tiene descrito efecto alguno sobre el crecimiento celular (Lunde y col., 2003). De los otros blancos, se posee muy poca información y no es posible asignarle a ninguno de ellos un papel sobre crecimiento celular.

Encontrar la identidad del gen afectado con el interferente inespecífico, a través de búsquedas de incrementadores y supresores del fenotipo, es muy prolongado y costoso, y aún siendo posible, existe la posibilidad real de identificar un elemento que ya haya sido involucrado en la ruta Insulina/TOR quinasa y/o crecimiento celular. Por lo anterior se descartó continuar con el estudio de la función de p115 utilizando este primer interferente, p115i^{GD}.

Respecto a la primera construcción interferente contra p115 utilizada, que es inespecífica y para la cual no fuimos capaces de definir sus blancos, solo queda discutir la forma de encontrar sus posibles blancos y añadir algunas palabras de cuidado al utilizar interferentes para establecer un fenotipo y relacionar éste con una falta de función de un gen.

Dentro de los cuidados que hay que tener es establecer: (1) verificar los blancos no específicos, (2) demostrar que los niveles del blanco se están reduciendo, (3) demostrar que los fenotipos están siendo causados por la reducción específica del blanco deseado, a través del uso de un segundo interferente que produzca fenotipos similares, rescate de los fenotipos por una ganancia de función o incrementos de los fenotipos en condiciones deficientes para el gen en cuestión, ya sea mediante la utilización de alelos mutantes o mediante expresión de dominantes negativos.

Para identificar los posibles blancos del RNA interferente no predichos por el análisis *in silico* se puede realizar una búsqueda de incrementadores y supresores del fenotipo. En esta estrategia se requiere de una condición en la cual el fenotipo sea visible pero no muy fuerte (considerar la letalidad), para nuestro caso podría ser Hh>p115^{GD} y analizar la interacción de ésta con el *kit* de deficiencias genéticas disponible en el BDSC (*Bloomington Drosophila Stock Center*), el cual consta de 465 deficiencias que abarcan el genoma casi completo de *Drosophila* (Cook y col., 2012). Cabe destacar, que ninguna de estas deficiencias abarca el locus cubierto por p115 (Flybase). Si la combinación de la expresión del interferente con alguna de las deficiencias mencionadas exacerba el fenotipo, entonces el gen blanco no deseado se encuentra en la región comprendida por la deficiencia. Luego se puede trabajar con deficiencias más pequeñas obtenidas desde BDSC o Exelixis, para reducir la región genómica sobre la cual trabajar, en lo posible llegando hasta el gen específico. Una vez identificado el gen se pueden analizar las consecuencias de la ausencia de éste sobre las rutas que han sido relacionadas con el crecimiento celular, como son dMyc y/o Insulina/TOR quinasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Cook, R. K., Christensen, S. J., Deal, J. A., Coburn, R. A., Deal, M. E., Gresens, J. M., Kaufman, T. C. and Cook, K. R. (2012). The generation of chromosomal deletions to provide extensive coverage and subdivision of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol* **13**, R21.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S. and Rørth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* **107**, 17–26.
- Gao, X. and Pan, D. (2001). TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes & Development* **15**, 1383–1392.
- Gao, X., Neufeld, T. P. and Pan, D. (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Developmental Biology* **221**, 404–418.
- Goberdhan, D. C. I., Paricio, N., Goodman, E. C., Mlodzik, M. and Wilson, C. (1999). *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes & Development* **13**, 3244–3258.
- Huang, H., Potter, C. J., Tao, W., Li, D. M., Brogiolo, W., Hafen, E., Sun, H. and Xu, T. (1999). PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development* **126**, 5365–5372.
- Ito, N. and Rubin, G. M. (1999). *gigas*, a *Drosophila* homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell* **96**, 529–539.
- Lunde, K., Trimble, J. L., Guichard, A., Guss, K. A., Nauber, U. and Bier, E. (2003). Activation of the *knirps* locus links patterning to morphogenesis of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **130**, 235–248.
- Muller, H. J. (1932). Further studies on the nature and causes of gene mutations. *Proceedings of the 6th International Congress of Genetics* **1**, 213–255.
- Potter, C. J., Huang, H. and Xu, T. (2001). *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* **105**, 357–368.
- Sims, D., Duchek, P. and Baum, B. (2009). PDGF/VEGF signaling controls cell size in *Drosophila*. *Genome Biol* **10**, R20.
- Wilkie, A. (1994). The Molecular-Basis of Genetic Dominance. *J Med Genet* **31**, 89–98.

ANEXO 2: Análisis de los efectos sobre otras fases del ciclo celular.

1. Activación/Inhibición de la progresión G1/S.

A nivel celular, la proteína del retinoblastoma (pRb) se ha mostrado que es capaz de regular la progresión a través de la fase G1 de ciclo celular, predominantemente por unión a los factores de transcripción E2F, los cuales controlan una gran cantidad de genes involucrados en la proliferación celular y la replicación del DNA (Dyson, 1998). pRb reprime la expresión de los genes blancos de E2F reclutando la actividad de histonas deacetilasas (HDAC) e inhibiendo el dominio de activación transcripcional (Harbour y col., 1999). La habilidad de pRb de bloquear la progresión a través de G1 es abolida por la hiperfosforilación de éste, la cual es iniciada por las quinasas dependientes de ciclinas tipo D. En *Drosophila* existe una sola de estas: Cdk4, la cual es requerida para el crecimiento normal de los tejidos, pero es dispensable para la progresión del ciclo celular (complejos CycD/Cdk4) durante la mitad de G1 (Meyer y col., 2000). Para la progresión a la fase S, la actividad de los complejos CycE/Cdk2 es máxima durante G1 tardío y S temprano. Este complejo es capaz de fosforilar también a pRb, liberando a E2F, el cual forma heterodímeros con Dp, promoviendo la expresión de genes requeridos para la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular como el antígeno nuclear de la célula en proliferación (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), CycE, Cdk1 y DNA polimerasas. dMyc es otro gen que directamente es capaz de aumentar los niveles de Cdk4/CycD e indirectamente los niveles de CycE, por consiguiente acelera la transición G1/S, además de promover el crecimiento celular a través de la regulación de la biogénesis de los ribosomas.

Se manipuló la transición de G1/S, a través de la sobreexpresión de Cdk4::myc, sobreexpresión de PCNA::GFP, sobreexpresión de Myc (activación), y un alelo de E2F (inhibición) (Figura 28), por si solos o junto a la depleción de p115.

De estos el único que posee un fenotipo evidente es la sobreexpresión de dMyc junto a la depleción de p115, siendo capaz de rescatar casi totalmente el fenotipo de la depleción de ésta respecto al tamaño del tejido, a pesar de que se pierde el patrón de las venas cruzadas anterior y posterior) (Figura 28D).

Las células imaginales del ala llevan a cabo ciclos celulares canónicos (G1/S/G2/M) en donde los reguladores de G1/S y G2/M son ciclina E y la fosfatasa Cdc25, *String*, respectivamente (Neufeld y col., 1998). La sobreexpresión de dMyc en estas células incrementa los niveles de Ciclina E por regulación post-transcripcional (Prober y col., 2000; Duman-Scheel y col., 2004) y acelera la transición G1/S (Johnston y col., 1999; Prober y col., 2000). dMyc también es capaz de regular la actividad del eje E2F/Rb.

Cuando se expresa en clones del ala en desarrollo, dMyc causa un incremento en el tamaño celular. Este incremento ocurre debido a que dMyc acelera la tasa de crecimiento celular (la tasa en la cual la célula acumula masa), pero no es suficiente para aumentar la tasa de división (Johnston y col., 1999). Sin embargo, la inhabilidad de la sobreexpresión de dMyc de acelerar el ciclo celular es explicado al menos en parte por restricciones impuestas por desarrollo *in vivo*. En la mayoría de las células mitóticas de *Drosophila* (si no todas) el homólogo de Cdc25, *String* (Stg), no está regulado por dMyc (Johnston y col., 1999; Lehman y col., 1999). Entonces a pesar de que la expresión ectópica de dMyc lleva a las células a través de G1 a S rápidamente, niveles suficientes de Stg para el paso por G2, requiere de las señales apropiadas dependientes del contexto de desarrollo. La co-expresión de dMyc con Stg resulta en un aumento de la división celular, correspondiéndose a la tasa de crecimiento celular incrementada por dMyc, y en consecuencia obteniendo más células de tamaño normal (Johnston y col., 1999).

En nuestro caso, en el cual dMyc es capaz de rescatar el tamaño del ala adulta, lo podemos ver como una consecuencia de un incremento del tamaño de cada una de las células formadas, más que por la capacidad de la sobreexpresión de dMyc de sacar a las células de su arresto en G2/M inducido por la falta de p115.

El incremento de tamaño en las células formadas ocurre debido a que la sobreexpresión de dMyc es capaz de incrementar el número de ribosomas. El aumento de la actividad ribosomal se traduce en un incremento de la actividad traduccional, teniendo esto como consecuencia un incremento en el tamaño celular (Grewal y col., 2005). Este crecimiento celular, a diferencia al que observamos a través de citometría de flujo para la inhibición de la muerte celular en condiciones de depleción de p115, es

observable en el ala adulta. Por lo tanto, para confirmar que el rescate es causado por un aumento del tamaño celular causado por la sobreexpresión de *dMyc* habría que hacer una determinación de la densidad celular en el tejido disminuyendo ésta si los efectos de *dMyc* sobre el tejido es hacer las células más grandes.

2. Inhibidores de la progresión G2/M.

En los inhibidores analizamos alelos de *string* y *polo* en transheterocigosis, así como la sobreexpresión de Myt1 e interferentes contra Cdk1 y *tribbles* (regulador de la proteólisis de *string* (Mata y col., 2000)) (Figura 29)

3. Interacción genética con p53.

Debido a que las líneas celulares usadas en mamíferos que manifestaban los fenotipos multipolares al reducir los niveles de alguna de las golginas: Grasp65, GM130 y p115 eran deficientes para p53 (HeLa), se analizó si los fenotipos eran dependientes de los niveles de p53, realizándose experimentos con el dominante negativo R155H (el cual es incapaz de dimerizar y unirse al DNA) (Ollmann y col., 2000) e RNAs doble hebra para p53. Observamos que la reducción de los niveles o actividad de p53 no posee consecuencias sobre los fenotipos en el ala adulta de la depleción de p115 (Figura 30).

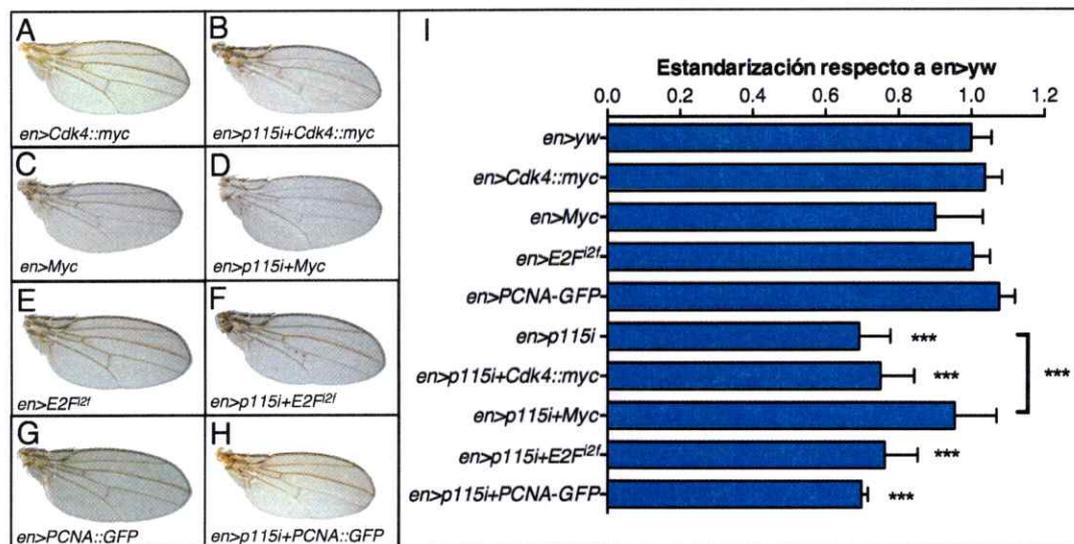


Figura 28. Efectos de modificadores de la transición G1/S del ciclo celular sobre la depleción de p115 sobre el tamaño del compartimiento posterior en alas adultas.

(A-H) Alas de moscas hembras que expresan en el compartimiento posterior lo indicado en cada una de las figuras (ver genotipos). (I) Cuantificación del área del compartimiento posterior de cada una de los genotipos mostrados. Se presenta el promedio \pm desviación estándar (n=20). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía, donde *** indica un valor- $p < 0,001$, y ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$. (Genotipos: (A) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-Cdk4::myc* (B) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-Cdk4::myc* (C) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-Myc* (D) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-Myc* (E) y *w/+*; *en-Gal4/+; E2F^{2f}/+* (F) *w/+*; *en-Gal4, UAS-p115i/+; E2F^{2f}/+* (G) y *w/w*; *en-Gal4/UAS-PCNA::GFP* (H) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-PCNA::GFP*)

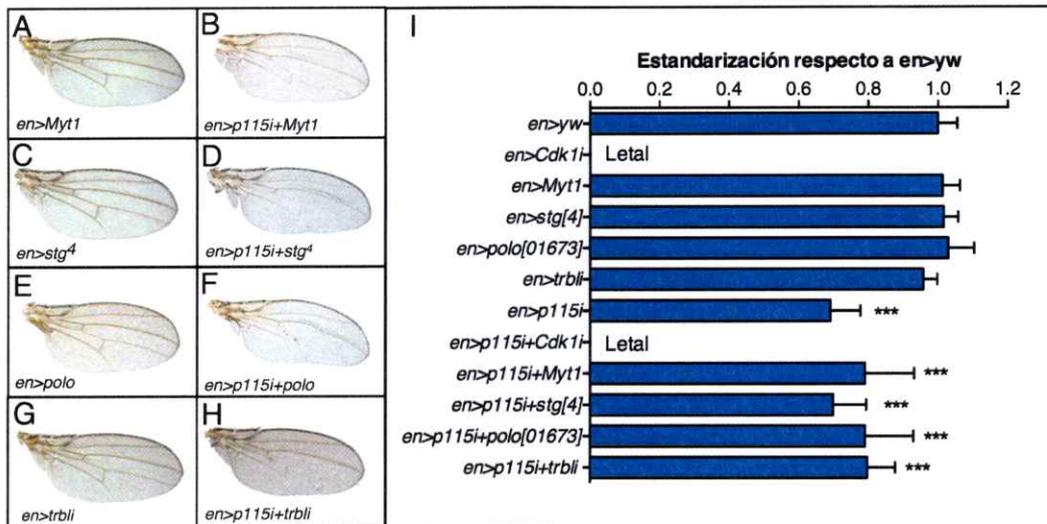


Figura 29. Efectos de inhibidores de la activación de Cdk1 (transición G2/M) y sus efectos sobre alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior.

(A-H) Alas de moscas hembras que expresan en el compartimiento posterior lo indicado en cada una de las figuras (ver genotipos). (I) Cuantificación del área del compartimiento posterior de cada una de los genotipos mostrados. Se presenta el promedio \pm desviación estándar (n=20). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, donde *** indica un valor- $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$. Podemos ver que ninguna de las combinatorias es capaz de rescatar el fenotipo de depleción de p115. (Genotipos: (A) *w UAS-Myt1/y w; en-Gal4/+* (B) *w UAS-Myt1/w; en-Gal4, UAS-p115i/+* (C) *y w/+; en-Gal4/+; stg⁴/+* (D) *w; en-Gal4, UAS-p115i/+; stg⁴/+* (E) *y w/+; en-Gal4/+; polo⁰¹⁶⁷³/+* (F) *w/+; en-Gal4, UAS-p115i/+; polo⁰¹⁶⁷³/+* (G) *y w/y sc v; en-Gal4/UAS-trbli* (TRiP) (H) *w/ y sc v; en-Gal4, UAS-p115i/UAS-trbli* (TRiP)).

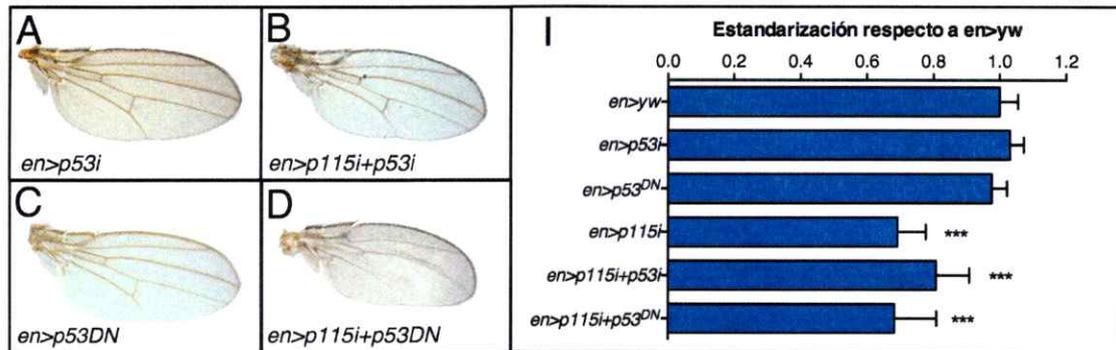


Figura 30. Efectos de la interacción genética con p53 y sus efectos sobre alas adultas depletadas de p115 en el compartimiento posterior.

(A-D) Alas de moscas hembras que expresan en el compartimiento posterior lo indicado en cada una de las figuras (ver genotipos). (I) Cuantificación del área del compartimiento posterior de cada una de los genotipos mostrados. Se presenta el promedio \pm desviación estándar ($n=20$). Como test estadístico para determinar si existen diferencias entre los genotipos, se aplicó una ANOVA de una vía, donde *** indica un valor- $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$. Observamos que no se modifican los fenotipos al realizar las interacciones genéticas con p53. El dominante negativo corresponde a una versión de p53 que no se une al DNA. (Genotipos: (A) *w/y sc v*; *en-Gal4/UAS-p53i* (TRiP) (B) *w/y sc v*; *en-Gal4, UAS-p115i/UAS-p53i* (C) *w/w*; *en-Gal4/+*; *UAS-p53DN* (D) *w*; *en-Gal4, UAS-p115i/+*; *UAS-p53DN/+*).

BIBLIOGRAFÍA

- Duman-Scheel, M., Johnston, L. A. and Du, W. (2004). Repression of dMyc expression by Wingless promotes Rbf-induced G1 arrest in the presumptive Drosophila wing margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 3857–3862.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Development* **12**, 2245–2262.
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N. and Edgar, B. A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. *Nat. Cell Biol.* **7**, 295–302.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859–869.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. and Gallant, P. (1999). Drosophila myc regulates cellular growth during development. *Cell* **98**, 779–790.
- Lehman, D. A., Patterson, B., Johnston, L. A., Balzer, T., Britton, J. S., Saint, R. and Edgar, B. A. (1999). Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, string/Cdc25. *Development* **126**, 1793–1803.
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A. and Rørth, P. (2000). Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in Drosophila by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* **101**, 511–522.
- Meyer, C. A., Jacobs, H. W., Datar, S. A., Du, W., Edgar, B. A. and Lehner, C. F. (2000). Drosophila Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *The EMBO Journal* **19**, 4533–4542.
- Neufeld, T. P., la Cruz, de, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* **93**, 1183–1193.
- Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., et al. (2000). Drosophila p53 Is a Structural and Functional Homolog of the Tumor Suppressor p53. *Cell* **101**, 91–101.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A. (2000). Ras1 promotes cellular growth in the Drosophila wing. *Cell* **100**, 435–446.

ANEXO 3: Otros genes nuevos identificados en relación al control del tamaño de los organismos: PRPK y Bax Inhibitor-1.

Una antigua pregunta en Biología es: cómo se define el tamaño final de los organismos. Todos los organismos de reproducción sexual se originan a partir de un huevo fertilizado: una célula, que después de un número variable de divisiones, y un complejo proceso de diferenciación, se organiza para establecer el tamaño y forma característica de la especie en cuestión.

¿Qué controla el progreso del crecimiento del organismo, y cuando el crecimiento "apropiado" es alcanzado, qué le dice a los órganos y al organismo que detenga su crecimiento?. La respuesta a estas preguntas no es del todo conocida, pero involucra procesos que se acoplan para definir: el tamaño celular, a través del balance metabólico (catabolismo y anabolismo) y el número de células, mediante la proliferación/muerte celular. Esto junto a los procesos morfológicos que ocurren en simultáneo, permiten que finalmente reconozcamos al organismo. Este acoplamiento es llevado a cabo mediante la señalización entre las células y el medio externo, y la regulación de genes específicos implicados en estos procesos durante el desarrollo.

Nuestro interés es identificar nuevos genes que participen en los procesos mencionados y establecer cómo estos genes son regulados para dar forma al organismo. Para abordar estas preguntas hemos usado a *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) como modelo de estudio, la cual ha sido utilizada extensivamente para identificar y analizar las bases genéticas del desarrollo.

Durante esta tesis analizamos dos genes capaces de regular estos procesos: Prpk (*p53-related protein kinase*, proteína quinasa relacionada con p53) y su relación con la ruta Ins/TOR quinasa (Ibar y col., 2013), y el homólogo en *Drosophila* de Bax Inhibitor-1 (BI-1) de mamíferos y su efectos sobre la autofagia (Castillo y col., 2011). A continuación se presenta un resumen de los hallazgos obtenidos sobre estas proteínas.

5.4. Prpk (proteína quinasa relacionada con p53).

La proteína quinasa relacionada con p53 (Bud32 en levadura/PRPK en humanos) ha sido identificada como una proteína involucrada en la proliferación a

través de sus efectos en transcripción en levaduras y la estabilización de p53 en cultivos celulares de humano. Sin embargo, la función fisiológica de Bud32/PRPK en organismos multicelulares no es conocida. Analizamos el rol de PRPK en el desarrollo de *Drosophila*. Esta proteína se expresa en todos los tejidos estudiados y es necesaria para la proliferación y el crecimiento celular. Los animales depletados de Prpk tienen fenotipos similares a los encontrados en mutantes para reguladores positivos de la ruta Ins/TOR. Esta ruta se ha demostrado como una de las fundamentales para el crecimiento celular, transduciendo el estado hormonal y nutricional a la maquinaria traduccional. A través de interacciones genéticas establecimos que Prpk opera como un transductor de la ruta PI3K/TOR, siendo esencial para la activación de la quinasa TOR y la regulación de sus blancos (S6K, 4EBP, autofagia y endocitosis). Esto sugiere que Prpk es crucial en la estimulación la maquinaria biosintética en respuesta a la señalización por insulina y los cambios en la disponibilidad de nutrientes.

5.5. Bax Inhibitor-1

La autofagia y la apoptosis son procesos regulados que juegan un papel central en la homeostasis del tejido. Bax inhibitor-1 (BI-1) es una proteína altamente conservada con un rol dual en la apoptosis, a través de la supresión de la muerte celular intrínseca mediada por salida de calcio desde el retículo, y la señalización del estrés de retículo, mediante la regulación del sensor de estrés IRE1 α (*inositol requiring kinase 1 α*) por interacción física. Colaboramos en la descripción de una nueva función de BI-1 como modulador negativo de la autofagia. Células depletadas de BI-1 presentan una inducción exacerbada de la autofagia, incrementándose el flujo de LC3 (conversión LC3-I a LC3-II a través de lipidación) y la formación de autofagosomas. Los efectos protectores de la autofagia inducida bajo estas condiciones fueron asociados a los incrementos en la supervivencia observada en animales expuestos a restricción de nutrientes. La represión de la autofagia mediada por BI-1 es dependiente en la activación de la cascada de señalización JNK (*cJUN-N terminal kinase*) y de la expresión de IRE1 α , posiblemente debido a un desplazamiento de TRAF2 (*TNF-receptor associated factor-2*) desde IRE1 α .

La depleción de BI-1 en *Drosophila* incrementa los flujos autofágicos y esto se ve reflejado en procesos que requieren de la autofagia, como es la degradación de las glándulas salivales durante la pupación. Este incremento también produce el aumento de la sobrevivencia de *Drosophila* en condiciones de falta de nutrientes.

Se observó además, un incremento en la expresión de marcadores de autofagia en el hígado y riñón de ratones deficientes para bi-1.

En resumen, fue posible identificar una nueva función de BI-1 en organismos multicelulares, sugiriendo un papel crítico de BI-1 como un integrador de estrés que modula los niveles de autofagia y lo relaciona con otros procesos homeostáticos como el estrés de retículo.

BIBLIOGRAFÍA

Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B. I. N., Nassif, M., Court, F. A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., y col. (2011). BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 α ; branch of the unfolded protein response. *EMBO J.* **30**, 4465–4478.

Ibar, C., Cataldo, V. F., Vásquez-Doorman, C., Olgún, P. and Glavic, A. (2013). *Drosophila* p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. *Development* **140**, 1282–1291.