

UCH-FC
Doc- BMC N
R 741
c.1



Una modificación post-transcripcional de RNAs de transferencia determina el potencial de crecimiento en *Drosophila melanogaster*

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

Diego Alejandro Rojas Benítez

Abril, 2015

Director de Tesis Dr. Álvaro Glavic Maurer

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

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

DIEGO ALEJANDRO ROJAS BENÍTEZ

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 6 de enero de 2015

Director de Tesis:

Dr. Álvaro Glavic Maurer



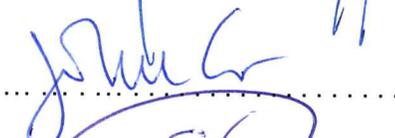


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Christian González-Billault (Presidente)



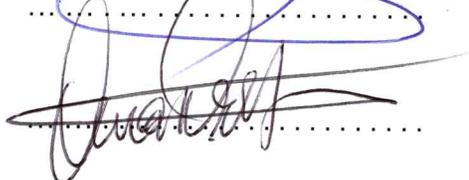
Dr. John Ewer



Dr. Sergio Lavandero



Dr. Omar Orellana



a mi Helga, la más enorme y peluda

3

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, Iris y Miguel por su esfuerzo, ejemplo y apoyo incondicional. Si he llegado hasta acá es en gran parte gracias a ellos. También a mis hermanas Francisca y Camila por su cariño y apoyo a toda prueba. A mis tíos, primos y abuelos. A Gabriela por su amor, apoyo y paciencia durante este proceso. A mi Helga querida que me dio su amor peludo, baboso y desinteresado. Asimismo tengo que agradecer a mis amigos Vicente, Consuelo Ibar, Mario, Paulina, Sandra, Jorge, Consuelo Anguita, Cristian, Emiliano, Arturo y Salomé. A la Gástrula Mecánica F.C. A Sebastián, Daniel y Pablo. A mi gran amigo Julio. También debo agradecer a Floro, amo y señor de Milenio. Doy gracias en general a los laboratorios del Dr. Allende y la Dra. Palma, en especial a Lord Lois y Juan Silva. A Juan Carlos. A la Dra. de Crécy-Lagard que me recibió en su laboratorio con montón de energía, buenas ideas e increíble disposición. También a la gente que me ayudó en la UF: Patrick, Rémi, Basma, Jenny, Almudena, Francisco, Fernando y Paula. Agradezco a la comisión por su tiempo y su excelente disposición a discutir los resultados, en especial a John por su sabio consejo experimental. Agradezco a Álvaro que durante este proceso fue un excelente tutor/jefe/compañero de laboratorio, actuó con rectitud y siempre criticando de forma constructiva mi trabajo; estoy seguro que esto jugó una parte fundamental en mi formación como científico. Mis más sinceros agradecimientos y respeto para él. A la gente que proporcionó los fondos para realizar este proyecto y compartir los resultados: FONDECYT, FONDAP, Company of Biologists, EMBO y la IUBMB.

ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	iii
BIOGRAFÍA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. RNAs de transferencia (tRNAs)	5
1.1. Estructura general	5
1.2. Los tRNAs son elementos decodificadores en la traducción	7
2. Aspectos generales de la biogénesis de tRNAs en eucariotes	7
3. Más allá de la visión clásica, los tRNAs no son meros adaptadores estáticos y pasivos	10
3.1. Regulación de tRNAs frente a cambios en la fisiología celular.....	10
3.2. Los tRNAs como elementos reguladores	12
4. El problema del crecimiento	13

4.1.	La distinción entre crecimiento celular y proliferación	13
4.2.	Crecimiento celular y la búsqueda de sus reguladores	14
5.	TOR, el regulador del crecimiento celular en eucariotes	15
5.1.	¿Cómo TOR controla el crecimiento?	18
5.2.	¿Cómo se regula la actividad de TOR?	21
5.3.	Nuevos elementos no convencionales que regulan a TOR.....	23
6.	Disponibilidad citoplasmática de tRNAs y actividad de TOR	23
6.1.	Una modificación de tRNAs universalmente conservada es necesaria para el crecimiento	24
	HIPÓTESIS.....	27
	OBJETIVO GENERAL	27
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
	MATERIALES Y MÉTODOS	28
	Nomenclatura.....	28
	Materiales Biológicos	28
	Reactivos, soluciones y otros materiales.....	33
	Reactivos.....	33
	Soluciones	35
	Métodos de biología molecular	36
	Generación de bacterias quimiocompetentes.....	36
	Transformación bacteriana.	37
	Medios y condiciones de cultivo bacteriano.....	37
	PCR de colonias.....	38

Extracción de DNA plasmidial.....	38
Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.....	39
Digestión con enzimas de restricción.	39
Clonamiento convencional por ligación utilizando ligasa T4.....	40
Clonamiento direccional mediante tecnología Invitrogen Gateway.....	40
Secuenciación de construcciones.....	41
Protocolos experimentales para <i>Drosophila</i>.....	41
Condiciones de cultivo.....	41
Generación de animales mosaico en la configuración FLP-out.....	42
Inducción de clones mitóticos.....	42
Extracción de RNA total de larvas.....	42
Síntesis de cDNA y PCR semi-cuantitativa.....	43
Procesamiento no-convencional del mRNA de Xbp-1.....	43
Extracción de RNAs pequeños a partir de larvas.....	44
Ensayos de hibridación positiva en ausencia de t ⁶ A (HPA t ⁶ A).....	45
Extracción de proteína total de larvas.....	46
Análisis de extractos proteicos mediante Western blot.....	46
Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	48
Centrifugación en gradiente de polisomas.....	50
Citometría de flujo.....	51
Análisis del tamaño celular en alas adultas.....	52
Estimación del volumen larvario.....	53
Obtención y análisis de moscas transgénicas.....	53

Microinyección de embriones	54
RESULTADOS	55
1. Establecer que <i>pütrü</i>, el ortólogo de <i>KAE1</i>, es necesario para la síntesis de t⁶A en <i>Drosophila</i>	55
1.1. Identificación del ortólogo de <i>KAE1</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>	55
1.2. Complementación inter-especie	58
1.3. La expresión de CG4933 en levaduras mutantes para <i>KAE1</i> no es capaz de reestablecer la síntesis de t ⁶ A.....	60
1.4. Detección indirecta de t ⁶ A	62
1.5. CG4933 es requerido para la síntesis de t ⁶ A en <i>Drosophila</i>	65
1.6. Prpk, el ortólogo de BUD32 en <i>Drosophila</i> , es necesario para la síntesis de t ⁶ A.....	67
2. Establecer que cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el tamaño celular y animal en <i>Drosophila melanogaster</i>..	69
2.1. Caracterización de animales mutantes para <i>pütrü</i>	69
2.2. Los tRNAs modificados con t ⁶ A son necesarios para el crecimiento autónomo-celular	72
2.3. Los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el potencial de crecimiento en eucariotes.....	76
3. Determinar la relación epistática entre <i>pütrü</i>, componentes de la vía insulina/TOR y de homeostasis proteica	85
3.1. La actividad de TOR es sensible a cambios en los niveles de tRNAs modificados con t ⁶ A	85

3.2. Relaciones epistáticas de tRNAs modificados con t ⁶ A y elementos relacionados con el crecimiento y la homeostasis proteica	88
DISCUSIÓN.....	93
1. Los tRNAs modificados con t⁶A son elementos necesarios y limitantes para el crecimiento celular	94
2. tRNAs modificados con t⁶A y actividad de TOR quinasa.....	100
2.1. ¿Son los cambios en la actividad de TOR la razón subyacente de los fenotipos observados?.....	101
3. La maquinaria de síntesis de t⁶A es universalmente conservada ..	106
4. Ensayos de HPA t⁶A y su contribución metodológica en la detección de tRNAs modificados con t⁶A	108
5. Los tRNAs como reguladores de procesos biológicos, posibles roles de modificaciones post-transcripcionales	110
6. Investigación a futuro relacionada con t⁶A.....	111
CONCLUSIONES	114
ANEXOS.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	139

LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1:** Cepas UAS
- **Tabla 2:** Cepas Gal4
- **Tabla 3:** Cepas mutantes
- **Tabla 4:** Cepas generadas por recombinación meiótica
- **Tabla 5:** Cepas obtenidas por segregación conjunta de cromosomas
- **Tabla 6:** Otras cepas
- **Tabla 7:** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*
- **Tabla 8:** Reactivos
- **Tabla 9:** Soluciones para biología molecular
- **Tabla 10:** Soluciones para otros métodos
- **Tabla 11:** Otros materiales y utensilios
- **Tabla 12:** Sondas utilizadas en ensayos HPA^t6A
- **Tabla 13:** Anticuerpos primarios y secundarios usados en Western blot
- **Tabla 14:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencia
- **Tabla 15:** Otras tinciones

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1:** Representación de la estructura general de los tRNAs
- **Figura 2:** TOR quinasa se encuentra en dos complejos multiproteicos
- **Figura 3:** La vía de señalización insulina/TOR
- **Figura 4:** Localización y estructura química de t⁶A
- **Figura 5:** Representación esquemática del *locus* CG4933
- **Figura 6:** Conservación funcional entre CG4933 y KAE1
- **Figura 7:** Detección por HPLC de t⁶A en levaduras mutantes complementadas con ortólogos provenientes de *Drosophila*
- **Figura 8:** Hibridación positiva en ausencia de t⁶A (HPA t⁶A)
- **Figura 9:** Mutantes para CG4933 presentan una disminución en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A
- **Figura 10:** Prpk es necesaria para la síntesis de t⁶A
- **Figura 11:** Los tRNAs modificados con t⁶A son necesarios para el crecimiento
- **Figura 12:** Células productoras de dILPs en mutantes *pütrü*
- **Figura 13:** t⁶A es necesario para sustentar el crecimiento autónomo-celular
- **Figura 14:** Disminución en la proporción de niveles del tRNA iniciador modificado con t⁶A inhibe el crecimiento
- **Figura 15:** La sobreexpresión ubicua de Pütrü promueve el crecimiento

- **Figura 16:** Pütrü promueve el crecimiento de manera autónoma celular
- **Figura 17:** La sobre-expresión de KAE1 promueve el crecimiento en levadura
- **Figura 18:** La actividad de TOR quinasa es sensible a los niveles de tRNAs modificados con t⁶A
- **Figura 19:** Relaciones epistáticas de *pütrü* y componentes de la vía insulina/TOR y el UPR
- **Figura 20:** El UPR no se encuentra activo en mutantes para *pütrü*

- **Figura S1:** El complejo KEOPS/EKC y mecanismo de síntesis de t⁶A
- **Figura S2:** El ciclo de vida de *D. melanogaster* y sus cromosomas
- **Figura S3:** Esquema general del sistema bipartito Gal4/UAS
- **Figura S4:** Esquema de la configuración FLP-out
- **Figura S5:** Generación de clones mitóticos
- **Figura S6:** Anatomía del ala adulta de *Drosophila melanogaster*
- **Figura S7:** Representación esquemática de la familia Kae1/YgjD
- **Figura S8:** Eficiencia y especificidad del interferente contra Pütrü
- **Figura S9:** Complementación de levaduras mutantes para *SUA5* y *BUD32*
- **Figura S10:** Esquema del *locus pütrü* y las inserciones
- **Figura S11:** Sobreexpresión de Pütrü, algunos controles asociados
- **Figura S12:** La fracción de polisomas está reducida en mutantes de *pütrü*
- **Figura S13:** Fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü en el compartimiento posterior del ala adulta

- **Figura S14:** Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü utilizando inhibidores de la apoptosis
- **Figura S15:** Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü manipulando la actividad de la vía insulina/TOR
- **Figura S16:** Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü utilizando componentes del UPR
- **Figura S17:** El silenciamiento de Pütrü activa la UPR en células imaginales

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

4E-BP	eIF4E-Binding Protein 1
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa
AMPK	AMP-activated protein kinase
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF4E	Eukaryotic Initiator Factor 4E
GDP	Guanosina bifosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HPAt⁶A	Hibridación Positiva en Ausencia de t ⁶ A
i⁶A	N ⁶ -isopenteniladenosina
LST8	Lethal with SEC Thirteen 8
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Pol	RNA Polimerasa
RAG	RAS-related GTP-binding
Raptor	Regulatory-Associated Protein of TOR
Rheb	RAS Homologue Enriched in Brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of TOR

RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
S6K	Ribosomal S6 Kinase
SIN1	SAPK-interacting 1
t⁶A	N6-treonilcarbamoiladenosina
TOP	Secuencias ricas en pirimidinas
TOR	Target of Rapamycin
TORC1-2	Complejo TOR1 y 2
tRNA	RNA de transferencia
tRNA^{Met}	tRNA iniciador
TSC1-2	Tuberous sclerosis complex 1 y 2
ULK1	UNC-51-like kinase 1

RESUMEN

Los RNA de transferencia (tRNAs) son ácidos nucleicos fundamentales para la síntesis de proteínas ya que permiten la traducción de la información lineal contenida en el genoma en información tridimensional, las proteínas. Por décadas se ha considerado que estas moléculas pequeñas poseen poco o nulo potencial regulador, sin embargo en los últimos años esta visión ha sido rebatida. Se ha mostrado que los niveles del tRNA iniciador son limitantes y pueden promover el crecimiento celular. Este trabajo tiene como objetivo estudiar las posibles funciones directivas de los tRNAs sobre procesos celulares y en específico cómo una modificación post-transcripcional presente en un sub-grupo de tRNA regula el crecimiento. La N⁶-treonilcarbamoiladenosina (t⁶A) está presente en la posición 37 de todos los tRNAs que reconocen codones que empiezan con A (ANN) y es fundamental para la función decodificadora de estos. Levaduras mutantes para los genes que codifican las enzimas necesarias para su síntesis (KAE1, BUD32 y SUA5) presentan un crecimiento lento, muy similar al observado en mutantes para TOR (*Target of Rapamycin*), el principal regulador del crecimiento en eucariotes. Nos propusimos estudiar la relación funcional entre la modificación t⁶A y el crecimiento utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. Identificamos el ortólogo de *KAE1*, que denominamos *pütrü* (pequeño en

Mapudungún) porque los mutantes para este gen presentan una disminución significativa del tamaño de los organismos. Mostramos que Pütrü en *Drosophila* es requerido para la síntesis de t⁶A. La modificación es necesaria para sustentar el crecimiento de forma autónoma-celular. Por otra parte también mostramos que cambios en la proporción del tRNA iniciador modificado determina el potencial de crecimiento. La actividad de TOR es regulada por los niveles de tRNAs modificados con t⁶A a través de un mecanismo molecular desconocido, sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la respuesta a proteínas mal plegadas no es determinante. La identificación y estudio de dichos mecanismos es de gran importancia para comprender la regulación de TOR quinasa y el crecimiento celular.

ABSTRACT

Transfer RNAs (tRNAs) are nucleic acids of paramount importance for protein synthesis as they allow translation of lineal information contained in the genome into three-dimensional information, the proteins. For decades tRNAs were considered small molecules with poor or none regulatory potential. However in last years this point of view has changed. It has been proved that initiator tRNA levels are a limiting factor for and also can promote growth. This work aims to study precisely this. Specifically we wanted to study a particular aspect of tRNAs and its relationship with cell growth control. We studied a post-transcriptional modification, N⁶-threonylcarbamoyladenosine (t⁶A) which is present in position 37 in all tRNAs that pair with A-starting codons (ANN). This modification is fundamental for tRNAs decoding function and mutant yeast for genes that code for enzymes that synthetize t⁶A (KAE1, BUD32 y SUA5) present a severe slow-growth phenotype, similar to the observed in *TOR (Target of Rapamycin)* mutants. Considering the aforementioned we aimed to study the functional relationship between t⁶A and growth using *Drosophila melanogaster* as model. We identified *KAE1* ortholog and named it *pütrü* (which stand for "small" in Mapudungún) because mutants for this gene presented a severe reduction in organismal size. We showed that Pütrü is required for t⁶A and the modification is needed to sustain growth in a cell-autonomous fashion. We also showed that changes in the

proportion of t⁶A-modified tRNAs is sufficient to establish growth capabilities of a cell. In both, enhanced or decreased levels of t⁶A-modified tRNAs we observed changes in TOR activity, showing that there is a relationship, revealed in this work for the first time, between TOR and modified tRNAs availability. Underlying molecular mechanisms which explains this functional interaction remain unknown, however our results suggest that the unfolded protein response (UPR) is not involved. Identification and extensive study of these mechanisms is of paramount importance to understand TOR kinase and cell growth control.

INTRODUCCIÓN

1. RNAs de transferencia (tRNAs)

1.1. Estructura general

Corresponden a RNAs estables y estructurados, presentes en todas las células y son actores fundamentales en la síntesis de proteínas. Son el eslabón, al actuar como moléculas adaptadoras, que permite la traducción de la información lineal contenida en el genoma, a estructuras tridimensionales, las proteínas (Phizicky y Hopper 2010). En términos generales, los tRNAs son cadenas lineales compuestas por 73-90 nucleótidos que se organizan espacialmente en cuatro brazos o tallos helicoidales, conectados por una región central, formando la clásica estructura tipo “hoja de trébol” (Figura 1A). El brazo aceptor comprende los extremos 5' y 3' de la molécula, el último posee 4 nucleótidos que no se encuentran apareados y la secuencia CCA en el extremo 3'. Enfrentando al brazo aceptor se encuentra el brazo del anti-codón, mediante esta estructura el tRNA interactúa específicamente con el codón presente en el RNA mensajero (mRNA). Junto con los brazos TΨC y D forman el núcleo estructural de la molécula. Más allá de su estructura secundaria el tRNA se pliega hasta alcanzar una estructura terciaria con forma de “L” (Figura 1B). Adicionalmente, los tRNAs poseen un *bucle* variable, localizado entre los brazos aceptor y D (Phizicky y Alfonzo 2010).

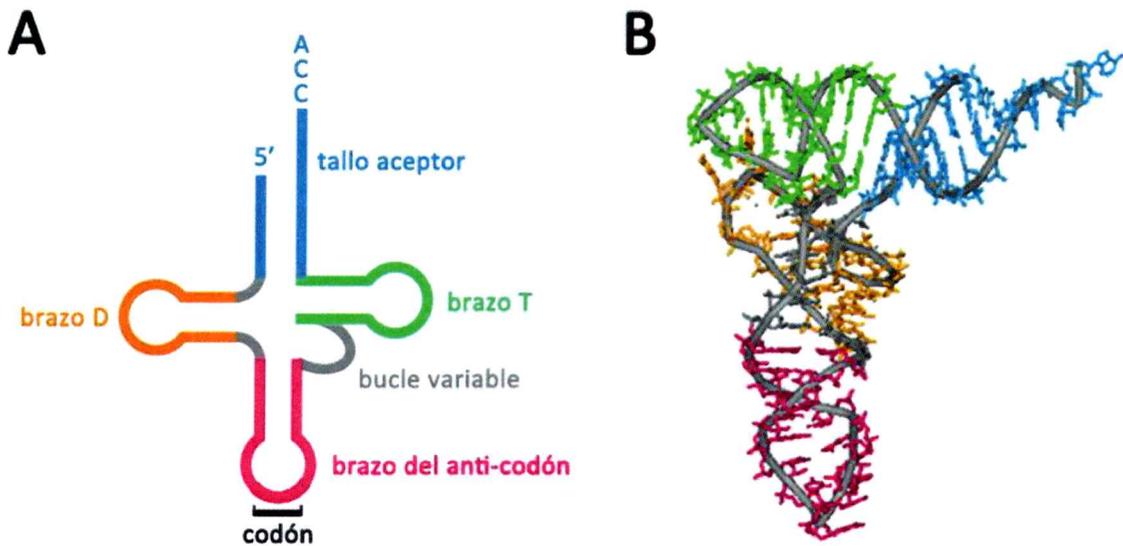


Figura 1: Representación de la estructura general de los tRNAs.

(A) Esquema de la estructura secundaria de los tRNAs. Se representa como una forma similar a una hoja de trébol. Los distintos brazos de la molécula están coloreados para reconocerlos fácilmente. Brazo aceptor (azul), del anti-codón (rosado), brazo D (marrón) y T Ψ C (verde). La región o *bucle* variable también está representada (gris). En (B) se muestra la estructura terciaria canónica, con forma de "L". Los brazos siguen la misma clave de colores.

1.2. Los tRNAs son elementos decodificadores en la traducción

Los mRNA presentan su código en tripletes de nucleótidos, llamados codones, cada uno de ellos determina la adición de un amino ácido particular a la cadena polipeptídica naciente. Los tRNAs interpretan el código genético ya que cada uno posee una secuencia particular, compuesta también por 3 nucleótidos, el anti-codón, que permite reconocer un codón específico del mRNA. Durante la síntesis de proteínas, el anti-codón correcto formará apareamiento de bases tipo Watson-Crick con el codón correspondiente. La identidad del amino ácido incorporado depende del correcto reconocimiento entre el codón y el anti-codón. Para funcionar como un sustrato en la síntesis de proteínas, los tRNAs deben ser cargados con el amino ácido correspondiente por una aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS) específica. Así, al reconocer los codones sucesivos del mRNA por parte del anti-codón presente en cada tRNA se va formando la proteína codificada (Phizicky y Hopper 2010).

2. Aspectos generales de la biogénesis de tRNAs en eucariotes

La biogénesis de los tRNAs es un proceso complejo, que implica diversas etapas tanto en el núcleo como en el citoplasma. Los tRNAs citoplasmáticos están codificados en el genoma nuclear. Sus genes son transcritos por la RNA Polimerasa III (RNA Pol III) (Dieci y col. 2007). Los extremos de los precursores son removidos por endonucleasas, del 5' se encarga la RNasa P (Walker y Engelke 2006), mientras que en el 3' la responsable es la RNasa Z (Schiffer y

col. 2002) y en eucariotes, se agrega la secuencia CCA, la cual se ha propuesto está relacionada con mecanismos de control de calidad de tRNAs (Dupasquier y col. 2008). Una de las características más conspicuas de los tRNAs es su gran número de modificaciones post-transcripcionales. En los tRNAs existen al menos 92 modificaciones diferentes (Cantara y col. 2011). Un escrutinio de 561 secuencias de tRNAs provenientes de diferentes organismos mostró que las modificaciones se encuentran en un 12% de los nucleótidos (Sprinzl y Vassilenko 2005) con una media de 8 modificaciones por tRNA (Phizicky y Alfonzo 2010). La gran conservación de algunas modificaciones sugiere que poseen un importante rol para la función de los tRNAs. En la última década se han logrado grandes progresos en la identificación de genes y las correspondientes enzimas que son responsables de las modificaciones presentes en los tRNAs, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*. La información obtenida ha sido compilada y compartida en diversas bases de datos: RNA Modification Database (<http://mods.rna.albany.edu>), Modomics Database (<http://modomics.genesilico.pl>) y la tRNA Database (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>).

Sólo una fracción de los genes que codifican para tRNAs posee intrones. El corte y empalme de estos es esencial (Lowe y Eddy 1997). Hasta este momento, los tRNAs aún inmaduros se encuentran en el núcleo y deben ser transportados al citoplasma para terminar su biosíntesis. El transporte de tRNAs ocurre a través de los poros nucleares y depende de miembros de la familia β -

importina (Kutay y col. 1998). El receptor interactúa directamente con el tRNA en presencia de Ran-GTP; el complejo heterotrimérico Ran-GTP-Receptor-tRNA se mueve a través del poro nuclear hacia el citoplasma, donde luego de un aumento de la hidrólisis de Ran-GTP a Ran-GDP, el complejo se disocia y libera el tRNA (Ibba y Soll 2000). Para que los tRNAs sean funcionales en la síntesis de proteínas, deben ser cargados con el amino ácido correspondiente. Esta función es realizada por las enzimas denominadas aminoacil-tRNAs sintetasas (aaRS), una antigua familia de enzimas presentes en los 3 dominios de la vida (Yao y Fox 2013) que catalizan una reacción de esterificación que asocia un amino ácido particular con su correspondiente tRNA, que posee el anti-codón correcto, asegurando la interpretación precisa del código genético (Schimmel 1987). Ahora el tRNA se encuentra maduro, asociado al amino ácido correspondiente y en el lugar correcto para ser partícipe de la síntesis de proteínas.

3. Más allá de la visión clásica, los tRNAs no son meros adaptadores estáticos y pasivos

Por mucho tiempo se consideró a los tRNAs como moléculas con pobre e incluso nulo potencial regulador sobre algún proceso celular (Crick 1968). Sin embargo esta idea ha cambiado en los últimos años, además de traducir el código genético, se ha mostrado que tienen un papel en otras funciones celulares, relacionadas o no con la síntesis de proteínas. De manera aún más interesante, se ha mostrado, incluso pueden tener una función directiva.

3.1. Regulación de tRNAs frente a cambios en la fisiología celular

Distintos tRNAs son expresados diferencialmente durante el desarrollo, diferenciación, crecimiento, envejecimiento y en procesos patológicos como la carcinogénesis. Se ha sugerido que alteraciones en los patrones de expresión de tRNAs pueden ser relevantes para modular la expresión génica durante los diversos estados fisiológicos o patológicos (Phizicky y Hopper 2010). Recientemente se ha establecido que la traducción de mensajeros relacionados con proliferación o diferenciación requiere cambios en el uso de codones y necesariamente, una modificación en el repertorio de tRNAs. Utilizando técnicas de secuenciación masiva se ha mostrado que células en diferenciación presentan un repertorio de tRNAs significativamente distinto al que poseen células que se encuentran proliferando (Gingold y col. 2014). Otras situaciones interesantes están relacionadas específicamente con los niveles del tRNA iniciador ($tRNA^{Met}$).

Durante la embriogénesis del conejo (*Oryctolagus cuniculus*), la cantidad de iniciador aumenta 50 veces entre los días 2 y 6, pero por el aumento en el número de células, esto se traduce en una reducción en los niveles por cada célula. El ritmo de síntesis de proteínas cambia de manera discontinua durante este período, correlacionándose con los niveles de tRNA iniciador (Clandinin y Schultz 1975). Linfocitos humanos de sangre periférica, población celular en G₀, responden a estímulos *in vitro*, como por ejemplo agentes mitogénicos, de manera similar a lo que ocurre *in vivo* durante una respuesta inflamatoria. Ésta incluye un incremento temprano y progresivo en el ritmo de síntesis de proteínas, esencial para la progresión del ciclo celular y para la expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo diferenciado de estas células. Esto es acompañado de un aumento en los niveles del tRNA^{Met} (Cooper y Braverman 1981). Algo similar ocurre en células cancerosas, altamente proliferativas comparado con células normales, que presentan mayores niveles de tRNA iniciador (Kanduc y col. 1997). Estos resultados invitan a pensar que los cambios en los tRNAs, especialmente del iniciador, corresponden a una consecuencia dependiente de otras señales. Es de esperar, que una célula adaptará su maquinaria de traducción para satisfacer necesidades según el proceso que esté llevando a cabo. Sin embargo, existe evidencia de que los tRNAs pueden tener efectos reguladores y directivos sobre determinados procesos.

3.2. Los tRNAs como elementos reguladores

En *S. cerevisiae* se ha observado una correlación directa entre los niveles del tRNA_i^{Met} y su ritmo de crecimiento, las células que tienen mayores niveles del iniciador crecen y proliferan más rápido (Francis y Rajbhandary 1990). Este no es un resultado sorprendente y sólo muestra el carácter limitante del iniciador. Investigadores se propusieron explorar los posibles roles reguladores sobre el crecimiento. Cuando se sobre-expresa el tRNA_i^{Met} en células epiteliales humanas *in vitro* se promueve el crecimiento y proliferación de éstas. Además existen cambios en el repertorio de tRNAs inducido por la sobre-expresión del tRNA_i^{Met} (Pavon-Eternod y col. 2013). Algo similar ocurre *in vivo* en *Drosophila* donde se mostró que la adición de una copia extra del *locus* que codifica para tRNA_i^{Met} es suficiente para promover el crecimiento del organismo completo (Rideout y col. 2012). Estos resultados muestran el carácter limitante y directivo del tRNA_i^{Met} sobre el crecimiento en eucariotes.

Para comprender nuestra propuesta, es necesario comentar lo que se entiende por crecimiento celular, cómo se regula y cuáles son los mecanismos que lo controlan.

4. El problema del crecimiento

4.1. La distinción entre crecimiento celular y proliferación

En la segunda mitad de los años 60, Lee Hartwell aisló cerca de 400 cepas mutantes de *S. cerevisiae* sensibles a la temperatura que caracterizó en relación a la síntesis de macromoléculas (proteínas y RNA), división celular y morfología. En este trabajo se hizo una distinción fundamental entre proliferación y crecimiento celular (Hartwell 1967). La proliferación se refiere a la división celular y corresponde al incremento en el número de células, mientras que el crecimiento, se refiere a la síntesis de macromoléculas que lleva al aumento de masa y tamaño (Schmelzle y Hall 2000). Hartwell y su grupo de investigación se centró en el estudio de la proliferación y así abrió la puerta a la extensa investigación del ciclo celular. El conocimiento sobre los mecanismos que regulan este proceso es a la fecha bastante profundo y sofisticado (Cai y Tu 2012, Green y col. 2012, Teixeira y Reed 2013), mientras que el estudio del crecimiento y sus mecanismos regulatorios, permanecieron en un segundo plano. Erróneamente, la distinción entre proliferación y crecimiento se ha ido perdiendo. Es muy común que los términos “proliferación” y “crecimiento” sean incorrectamente utilizados como sinónimos. De hecho estos términos son separables y distintos, como Hartwell y otros han mostrado (Hartwell 1967, Thomas y Hall 1997, Neufeld y Edgar 1998).



4.2. Crecimiento celular y la búsqueda de sus reguladores

El crecimiento celular dista de ser la simple acumulación de biomasa. Es una acumulación altamente orquestada, que ocurre sólo en lugares y momentos específicos. Por ejemplo, en levaduras tiene lugar cuando éstas se encuentran en presencia de nutrientes y únicamente en posiciones discretas (las yemas) (Broach 2012). En los metazoos, el problema es más complejo. Los distintos órganos del cuerpo deben alcanzar un tamaño determinado para mantener las proporciones del cuerpo. Así, para lograr un adecuado tamaño de los órganos y el organismo, el crecimiento celular debe estar estrechamente coordinado con la proliferación y la muerte celular (Gilbert 2010).

Desde los tiempos que Hartwell describió sus mutantes, enorme progreso se ha realizado en comprender el crecimiento celular. Se ha descubierto que mecanismos muy sofisticados regulan activamente el crecimiento en respuesta a las condiciones intra- y extra-celulares. El crecimiento celular no es simplemente regulado por la disponibilidad de nutrientes como se pensaba, si no que existen intrincadas vías de señalización capaces de modificar la fisiología celular, modulando la síntesis de macromoléculas. A la fecha, existe una importante cantidad de evidencia y es ampliamente aceptado de que la quinasa TOR (*Target of Rapamycin*) juega un rol central en la regulación del crecimiento celular.

5. TOR, el regulador del crecimiento celular en eucariotes

En un organismo multicelular, las células crecen y proliferan cuando los nutrientes, los factores de crecimiento y el estado energético celular promueven la síntesis de macromoléculas. Es la conservada serina/treonina quinasa TOR la que integra dichos estímulos y activa las vías metabólicas que llevan a la célula a crecer. Entender la función y elementos regulatorios de TOR es esencial para comprender como las células y finalmente los organismos crecen y establecen su tamaño (Shimobayashi y Hall 2014). TOR fue originalmente identificada por las mutaciones en levadura TOR1-1 y TOR2-1, que confieren resistencia a la inhibición del crecimiento ejercida por el antibiótico rapamicina en *S. cerevisiae* (Heitman y col. 1991). Estudios posteriores llevaron a la identificación de ortólogos de TOR en otros organismos. A la fecha, todo genoma eucariote examinado posee un gen ortólogo (Wullschleger y col. 2006). Las proteínas TOR son de gran tamaño (~280 kDa) y tienen 40-60% de identidad entre las especies. Pertenecen al grupo de quinasas relacionadas a fosfatidilinositol quinasas (PIKK) (Wullschleger y col. 2006). TOR se encuentra en 2 complejos estructural y funcionalmente distintos: complejo TOR1 (TORC1) y TORC2 (Wullschleger y col. 2006, Laplante y Sabatini 2012). Los componentes de TORC1 son la quinasa TOR, RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of TOR*) y LST8 (*Mammalian lethal with SEC Thirteen 8*) (Figura 2A), mientras que los de TORC2 corresponden a TOR, RICTOR (*Rapamycin-insensitive companion of TOR*), SIN1 (*SAPK-interacting 1*) y LST8 (Loewith y col. 2002) (Figura 2B). A muy grandes rasgos,

es aceptado que TORC1 media las respuestas relacionadas con el crecimiento celular y es sensible a rapamicina. Mientras que TORC2 es insensible a ésta y es requerido para la organización del citoesqueleto de actina (Laplante y Sabatini 2012).

La conservación de las funciones de TOR en eucariotes es alta, de hecho, los resultados obtenidos en un modelo son en general válidos o representativos para otros organismos. Por ejemplo, la falta de TOR en *Drosophila* genera problemas durante el desarrollo que guardan similitudes con las observadas en larvas sometidas a dietas limitadas en amino ácidos esenciales (Weinkove y col. 1999). Lo mismo ocurre en embriones de ratón nulos para mTOR (*mammalian TOR*) (Gangloff y col. 2004). En conjunto, estos resultados muestran que en metazoos TOR es necesario para el crecimiento celular durante el desarrollo.

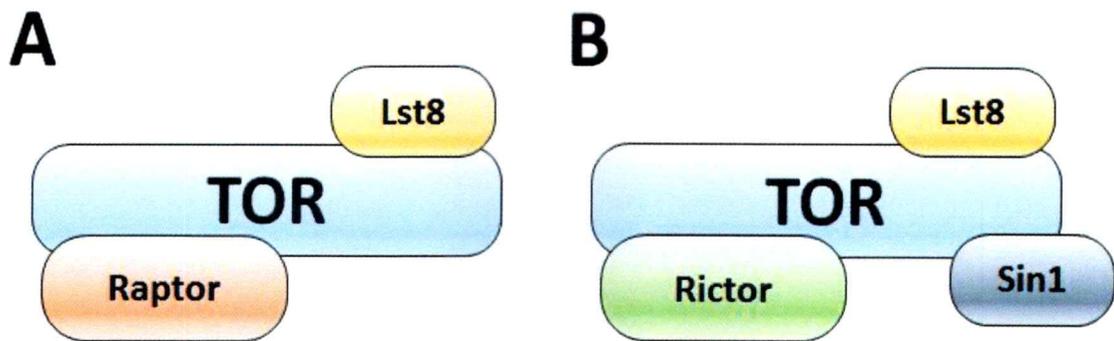


Figura 2: TOR quinasa se encuentra en dos complejos multiproteicos

Se esquematizan los dos complejos estructural y funcionalmente distintos en que TOR se presenta (A) Complejo TOR1 (TORC1) y (B) TORC2. TOR quinasa es el elemento central y catalítico en ambos, las proteínas con las cuales interactúa entregan la especificidad por distintos sustratos y determinan las funciones no redundantes de los complejos. La imagen corresponde a un esquema referencial y no es proporcional a los tamaños reales de sus componentes.

5.1. ¿Cómo TOR controla el crecimiento?

Luego de su activación, TORC1 fosforila diversos sustratos. Los mejores caracterizados son S6K (*Ribosomal S6 Kinase*), 4E-BP (*eIF4E-Binding Protein 1*) (Ma y Blenis 2009) y ULK1 (*UNC-51-like kinase 1*) (Jung y col. 2009) (Figura 3e). TORC1 controla la síntesis de proteínas al fosforilar a S6K y 4E-BP (Hay y Sonenberg 2004). S6K activa es capaz de fosforilar a la proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S promoviendo la traducción de un subgrupo de mRNAs que contienen secuencias ricas en oligopirimidinas (TOP) en el 5'. Este grupo de mRNAs, entre otros, codifica para componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, como componentes ribosomales y factores de elongación de la traducción (Thoreen y col. 2012), favoreciendo la síntesis de proteínas. Mientras que la fosforilación de 4E-BP causa la liberación del eIF4E, que ahora libre es capaz de estimular el inicio de la traducción dependiente de CAP (Jewell y col. 2013). Además de promover el inicio de la traducción TORC1 también asegura la disponibilidad de elementos fundamentales para la síntesis de proteínas, los ribosomas y tRNAs. TORC1 controla la transcripción dependiente de la RNA polimerasa I (RNA Pol I) a través del factor de transcripción RRN3/TIF1A, esencial para el inicio de la transcripción (Claypool y col. 2004, Mayer y col. 2004). También regula la transcripción de tRNAs al inactivar a un inhibidor de la RNA Pol III, Maf1 (Rideout y col. 2012).

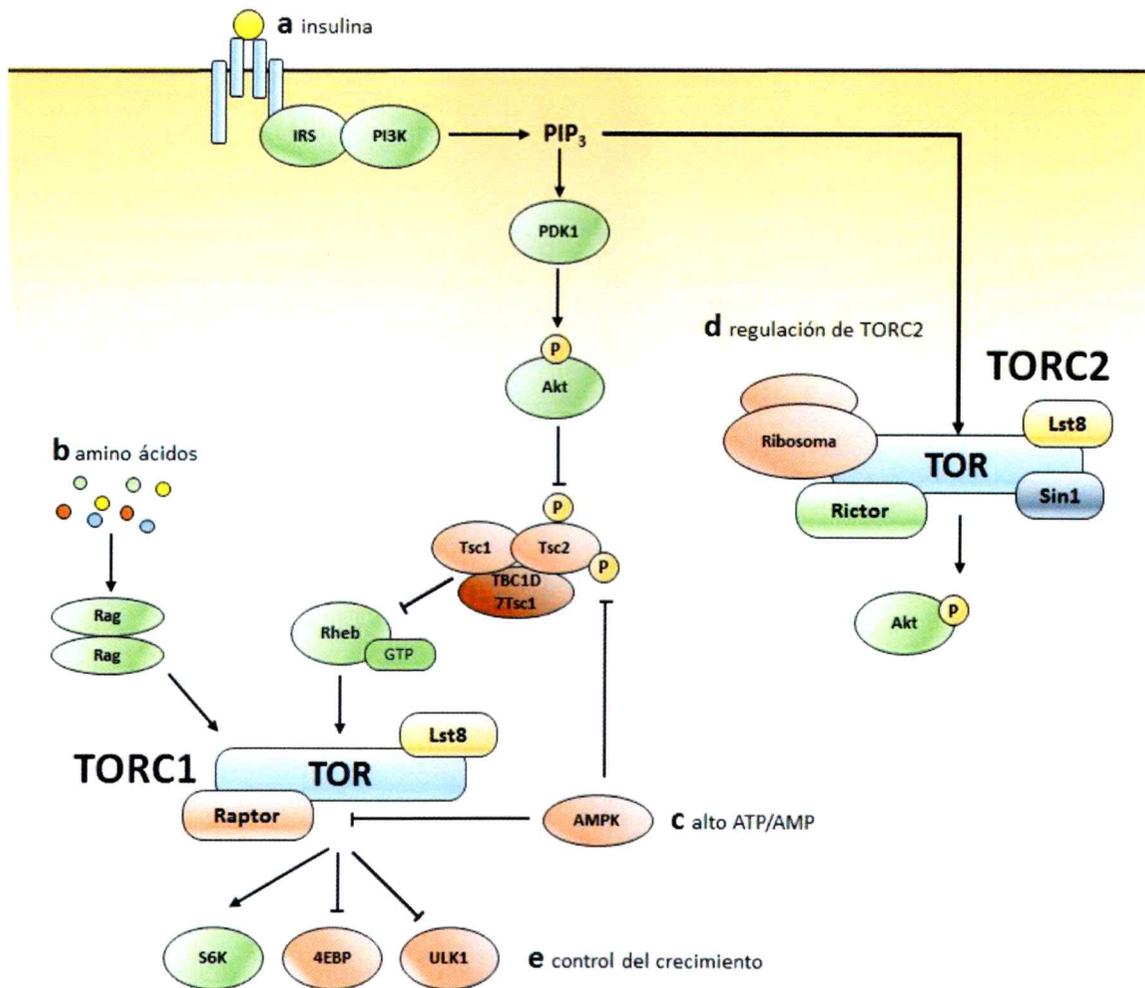


Figura 3: La vía de señalización insulina/TOR

Representación esquemática de la vía insulina/TOR en metazoos. (a) Factores de crecimiento, como la insulina, estimulan a PI3K para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), promoviendo la fosforilación de Akt mediada por PDK1. Akt fosforila al complejo Tsc-2, inhibiendo su actividad GAP hacia Rheb, la cual cargada con GTP activa a TORC1. (b) Los aminoácidos promueven la conversión a la forma activa del heterodímero de GTPasas Rag que recluta a TORC1 a la membrana del lisosoma donde se encuentra con Rheb activado. En respuesta a baja energía (c), AMPK fosforila a Raptor, presente en TORC1, causando la inhibición del complejo. (d) Los factores de crecimiento también pueden activar a TORC2 que es capaz de fosforilar a Akt en un sitio distinto al fosforilado por PDK1. (e) La fosforilación concertada de S6K, 4E-BP y ULK1 controla el balance entre procesos anabólicos y catabólicos. Adaptado de (Shimobayashi y Hall 2014)

Mientras TORC1 promueve la síntesis de proteínas, por otro lado inhibe procesos catabólicos, permitiendo así la acumulación de biomasa. Cuando una célula enfrenta la falta de nutrientes, ésta empieza a degradar componentes celulares incluyendo organelos, reciclando macromoléculas para asegurar su supervivencia en condiciones nutricionalmente apremiantes. Este proceso catabólico es conocido como macroautofagia (autofagia en adelante) e implica la inclusión de citoplasma en vesículas de doble membrana para luego fusionarse con los lisosomas. TORC1 controla la autofagia en levadura y eucariotes más complejos (Lum y col. 2005). Un importante descubrimiento fue la identificación de Ulk1 (*UNC-51-like kinase 1*) como un sustrato de TORC1 (Ganley y col. 2009, Hosokawa y col. 2009). Bajo condiciones ricas en nutrientes TORC1 fosforila a Ulk1, inhibiendo su interacción con AMPK (*AMP-activated protein kinase*), previniendo la autofagia (Kim y col. 2011).

La fosforilación mediada por TORC1 también controla la transcripción dependiente de la RNA Polimerasa II (RNA Pol II) de diversos genes, particularmente algunos involucrados en vías metabólicas y biosintéticas como se ha mostrado mediante análisis de microarreglo a partir de células de mamífero tratadas con rapamicina (Peng y col. 2002). En condiciones favorables, TORC1 promueve la síntesis de lípidos para sustentar la producción de nuevas membranas de forma dependiente (Porstmann y col. 2008) o independiente de S6K (Peterson y col. 2011). Los nucleótidos son las unidades fundamentales del DNA y RNA. Son moléculas altamente energéticas, necesarias para diversas reacciones fundamentales para las células. Recientemente se ha mostrado en

estudios de fosfoproteómica y metabolómica que TORC1 es capaz de estimular la síntesis *de novo* de pirimidinas al fosforilar y activar las enzimas que catalizan los tres primeros pasos de su síntesis (Ben-Sahra y col. 2013, Robitaille y col. 2013).

5.2. ¿Cómo se regula la actividad de TOR?

A la fecha se tiene una idea sofisticada de cómo TOR es capaz de integrar diversas claves intrínsecas y extrínsecas, sin embargo, estamos lejos de entender los procesos completamente. TOR es activado por factores de crecimiento (por ejemplo, insulina), nutrientes (amino ácidos) y el estado energético celular (alta proporción ATP/AMP) (Figura 3). Un factor de crecimiento como la insulina, estimula a TOR a través de la vía PDK1-Akt. Cuando Akt se activa, fosforila a Tsc2 (*Tuberous sclerosis complex 2*) en múltiples sitios para inhibir al complejo Tsc1 (también denominado hamartina)-Tsc2-Tbc1d7 que actúa como una proteína GAP para la GTPasa Rheb (*RAS Homologue Enriched in Brain*). Durante la inhibición del complejo Tsc, Rheb-GTP se une al dominio catalítico de TOR para activar al complejo 1 a través por un mecanismo desconocido (Long y col. 2005) (Figura 3a). Por otro lado y de manera simultánea, la señalización relacionada con nutrientes se transduce a través de la familia RAG (*RAS-related GTP-binding*) de GTPasas pequeñas (Jewell y col. 2013). Un heterodímero activo de las proteínas RAG es mediador de la translocación de TOR desde el citoplasma a la superficie del lisosoma, lugar en el que TORC1 se encuentra con Rheb en su estado activo (Dennis y col. 2011,

Bar-Peled y Sabatini 2014) (Figura 2b). Además, una alta proporción ATP/AMP (un estado celular de alta disponibilidad energética) previene la activación de la quinasa AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*). En condiciones de baja energía (baja proporción ATP/AMP), AMPK se activa para fosforilar a Tsc2 y Raptor, inhibiendo a TORC1 (Gwinn y col. 2008) (Figura 3c).

En comparación con lo que se sabe sobre la regulación de TORC1, lo relacionado con TORC2 permanece mayormente desconocido. También la presencia de factores de crecimiento estimula la actividad quinasa de TORC2, que es promovida a través de PI3K de manera dependiente a la unión del complejo a los ribosomas ensamblados (subunidades 80S) (Zinzalla y col. 2011). Las etapas necesarias posteriores a ésta para su activación son desconocidas y distintas a las requeridas por TORC1 (Cybulski y Hall 2009). Cuando TORC2 se encuentra activo, fosforila el motivo hidrofóbico de un subgrupo de la familia quinasa AGC (PKA, PKG y PKC), incluyendo a Akt (Sarbasov y col. 2005) (Figura 3d). Sin embargo dicha fosforilación a Akt no es necesaria para sustentar el crecimiento (Hietakangas y Cohen 2007). TORC2 ha sido relacionado principalmente con el control de la organización del citoesqueleto de actina (Huang y col. 2013) y últimamente con aspectos de inestabilidad genómica, por ejemplo cuando células son tratadas con agentes genotóxicos o irradiadas, generando daño en el DNA (Weisman y col. 2014). Además su interacción con los ribosomas (Zinzalla y col. 2011) sugiere que TORC2 podría actuar como un elemento coordinador entre la disponibilidad de factores de crecimiento y el estado funcional de la maquinaria de traducción.

5.3. Nuevos elementos no convencionales que regulan a TOR

Reguladores “clásicos” corresponden, en grandes rasgos, a los asociados a la vía de la insulina, factores de crecimiento, nutrientes y niveles energéticos de la células (Shimobayashi y Hall 2014). También se ha identificado otros reguladores inesperados, denominados “no clásicos”, como la vía Hippo (Tumaneng y col. 2012, Tumaneng y col. 2012), Wnt (Valvezan y col. 2014) y Notch (Pajvani y col. 2013). Hace pocos años se mostró que los tRNAs, sustratos fundamentales para la síntesis de proteínas y que se encuentran río-abajo de TORC1, regula la actividad de éste por un mecanismo aún desconocido (Huynh y col. 2010).

6. Disponibilidad citoplasmática de tRNAs y actividad de TOR

La disponibilidad de tRNAs maduros en el citoplasma tiene efectos sobre la actividad de TORC1 en células de mamífero en cultivo. Una disminución en sus niveles lleva a la disminución de la actividad de TORC1 (Huynh y col. 2010). TORC1 promueve la transcripción y biosíntesis de tRNAs, sugiriendo una regulación recíproca entre estos componentes (Lee y col. 2012). La relación entre ellos se está estudiando en forma reciente, pero ya ha entregado información sorpresiva que sugiere una interacción en extremo compleja, tanto así que podría jugar un rol importante en la generación del cáncer y otras patologías (Kanduc y col. 1997, Abbott y col. 2014). En general, el aspecto más estudiado y manipulado

en relación a los tRNAs es sus niveles. Existen otras aristas propias de la biología de estas moléculas que merece explorar. En este trabajo exploramos uno de ellos. Nos propusimos investigar el rol que una modificación post-transcripcional presente en un sub-grupo de tRNAs, y requerida para su función decodificadora, puede ejercer sobre la maquinaria de síntesis de proteínas y finalmente, determinar el crecimiento celular y animal.

6.1. Una modificación de tRNAs universalmente conservada es necesaria para el crecimiento

Un aspecto que hasta el momento no se ha considerado en el control del crecimiento es que durante su biosíntesis, los tRNAs son extensamente modificados en posiciones específicas. La estructura y función de algunos tRNAs depende de la presencia de ciertas modificaciones (El Yacoubi y col. 2012). La N⁶-treonilcarbamoiladenosina (t⁶A), presente en la posición 37 de los tRNAs que reconocen codones del tipo ANN, está universalmente conservada y es indispensable para la función decodificadora de dicho grupo de tRNAs (Weissenbach y Grosjean 1981, Murphy y col. 2004, El Yacoubi y col. 2011) dentro de los cuales se encuentra el tRNA iniciador que reconoce el codón de inicio AUG. Así, la presencia de esta modificación condiciona la funcionalidad de estos tRNAs, sugiriendo un rol regulatorio sobre el inicio de la traducción.

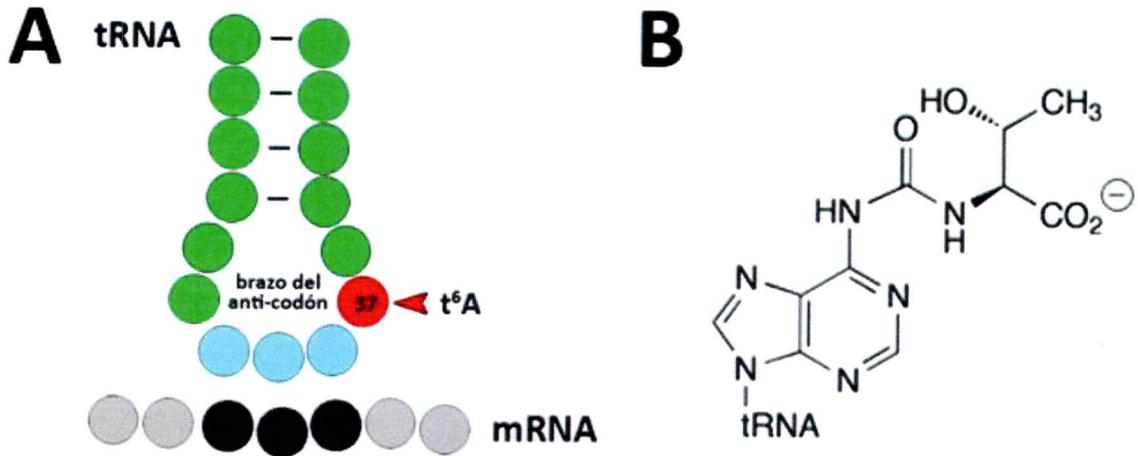


Figura 4: Localización y estructura química de t⁶A

(A) Ubicación de t⁶A en el brazo del anti-codón. Los nucleótidos se representan con círculos. Los que componen el anti-codón están coloreados en celeste. La modificación t⁶A se encuentra indicada con una flecha y está coloreada en rojo. La posición 37 está indicada. En la parte inferior se muestra también el mRNA en círculos grises, los que constituyen el codón que está siendo reconocido está en color negro. (B) Estructura química de N⁶-treonilcarbamoiladenosina.

L

Si bien esta modificación se conoce hace más de 30 años (Parthasarathy y col. 1977, Adamiak y col. 1978) sólo hace poco tiempo se identificaron las enzimas que la producen. Para la síntesis de t⁶A en *S. cerevisiae* se requiere al complejo KEOPS y SUA5 (Daugeron y col. 2011, El Yacoubi y col. 2011, Deutsch y col. 2012) (Anexo 1, Figura S1). En levadura el complejo KEOPS/EKC está compuesto por PCC1, CGI-121, BUD32 y KAE1, siendo la última la subunidad catalítica (Thiaville y col. 2015). Levaduras mutantes para estas enzimas presentan ausencia de t⁶A y crecimiento lento (El Yacoubi, Hatin et al. 2011). Es interesante notar que los mutantes para las enzimas requeridas para la síntesis de t⁶A guardan grandes similitudes con mutantes para TOR o sus reguladores positivos (Montagne y col. 1999), sugiriendo que la presencia de la modificación por un lado es necesaria para el crecimiento celular y además podría ejercer un efecto sobre la actividad de TOR quinasa, teniendo consecuencias directas sobre el inicio de la traducción y el establecimiento del tamaño de los organismos. Nos propusimos explorar por primera vez la relación entre la modificación t⁶A y el crecimiento utilizando *Drosophila melanogaster*.

En consideración de los antecedentes expuestos proponemos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“Los niveles de tRNAs modificados con treonilcarbamoil-adenosina (t⁶A) determinan el potencial de crecimiento en *Drosophila melanogaster*”

OBJETIVO GENERAL

Establecer que los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el potencial de crecimiento en *Drosophila melanogaster*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer que *pütrü*, el ortólogo de *KAE1*, es necesario para la síntesis de t⁶A en *Drosophila melanogaster*
2. Establecer que cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el tamaño celular y animal en *Drosophila melanogaster*
3. Determinar la relación epistática entre *pütrü*, componentes de la vía insulina/TOR y de homeostasis proteica

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones del uso de *Drosophila* como modelo experimental, ciclo de vida, cromosomas y nomenclatura puede ser encontrada en el Anexo 2. Mientras que las técnicas genéticas se esquematizan y explican en el Anexo 3.

Nomenclatura

La nomenclatura utilizada para referirse a los genes de *Drosophila* y *S. cerevisiae* es la propuesta en Flybase y *Saccharomyces* Genome Database, respectivamente.

Materiales Biológicos

Se utilizaron diversas cepas de *Drosophila* desarrolladas en nuestro laboratorio u obtenidas desde distintas colecciones internacionales. Las cepas UAS- se detallan en la tabla 1, las Gal4> en la tabla 2 y en la tabla 3 se detallan los mutantes utilizados.

Tabla 1: Cepas UAS

Genotipo	Origen	Aplicación y comentarios
w;;UAS-Pütrü (II) ó (III)	Laboratorio	Sobreexpresión de Pütrü. Inserciones en cromosomas II y III
w;;UAS-KAE1 (III)	Laboratorio	Sobre-expresión de KAE1, corresponde al ortólogo de levadura. Inserción en cromosoma III
w ; UAS-Pütrü-IR (II)	VDRC	Inducción de RNA interferencia contra Pütrü
w;;UAS-Prpk-IR (III)	VDRC	Silenciamiento de Prpk. Invertido repetido controlado por secuencia UAS. Inserción en cromosoma III

Tabla 2: Cepas Gal4

Genotipo	Utilidad y comentarios
<i>engrailed</i> >Gal4 (II) (<i>en</i> >Gal4)	Expresión de Gal4 comandada por el promotor de <i>engrailed</i> , expresión en el compartimiento posterior. Inserción en cromosoma II
<i>hedgehog</i> >Gal4 (II) (<i>hh</i> >Gal4), UAS- GFP/TM6b,Tb	Expresión de Gal4 en el compartimiento posterior, activando la transcripción de GFP, controlada por secuencias UAS. Obtenida por recombinación mitótica. Inserciones en cromosoma III
<i>daughterless</i> >Gal4 (III) (<i>da</i> >Gal4)	Expresión ubicua de Gal4. Inserción en cromosoma III
<i>armadillo</i> >Gal4 (<i>arm</i> >Gal4) (II)	Expresión ubicua de Gal4. Inserción en cromosoma II
<i>tubulina</i> >Gal4/TM6b,Tb (<i>tub</i> >Gal4)	Expresión ubicua de Gal4. Inserción en cromosoma III

*El origen de todas las cepas es BDSC

Tabla 3: Cepas mutantes

Nombre	Origen	Genotipo
CG4933 ^[f01978]	BDSC #18497	w ^[1118] ; PBac(w[+mC]=WH)wCG4933 [f01978]/TM6B, Tb[1]
CG4933 ^[e01173]	Exelixis f01978	w ^[1118] ; PBac(w[+mC]=WH)CG4933 [f01173]/TM6B, Tb[1]

Durante el desarrollo de los experimentos fue necesario combinar características genéticas presentes en dos o más cepas distintas. Esto se logra por recombinación meiótica o logrando una segregación conjunta de las características genéticas de interés. Las cepas generadas por recombinación meiótica se detallan en la tabla 4, mientras que las obtenidas por segregación conjunta de cromosomas se describen en la tabla 5. Además, en la tabla 6 se abordan otras cepas utilizadas para generar todos los animales antes indicados o bien para determinados experimentos.

Tabla 4: Cepas generadas por recombinación meiótica

Genotipo	Utilidad y comentarios
w; en>Gal4, UAS-Pütrü-IR /CyO	Silenciamiento de Pütrü en el compartimiento posterior. Utilizado para la búsqueda de supresores y promotores del fenotipo derivado de la falta de función de Pütrü.
w ; ; CG4933 ^[f01978] , UAS-Pütrü/TM6b	Utilizado para sobre-expresar Pütrü en un fondo genético mutante para <i>pütrü</i>
w ; ;CG4933 ^[f01978] , <i>heat-shock-Gal4 (hs-Gal4)</i> /TM6b	Expresión ubicua de Gal4 luego de un golpe alta temperatura en un fondo genético mutantes para <i>pütrü</i>
w ; ; CG4933 ^[f01978] , UAS-Akt.myr /TM6b	Permite la expresión de una versión miostilada de Akt/PKB en un fondo genético mutante para <i>pütrü</i>
w ; ; CG4933 ^[f01978] , UAS-Rheb.PA /TM6b	Permite la expresión de Rheb en un fondo genético mutante para <i>pütrü</i>
CG4933 ^[f01978] ,FRT80B/TM6b	Generación de animales mosaico por recombinación mitótica.
CG4933 ^[e01173] ,FRT80B/TM6b	Generación de animales mosaico por recombinación mitótica

Tabla 5: Cepas obtenidas por segregación conjunta de cromosomas

Nombre	Utilidad y comentarios
<i>arm>Gal4</i> ; CG4933 ^[f01978] /S_T	Expresión ubicua de Gal4 en fondo mutante para CG4933
UAS-PI3Kact/FM7c;; CG4933 ^[f01978] /TM6b	Permite la expresión de una versión permanentemente activada de PI3K en fondo mutante para <i>pütrü</i>

Tabla 6: Otras cepas

Nombre	Utilidad y comentarios
yellow white (<i>yw</i>)	Marcadores recesivos <i>yellow</i> (pigmentación cutícula) y <i>white</i> (falta de pigmento en ojos)
w; IF/CyO; MKRS/TM6b	Balanceador de cromosomas II y III
w; If/S_T	Balanceador simultáneo de cromosomas II y III
y,w, hs-FLP ^{f36} ;; ubi-GFP, FRT80B	Expresa FLP tras golpe de calor, útil en la generación de clones mitóticos

Además de *Drosophila*, en el trabajo se usó *S. cerevisiae*, en la tabla 7 se detalla las cepas utilizadas:

Tabla 7: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Usos y comentarios
BY4741	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	Cepa Silvestre, identificada comúnmente como S288C
BYpYES	Ura+, Leu+.	S288C transformada con el plásmido de expresión pYES-DEST52 (vector vacío)
BYpKAE1	Ura+, Leu+, KAE1++	S288C transformada con el plásmido de expresión pYES-DEST52 con la secuencia codificante de Kae1p clonada
ΔSUA5	SUA5- Δ 1::LEU2; Leu+	Nulo para <i>SUA5</i> , cassette de reemplazo contiene Leu+
ΔKAE1	KAE1- Δ 1::LEU2; Leu+	Nulo para <i>KAE1</i> , cassette de reemplazo contiene Leu+

ΔBUD32	<i>BUD32-Δ1::LEU2;</i> Ura+ Leu+	Nulo para <i>BUD32</i> , cassette de reemplazo contiene Leu+
ΔSUA5+Sua5	<i>SUA5-Δ1::LEU2;</i> Ura+ Leu+	Nulo para <i>SUA5</i> transformado con pYES-DEST52 que contiene la secuencia del ortólogo de Sua5 de <i>Drosophila</i>
ΔKAE1+Kae1	<i>kae1-Δ1::LEU2;</i> Ura+ Leu+	Nulo para <i>KAE1</i> transformado con pYES-DEST52 que contiene la secuencia del ortólogo de Kae1 de <i>Drosophila</i>
ΔBUD32+Prpk	<i>BUD32-Δ1::LEU2;</i> Ura+ Leu+	Nulo para <i>BUD32</i> , cassette de reemplazo contiene Leu+, transformado con pYES-DEST52 que contiene la secuencia del ortólogo de <i>BUD32</i> de <i>Drosophila</i> (Prpk)

Reactivos, soluciones y otros materiales

Reactivos

Los reactivos utilizados se describen en la tabla 8.

Tabla 8: Reactivos

Fabricante	Origen	Reactivo
Becton Dickinson and Co.	Franklin Lakes, Nueva Jersey. EE.UU	Peptona, Bactotripton y extracto de bacto-levadura
Bio-Rad	California, EE.UU.	DC™ Protein Assay
Calbiochem	Darmstadt. Alemania	Anti-conejo IgG-HRP (DC03L) Anti-ratón IgG-HRP (DC02L) Tween-20
Cell Signaling	Danvers, Massachusetts. EE.UU	Anti-Caspasa 3 clivada policlonal conejo (9661); Anti-Fosfo S6K policlonal conejo; Anti-Fosfo 4E-BP policlonal conejo; Anti-Fosfo Akt (S505) policlonal conejo; Anti-Fosfo eIF2 α policlonal conejo
Corn Products	Santiago. Chile	Dextrosa monohidratada
Dako	Glostrup. Dinamarca	Anti-Bromodeoxiuridina monoclonal ratón (M0744)
Fermentas	Glen Burnie, Maryland. EE.UU	dNTP, MgCl ₂ , marcador de peso preteñido para proteínas "Page Ruler Plus" (SM1811), agarosa grado analítico, enzimas de restricción, tampón de carga 6X para ADN para electroforesis en agarosa
Insumos Químicos Nacionales	Santiago. Chile	Nipagin
Invitrogen	Carlsbad, California. EE.UU	DNA polimerasa Taq Platinum® 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).

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
Lefersa	Santiago, Chile	Levadura fresca y congelada
Life Technologies		miRVANA kit de extracción de RNAs pequeños (AM1560) y BrightStar BioDetect Kit (AM1930)
Merck	Darmstadt, Alemania	Bromuro de etidio, glicerol, isopropanol, Tween-20, paraformaldeído, ácido acético, EDTA
Mont Blanc	Victori, Chile	Harina de trigo sin polvos de hornear
Omega Bio-Tek	Norcross, Georgia. EE.UU	Minipreps extracción plásmidos (E.Z.N.A.)
Pierce	Rockford, Illinois. EE.UU	Cocktail Inhibidor de proteasas y fosfatasas, West Pico ECL y West Femto ECL (enhanced chemiluminescence)
Promega	Madison, Wisconsin. EE.UU	Wizard SV Gel and PCR Clean-up (A1330), RT-PCR Improm II (A3800).
Roche	Indianapolis, Indiana. EE.UU	DIG Easy Hyb (1160355800)
Sanderson	Santiago, Chile	Agua bidestilada libre de nucleasas
Santa Cruz Biotech	Santa Cruz, California, EE.UU	Anti-actina monoclonal ratón y Anti-HA monoclonal ratón
Sigma	St Louis, Missouri, EE.UU	Aceite Halocarbon 700, Triton X-100, Faloidina-TRITC (P1951), anti-HA conejo, kanamicina, persulfato de amonio.
TCL	Santiago, Chile	Algodón hidrofóbico
Upstate	Upstate, New York. EEUU.	Anti-Fosfo Histona H3 policlonal conejo
Vector Labs	Burlingame, California, EEUU	Medio de montaje para fluorescencia (Vectashield)
Watt's	Santiago, Chile	Néctar de manzana y uva
Winkler	Santiago, Chile	Fenol, NaCl, CaCl ₂ , ampicilina, mezcla acrilamida:bisacrilamida (29:1), albúmina de suero bovino (BSA), TEMED.

Soluciones

Las soluciones utilizadas en procedimientos de biología molecular se describen en la tabla 9; para otros métodos se indican en la tabla 10.

Tabla 9: Soluciones para biología molecular

Solución	Composición y características
Medio Luria-Bertani	Bacto-triptona 10 g/L, extracto de bacto-levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L
Agar Luria-Bertani	Medio LB + agar-agar 15 g/L
Medio SOC	Bacto-triptona 20 g/L, extracto de bacto-levadura 5 g/L, 0.5 g/L NaCl, 1 g/L MgCl ₂ anhidro, 3,6 g/L glucosa
TAE 50X	242 g/L Tris; 57,1 mL/L ácido acético concentrado; 200 mL/L EDTA 0,5M
EDTA 0,5 M	EDTA 0,5 M pH 8

Tabla 10: Soluciones para otros métodos

Solución	Composición y características
PBS 10X	(NaCl 1,3 M, Na ₂ HPO ₄ 0,07 M, NaH ₂ PO ₄ , 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%, H ₃ PO ₄ 42,5%)
Tampón de carga para proteínas 6X	Tris-HCl 375 mM, SDS 9%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,03%, DTT 0,6 M
Tris-HCl 1M pH 8,8	Solución acuosa 1M tris-(hidroximetil)-aminometano, pH ajustado a 8,8
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	Solución acuosa 1,5M tris-(hidroximetil)-aminometano, pH ajustado a 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%	TBS 1X, 0,1% Tween-20
Persulfato de amonio 10%	Solución persulfato de amino al 10% p/v

Otros materiales y utensilios usados en el trabajo se indican en la tabla 11.

Tabla 11: Otros materiales y utensilios

Material o utensilio	Fabricante	Procedencia
Pinzas N°5 no magnéticas	A. Dumont & Fils	Suiza
Sistema para separación por electroforesis de proteínas e inmunoblot.	BioRad	California. EE.UU
Porta objetos 26x76mm 1mm de espesor.	Delta Lab	Barcelona. España
Capilares de vidrio borosilicato 1,00 mm O.D. x 0,78 mm I.D.	Hardvard Apparatus	Holliston, Massachusetts. EEUU
Placas plásticas de 96 pocillos	Orange Scientific	
Películas Rayos-X Super HR-U 100 NIF.	Fuji Film	Tokio. Japón
Cubreobjetos 24x24mm.	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Alemania
Esmalte de uñas transparente.	Maybelline	New York. EEUU

Métodos de biología molecular

Generación de bacterias quimiocompetentes

Bacterias fueron crecidas a 37°C en medio LB en condiciones aeróbicas toda la noche, este cultivo fue utilizado como pre-inóculo para hacer una dilución 1:50 en el mismo medio de cultivo. Éste fue crecido por 3 horas a 37°C a 200 rpm o hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5. Las bacterias fueron centrifugadas a 6000Xg por 5 minutos, lavadas con agua estéril y resuspendidas en una solución de CaCl₂

0.1 M 10% v/v glicerol para almacenarlas a -80°C en alícuotas de 100 μL .

Transformación bacteriana.

Se agregó directamente a 50 μL de bacterias quimiocompetentes descongeladas, resuspendidas en CaCl_2 100 mM, 0.2 – 1 μg del vector a transformar según corresponda. 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 SOC a 37°C durante 30 minutos con agitación, luego se centrifugaron y plaquearon en agar Luria con antibiótico. Se incubaron toda la noche a 37°C .

Medios y condiciones de cultivo bacteriano.

Bacterias XL-1 quimiocompetentes se cultivaron a 37°C en forma aeróbica en medio Luria-Bertani (LB). También se realizó cultivos en agar Luria (AL). La concentración de trabajo de los antibióticos fue 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ampicilina (amp) y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamicina (kan)

PCR de colonias.

Para corroborar sentido de orientación del inserto clonado, se realizó una reacción de polimerasa en cadena (PCR) de colonias con el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O	18
Tampón 10X	2
MgCL ₂ (25 mM)	0.3
dNTPs (10 mM)	0.2
Partidor 1 (100 mM)	0.2
Partidor 2 (100 mM)	0.2
DNA Taq Polimerasa	0.1
Volumen total	20

Los volúmenes corresponden a una reacción, se realizó al menos una por colonia y un control negativo. Los partidores utilizados para estas reacciones son universales y corresponden a M13F y M13R. Para agregar el DNA templado a estos 10 μL totales, se seleccionó una colonia directamente desde la placa y a la vez se preparó una réplica de las colonias en otra placa de agar Luria 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%.

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 toda la noche en medio líquido Luria 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 temperatura ambiente, se añadieron 350 μL de solución neutralizadora y se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente. 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.

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 GelRed (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.

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.

Clonamiento convencional por ligación utilizando ligasa T4

Se digirieron 1 μg de DNA (inserto o vector) con la combinación de enzimas de restricción correspondiente. Se purificaron los fragmentos tras su electroforesis en geles de agarosa. Los productos obtenidos fueron cuantificados para luego ser mezclados en proporción 1:3 (vector:inserto) junto con ligasa T4 según las instrucciones del fabricante (New England BioLabs). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por al menos 8 horas y luego fue utilizada para transformar bacterias quimiocompetentes. Los clones positivos se identificaron por PCR.

Clonamiento direccional mediante tecnología Invitrogen Gateway

A partir de cDNA previamente sintetizado desde RNA total de *Drosophila* se amplificó por PCR utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad, se amplificó el producto de interés. Una vez confirmado la identidad de éste, se incubó con el vector de entrada (pENTR) según las proporciones:

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	0,5-4 μL
Solución Salina	1 μL
Vector TOPO	1 μL
Agua estéril	Hasta completar 5 μL
Volumen final	5 μL

Luego se transformaron 2 μL de la muestra en bacterias quimiocompetentes. De las colonias positivas se extrajo el vector para ser secuenciado. Una vez

confirmada su secuencia, el vector se incubó con el vector de destino en presencia de la recombinasa en las siguientes proporciones:

Reactivo	Volumen
Clon pENTR positivo	1 μ L
Vector de destino	1 μ L
LR Clonase II	2 μ L
Buffer TE, pH 8	Hasta 8 μ L
Volumen final	8 μL

Inmediatamente después se transformaron 2 μ L de la muestra. De las colonias positivas se extrajo el vector para ser utilizado

Secuenciación de construcciones

Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmidial y se enviaron a Macrogen (Seúl, Corea) para su secuenciación utilizando partidores universales (M13). La concentración de las minipreparaciones se estimó utilizando un equipo Nanodrop (Nanophotometer, Implen). La información de las secuencias obtenidas se analizó con SnapGene 1.1.3 (GSL Biotech LLC)

Protocolos experimentales para *Drosophila*

Condiciones de cultivo

Los animales utilizados en todos los experimentos fueron crecidos a 25°C, a menos que se indique de otra forma, en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con harina de trigo (50 g/L), levadura fresca (100 g/L), agar-agar (11 g/L), dextrosa monohidratada (80 g/L), ácido propiónico (6 mL/L) y Nipagin (1,56 g/L). A esta temperatura, el ciclo de vida de *D. melanogaster* toma alrededor

de 10 días. Por otra parte, el almacenamiento a largo plazo de las cepas se realiza a 17°C en las mismas condiciones.

Generación de animales mosaico en la configuración FLP-out

Todas las cepas fueron generadas por cruces estándar. La progenie de determinados cruces fue sometida a un golpe de calor (37°C) por 7 minutos 36 ± 12 horas luego del depósito del huevo. Larvas estadio III que poseían clones (células GFP+) fueron disectadas y procesadas para ser visualizadas por microscopía confocal.

Inducción de clones mitóticos

Todas las cepas fueron generadas por cruces estándar. La progenie de determinados cruces fue sometida a un golpe de calor (37°C) por 1 hora 6 ± 6 horas luego del depósito del huevo. Hembras de los cruces (GFP+) fueron disectadas y procesadas para su visualización por microscopía confocal.

Extracción de RNA total de larvas.

Se homogeneizaron 5 larvas de estadio 3 en tubos de centrífuga de 1,5 mL en 100 μ L Trizol en hielo. Se centrifugó a $13.670 \times g$ durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 20 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a $9.500 \times g$ durante 15 minutos a 4°C, se transfirió la

fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron 50 μ L 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 μ L etanol 75%, se dejó secar a temperatura ambiente y el RNA se resuspendió en 10 μ L de agua libre de RNAsa. El RNA almacenó a -80°C hasta su uso.

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 μ g de RNA total, 1 μ L partidores al azar y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 5 μ L. 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 μ L tampón de reacción 5X, 3 μ L MgCl₂, 1 μ L dNTPs, 1 μ L RNAsin, 1 μ L transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas para completar un volumen total de 15 μ L. Se agregaron estos 15 μ L de mezcla de RT a los 5 μ L de mezcla de RNA con partidores y se realizó el programa recomendado por el fabricante.

Procesamiento no-convencional del mRNA de Xbp-1

Para detectar el procesamiento del mRNA de xbp-1 se utilizaron los siguientes partidores: 5'-CAGATGCATCAGCCAATCCAAC-3' y 5'-ACAACTTTCCAGAG TGAG-3' y el programa utilizado fue el siguiente: 2 min. de denaturación 95°C, luego 1min. de denaturación 95°C, 50 seg. de hibridación

56°C, 50 seg. de elongación 72°C por 35 ciclos y 10 min. finales de elongación a 72°C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa-1000 al 2,5% y visualizados con tinción GelRed.

Extracción de RNAs pequeños a partir de larvas

Se recolectaron las larvas de los genotipos a analizar. Fueron lavadas profusamente con agua destilada para eliminar restos de comida. Una vez limpias fueron enjuagadas con tampón acetato de sodio 50 mM pH5.0. Se elimina el líquido y se agrega 3 ml del mismo tampón por cada gramo de animales. En hielo se homogenizan completamente las larvas. Luego se agregó un volumen de fenol saturado en acetato de sodio 50 mM pH5.0. Las muestras se mantuvieron en agitación constante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se centrifugaron por 20 min a 13.000Xg y se recuperó el sobrenadante al cual se le agregó un volumen de fenol saturado ácido. Se agitaron por 2 minutos. Se centrifugaron nuevamente por 20 min a 13.000Xg y se recuperó el sobrenadante en un tubo bueno. Se agregó un volumen de cloroformo y se agitó por 2 minutos. Se centrifugó a 13.000Xg a TA por 20 minutos y se recuperó la fase acuosa (superior). A la solución recuperada se le agrega 0.2 volúmenes de NaCl 5M (concentración final 1M NaCl), se mezcló y se adicionó 0.2 volúmenes de isopropanol se mezcló e incubó por 1 hora a -20°C. Luego se centrifugó a 13.000Xg a 4°C por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezclaron e incubaron a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 13.000Xg a 4°C, se descartó el

sobrenadante y el precipitado se lavó con un volumen de etanol 70%. Se centrifugaron a 13.000Xg a 4°C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, invirtiendo el tubo sobre un trozo de papel absorbente. Luego el pellet fue resuspendido en 50-100 µL de agua libre de nucleasas. El material fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Ensayos de hibridación positiva en ausencia de t⁶A (HPA t⁶A)

En membranas neutras Biodyne A (Thermo Scientific) se inmoviliza 1 µg de RNAs pequeños extraídos anteriormente exponiendo las membranas 3 minutos a la luz UV emitida por un transiluminador a su máxima potencia. Luego de haber inmovilizado el RNA a la membrana, ésta se deja bloqueando con solución Easy Hyb (Roche) por una hora a 42 °C con agitación constante, considerando 0,5 mL de solución por cada cm² de membrana que se esté utilizando. Se agregó la sonda específica (tabla 12) diluida 1:10.000 en Easy Hyb para incubar toda la noche a 42°C con agitación constante. Se lavó 3 veces por 10 minutos con 2X SSC 0,2%SDS y luego 3 veces por 5 minutos con Wash Buffer del kit BrightStar (Ambion). La membrana incubada con la sonda ACL fue sometida a 2 lavados extra, el primero a 55°C y el restante a temperatura ambiente. Se bloqueó con Blocking Buffer por 30 minutos a temperatura ambiente, se descartó esta solución y fue reemplazada por igual volumen de la misma solución fresca para incubar 15 minutos extra a temperatura ambiente. Se agregó el reactivo Strep-AP (Streptavindina-Fosfatasa alcalina) diluido 1:10.000 en *Blocking Buffer* y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente con agitación

constante. Las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 min a temperatura ambiente con *Wash Buffer*. Acto seguido se hizo 3 lavados de 5 minutos cada uno con *Assay Buffer* para luego revelar utilizando el reactivo incluido en el kit que genera quimioluminiscencia en presencia de fosfatasa alcalina, la que se detectó utilizando films radiológicos (AGFA).



Tabla 12: Sondas utilizadas en ensayos HPA^{t6}A

Sonda		Secuencia
<i>Drosophila</i> tRNA ^{Met} ACL	sonda	/5BiosG/TC TGG GTT ATG GGC CCA GC
<i>Drosophila</i> sonda tRNA ^{Met} TL		/5BiosG/GA GCA AGG TTT CGA TCC TCG

*5BiosG: corresponde a la presencia de biotina en el 5'

Extracción de proteína total de larvas

Se colectaron al menos 10 larvas en PBS 1X frío (en hielo) y luego se homogenizaron en 100 µL de tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Pierce, USA) utilizando un pistilo plástico. El volumen de tampón fue escalado según el tamaño de los animales utilizados. Se centrifugaron a 14000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado en un segundo tubo de 1.5 mL y almacenado 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.

Análisis de extractos proteicos mediante Western blot

Los extractos proteicos fueron preparados en tampón de carga para electroforesis de proteínas, 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. Se cargaron entre 100 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 350 mA durante 2 horas en tampón de transferencia utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro 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 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo deseado diluido en 1% a 5% leche o BSA en TTBS 0,1% toda la noche a 4°C con agitación constante (tabla 13). Se lavó 3 veces con TTBS 0,1% con agitación y se incubó con el anticuerpo secundario diluido en 1% a 5% (tabla 13) leche o BSA en TTBS 0,1% durante 2 horas 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 éste, se incubó la membrana con partes iguales de los reactivos A y B del kit de ECL (Pierce, Super West Pico/Femto ECL (enhanced chemiluminiscence)) durante 3 minutos. Luego se eliminó el exceso de reactivo de la membrana, y se coloca entre láminas de plástico. Las películas para rayos X se expusieron entre 1 – 20 minutos y fueron

reveladas utilizando máquina para revelado (AGFA).

Tabla 13: Anticuerpos primarios y secundarios usados en Western blot

Anticuerpo	Bloqueo	Dilución
Anti- β -actina (Santa Cruz Biotech) ratón, monoclonal	5% leche en TTBS 0,1%	1:1000
Anti-Fosfo Akt (Ser505) (Cell Signaling)	5% BSA TTBS 0.1%	1:500
Anti-Akt (Cell Signaling)	5% BSA TTBS 0.1%	1:500
Anti-Fosfo S6K (Cell Signaling)	5% BSA TTBS 0.1%	1:500
Anti-S6K (Cell Signaling)	5% BSA TTBS 0.1%	1:500
Anti-Fosfo eIF2 α	5% BSA TTBS 0.1%	1:500
Anti-LC3b	5% BSA TTBS 0.1%	1:1000
Anti-IgG de conejo-HRP (Calbiochem)	5% BSA TTBS 0.1%	1:1000
Anti-IgG de ratón-HRP (Calbiochem)	5% BSA TTBS 0.1%	1:1000

Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Para cada experimento, se disectaron bajo lupa 10-15 larvas de estadio tres en PBS 1X utilizando pinzas, tardando como máximo 30 minutos y manteniendo las carcasas en hielo. Luego las carcasas se fijaron en 500 μ L de PFA (paraformaldehído) 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, 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 14) diluido en solución de bloqueo a 4°C toda la noche sin agitación. Se lavaron 4 veces durante 20 minutos cada una, se bloquearon una hora y se incubaron con anticuerpo secundario (tabla 14) diluido en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente 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 15). Finalmente se lavaron 3 veces durante 15 minutos con solución de lavado. Los tejidos de interés 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 se capturaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Se analizaron utilizando LSM Image Browser Versión 4.2.0.121, ImageJ y Adobe Photoshop CS5 Extended.

Tabla 14: Anticuerpos primarios y secundarios inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Origen	Dilución
Anti-Fosfo Histona H3, conejo policlonal	Upstate	1:500
Anti-Caspasa 3 clivada: conejo, policlonal	Cell Signaling	1:100
Anti-Bromodeoxiuridina: ratón monoclonal	Dako	1:200
Anti-epítipo HA: ratón, monoclonal	Santa Cruz	1:500
Anti-epítipo HA: conejo, policlonal	Sigma	1:500
Anti-IgG ratón AlexaFluor 488	Invitrogen	1:200
Anti-IgG ratón AlexaFluor 568	Invitrogen	1:200
Anti-IgG conejo AlexaFluor 488	Invitrogen	1:200
Anti-IgG conejo AlexaFluor 568	Invitrogen	1:200

Tabla 15: Otras tinciones

Tinte	Origen	Dilución
Faloidina-TRITC	Sigma	1:200
TO-PRO3 ioduro 642	Invitrogen	1:200

Centrifugación en gradiente de polisomas

Larvas de los fenotipos deseados fueron recolectadas y lavadas 3 veces con agua destilada para luego ser lisadas en tres volúmenes de tampón de lisis de polisomas (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 250 mM, 1% Triton-X 100, 0,5% desoxicolato de sodio, 100 µg/mL ciclohexamida, 1mg/mL heparina, 1X cóctel inhibidores de proteasa, PMSF 2,5 mM, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, 200 U/mL Ribolock (Fermentas). Para identificar la fracción ribosomas, los animales fueron lisados con buffer de lisis de ribosomas (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, 1% Triton-X 100, 0,5% desoxicolato de sodio, 100 µg/mL ciclohexamida, 1mg/mL heparina, 1X cóctel inhibidores de proteasa, PMSF 2,5 mM, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, 200 U/mL Ribolock (Fermentas). Los lisados fueron centrifugados por 10 min a 15000 x g

para recuperar los sobrenadantes que fueron reservados en hielo hasta su uso. Sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 15-45% preparada en (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 250 mM, 1% Triton-X 100, 0,5% desoxicolato de sodio, 100 µg/mL ciclohexamida, 1mg/mL heparina, 1X cóctel inhibidores de proteasa, PMSF 2,5 mM, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, 200 U/mL Ribolock (Fermentas) fueron cargados los correspondientes lisados (400 µg de RNA total) y ultracentrifugados a 110000 x g por 4 horas utilizando tubos de 11 mL (Beckman-Coulter). El perfil de polisomas fue obtenido utilizando un detector UV continuo midiendo la absorbancia a 260 nm.

Citometría de flujo

Los experimentos de citometría de flujo fueron realizados según (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 µL de Tripsina/EDTA 10X (Sigma) y 10 µM de DRAQ5 (Biostat, tinción de DNA en rojo lejano, 1 µL). La disociación de las células se llevó 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 µm, 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).

Análisis del tamaño celular en alas adultas.

Se fijaron hembras adultas con el genotipo de interés durante al menos dos horas en etanol 96% a temperatura ambiente. Las alas izquierdas se disectaron y fueron montadas para análisis microscópico en portaobjetos con ácido láctico:etanol (1:1). De estos órganos se analizó 3 parámetros: el área total del ala, la del compartimiento posterior, del anterior y el número de células en un área definida (densidad celular) (Anexo 4). Las alas montadas se visualizaron con un microscopio Olympus y fueron fotografiadas con una cámara digital Motic 2500.

Se midió las áreas del ala completo o de cada uno de los compartimientos según correspondió utilizando Adobe Photoshop Extended CS5. Cuando se midió el área de los compartimientos, se hizo una proporción posterior:anterior para mostrar cambios en el área del primero. 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 a un aumento mayor. El número de células se determinó contando los tricomas en Adobe Photoshop CS5. Se graficaron los promedios. Para ambos parámetros cuantificados se realizaron ANOVA. Se consideró un valor $p < 0,005$ para la significancia.

Estimación del volumen larvario

Se calculó el volumen de al menos 50 larvas como una revolución de un elipsoide con la fórmula $\frac{4}{3}\pi ab^2$, donde a es el largo y b el ancho de la larva.

Obtención y análisis de moscas transgénicas.

Para el desarrollo de este trabajo, fue necesario generar diversos animales transgénicos por el método de la transformación de la línea germinal descrito por Spradling y Rubin (Rubin y Spradling 1982). El sistema de transformación binario consiste en dos plásmidos que deben ser co-inyectados. Uno codifica la transposasa P, denominado "pHelper", y el otro que contiene el elemento P, el transgen y un marcador de selección dominante, indispensable para identificar los eventos de inserción. 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. La mezcla de pH-Stinger-tRNA^{mut} y pHelper a inyectar fue la siguiente: 1,5 µg pH-Stinger-tRNA^{mut} con 0,7 µg pHelper. Se llevó a un volumen final de 90 µL con H₂O, se añadieron 10 µL acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µL etanol. La mezcla se incubó a -20°C toda la noche 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.

Microinyección de embriones

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 decorionaron 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 animales transgénicos se seleccionaron por estrategias genéticas estándar.

RESULTADOS

1. Establecer que *pütrü*, el ortólogo de *KAE1*, es necesario para la síntesis de t⁶A en *Drosophila*

1.1. Identificación del ortólogo de *KAE1* en *Drosophila melanogaster*

La modificación t⁶A es universalmente conservada, está presente en prácticamente todos los organismos que se conocen, salvo en algunas bacterias que llevan un estilo de vida parasítico (Machnicka y col. 2013, Grosjean y col. 2014). Asimismo la maquinaria requerida para su síntesis también es conservada (Thiaville y col. 2015). *D. melanogaster* no es la excepción, esta modificación se encuentra presente en los tRNAs que interactúan con codones del tipo ANN (Silverman y col. 1979). Como primera aproximación para identificar el ortólogo de *KAE1* en *Drosophila* utilizamos la herramienta BLASTP (Mount 2007) ingresando la secuencia de la proteína de *S. cerevisiae* S288c (GeneBank NP_012964.2). La búsqueda arrojó una proteína con 60% de identidad, un porcentaje de cobertura de 95% y un *E-value* de 5×10^{-154} . El alto grado de identidad sugiere una relación de ortología entre ellas. La proteína encontrada es codificada por un *locus* sin nombre, identificado sólo por el código CG4933 que se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3L) en la posición citológica

72E2 (<http://flybase.org/reports/FBgn0036615.html>). Se predice que produce un único transcrito con 3 exones y codifica para una proteína de 347 amino ácidos (Figura 5A) que un análisis hecho en InterPro muestra la presencia de un dominio tipo-Gcp que actualmente se acepta está relacionado con la síntesis de t⁶A (Quevillon y col. 2005), posicionándola como miembro de la familia Kae1/YgjD (Figura 5B). De manera complementaria se realizó un alineamiento múltiple utilizando distintos ortólogos de *KAE1* provenientes de diversos organismos y que pertenecen a la familia Kae1/YgjD. Todos las proteínas analizadas presentan una extensa conservación en elementos de sus estructuras secundarias (Anexo 5, Figura S7), asimismo se aprecia la conservación de los amino ácidos necesarios para la actividad de las enzimas (Mao y col. 2008). La conservación de secuencia y estructura sugieren fuertemente que *CG4933* corresponde al ortólogo de *KAE1* en *D. melanogaster*.

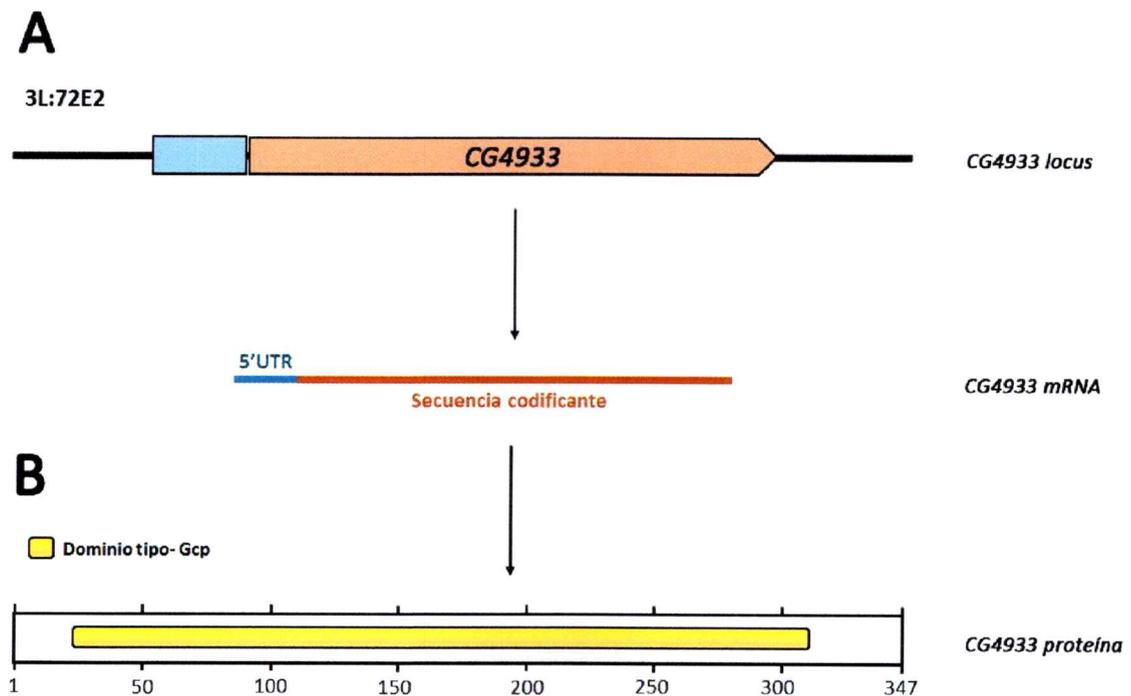


Figura 5: Representación esquemática del locus *CG4933*.

(A) Se representa la estructura del *locus CG4933*, ubicado en 3L:72E2. Se muestra el gen que da origen a un único transcrito (el 5' UTR se presenta en azul y la secuencia codificante en rojo). (B) La proteína codificada por *CG4933* presenta un dominio tipo-Gcp, indicado en amarillo.

1.2. Complementación inter-especie

Para determinar si hay conservación entre ortólogos, realizamos experimentos de complementación funcional inter-especie. Levaduras mutantes para *KAE1* que presentan un crecimiento lento tanto en medio sólido (Figura 6A, fila central) como en líquido (Figura 6B, curva de color rojo) se transformaron con un vector de expresión (pDEST52) en el cual estaba clonada la secuencia codificante de *CG4933* (Figura 6A y B, última fila y curva verde, respectivamente). Estas cepas fueron cultivadas junto con células control en medio sólido y líquido respectivamente para comparar su velocidad de crecimiento. En ambas condiciones, el crecimiento defectuoso pudo complementarse de manera parcial pero significativa. De manera adicional, utilizando el sistema Gal4/UAS se expresó en el ala de *Drosophila* un invertido repetido que activa el fenómeno de RNA de interferencia (RNAi) (Misquitta y Paterson 1999) específico contra el mRNA de *CG4933* (Anexo 6, Figura S8). El *driver* utilizado en estos experimentos fue *engrailed-Gal4* (*en>Gal4*) que expresa Gal4 en el compartimiento posterior del disco imaginal de ala, de tal manera que los efectos causados por el silenciamiento fueron evaluados en las alas de animales adultos (Detalles de morfología de este órgano en Anexo 4, Figura S6). El silenciamiento de *CG4933* generó una disminución cercana al 40% en el tamaño del sector D del ala (Figura 6C, área color verde). Este fenotipo pudo ser parcialmente rescatado por la expresión de *KAE1* (Figura 6C, ala inferior). En conjunto los resultados apoyan que existe una conservación funcional entre *CG4933* y *KAE1*.

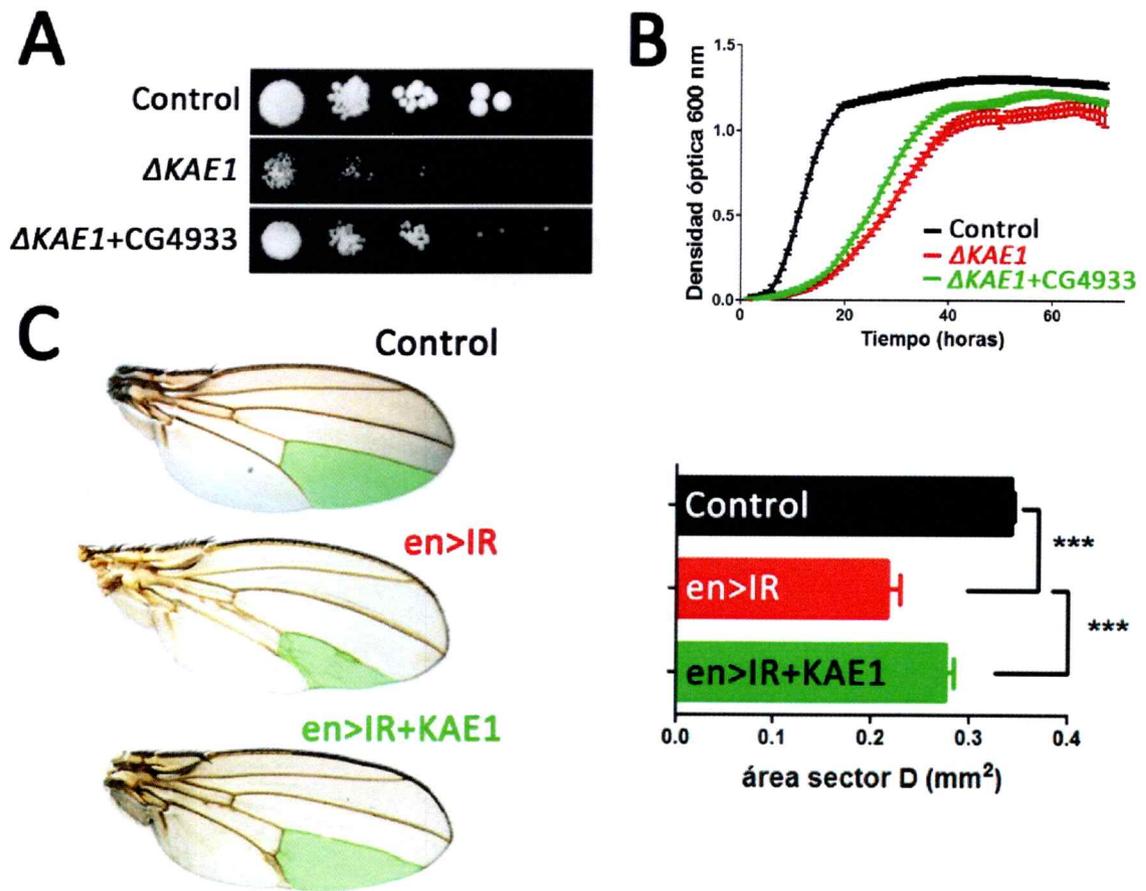


Figura 6: Conservación funcional entre *CG4933* y *KAE1*

(A) Levaduras crecidas en medio sólido haciendo diluciones seriadas de izquierda a derecha en un factor de 10. Se compara células control con las mutantes nulas para *KAE11* ($\Delta KAE1$) y las mismas, expresando *CG4933* ($\Delta KAE1+CG4933$). El mismo experimento de complementación fue realizado en medio líquido (B), las cepas correspondientes se indican con un código de colores ($n=10$, $p<0.005$). En *Drosophila* utilizando el sistema Gal4/UAS se silenció *CG4933* en el compartimiento posterior de ala ($en>IR$, imagen central) y simultáneamente se expresó *KAE1* ($en>IR+KAE1$, parte inferior). El área del sector D fue cuantificada ($n=50$, $***p<0.005$).

1.3. La expresión de CG4933 en levaduras mutantes para *KAE1* no es capaz de reestablecer la síntesis de t⁶A

Considerando que se observa un rescate parcial del fenotipo de la falta de función de *KAE1*, nos preguntamos si realmente la expresión de CG4933 era capaz de reestablecer la síntesis de t⁶A en levaduras mutantes para *KAE1*. Además hicimos extensivo el análisis a otras enzimas que participan en la síntesis de esta modificación como son *BUD32* (El Yacoubi y col. 2011) y *SUA5* (El Yacoubi y col. 2009). Se extrajeron tRNAs de levaduras control, mutantes para *KAE1*, *BUD32*, *SUA5* y mutantes que expresan el ortólogo correspondiente de *Drosophila*. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron sometidos a digestión y analizados por HPLC (El Yacoubi y col. 2009, El Yacoubi y col. 2011). De manera sorprendente, en las levaduras mutantes rescatadas con CG4933 no se observa un restablecimiento de los niveles silvestres de t⁶A (Figura 7A). Por el contrario al rescatar los mutantes para *SUA5* con el ortólogo de *Drosophila*, se observó un pico cercano a los 24 minutos, correspondiente a esta modificación (Figura 7B). Un escenario similar a lo que ocurre para *KAE1* se observó en las levaduras mutantes para *BUD32* y rescatadas con *Prpk* (Figura 7C). En el Anexo 7 (Figura S9) se muestran los fenotipos de las levaduras mutantes para *SUA5* y *BUD32* complementadas con sus contrapartes provenientes de *Drosophila*.

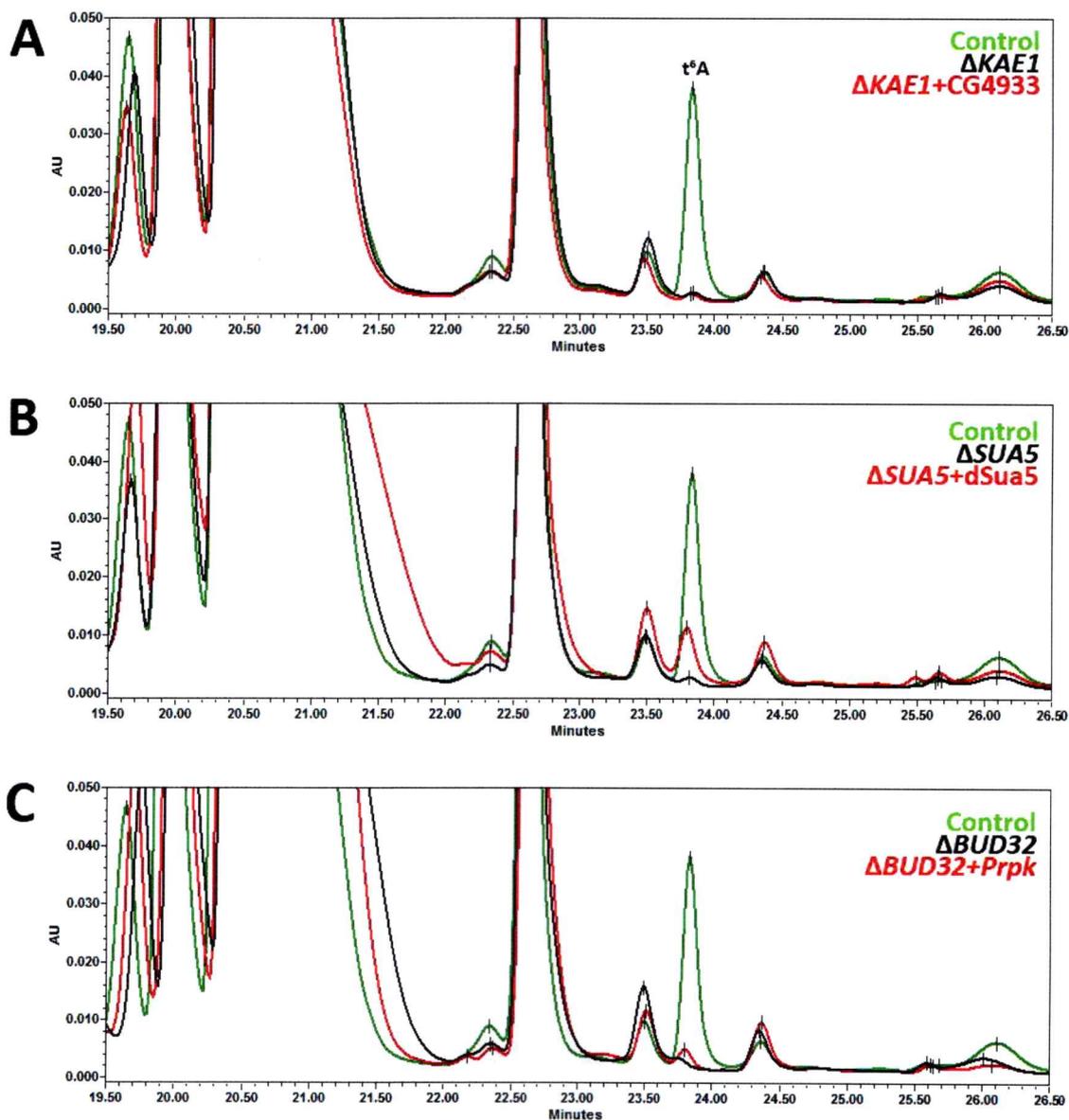


Figura 7: Detección por HPLC de t^6A en levaduras mutantes complementadas con ortólogos provenientes de *Drosophila*

Cromatogramas representativos de un estándar de t^6A o mezclas de nucleósidos de tRNAs provenientes de levaduras mutantes ($\Delta KAE1$, $\Delta SUA5$ y $\Delta BUD32$) complementadas con el ortólogo de *Drosophila* correspondiente ($\Delta KAE1+CG4933$, $\Delta SUA5+dSua5$ y $\Delta BUD32+Prpk$). Los cromatogramas son representativos de 3 experimentos independientes para cada condición ensayada.

Los resultados sugieren que CG4933 es capaz de rescatar la falta de *KAE1* en levadura, sin embargo esto no se ve reflejado en recuperar los niveles de t⁶A. Una explicación es que CG4933 pueda tener otra función distinta a la síntesis de la modificación. Algo que también ocurre con Prpk. Otra explicación es que ambas proteínas requieren a su compañera de la misma especie, recordemos que forman el núcleo catalíticamente activo del complejo KEOPS/EKC (Mao y col. 2008). Por otro parte, también debemos considerar que los niveles y/o patrón de expresión de los ortólogos podrían no ser suficientes para recuperar los niveles de t⁶A para el caso de mutantes de *KAE1* y *BUD32*, contrario a lo que ocurre con los de *SUA5*.

1.4. Detección indirecta de t⁶A

La pregunta si CG4933 es necesario para la síntesis de t⁶A en *Drosophila* sigue abierta y en el siguiente apartado se buscó dar una respuesta a este punto. Para establecer esta función, necesitamos mostrar que animales mutantes para CG4933 presentan cambios en la proporción de tRNAs modificados con t⁶A, que se encuentra en posición 37, ubicada en el brazo del anti-codón (Figura 8A). Para detectar t⁶A empleamos una metodología indirecta basada en la hibridación de dos sondas específicas, la primera se une a la región del tRNA iniciador donde se encuentra t⁶A (ASL; *anticodon stem loop*), mientras que la segunda (TL; *T-loop*) lo hace en una región donde la hibridación no se ve afectada por esta modificación y se utiliza como un control de carga (Figura 8A). En relación a la

sonda ASL, la presencia de la modificación es capaz de interferir en la interacción entre la sonda y el tRNA debido a su estructura voluminosa. Así, la interacción Watson-Crick entre un tRNA sin modificación y la sonda es máxima, observándose la mayor intensidad de señal. Ahora, cuando la modificación está presente, la interacción se ve disminuida, repercutiendo en la intensidad de señal obtenida (Figura 8B). Denominamos a esta técnica hibridación positiva en ausencia de t⁶A (HPAt⁶A). Para poner a prueba este razonamiento, se purificó tRNAs desde levaduras control y mutantes para *SUA5*, otra enzima necesaria para la síntesis de t⁶A; se ha mostrado que dichas células mutantes carecen de ésta (El Yacoubi y col. 2009) (Figura 7B). En los tRNAs provenientes de mutantes para *SUA5*, se observa un aumento en la intensidad de la señal, comparándola con la obtenida de los tRNAs provenientes de las células control. Los resultados obtenidos (Figura 8C) están de acuerdo al razonamiento explicado y muestran que existe una estrecha correlación entre la intensidad de señal y la presencia de t⁶A en los tRNAs.

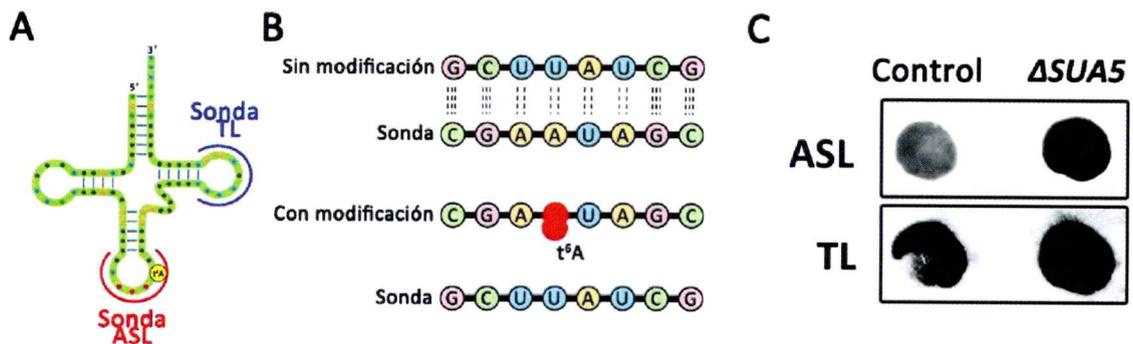


Figura 8: Hibridación positiva en ausencia de t⁶A (HPAt⁶A)

(A) Se muestra la estructura “hoja de trébol” de un tRNA en verde. Las sondas utilizadas están coloreadas en rojo (ASL) y azul (TL). (B) Principio en que se basa la técnica de hibridación (detalles en el texto). (C) Se utilizó 2 sondas que hibridan con el tRNA^{Arg} de *S. cerevisiae* (ASL y TL). Para este ensayo se utilizó tRNAs provenientes de una cepa control y otra que es nula para *SUA5* (Δ *SUA5*) La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

1.5. **CG4933 es requerido para la síntesis de t⁶A en *Drosophila***

Habiendo establecido y validado una metodología que permite la detección indirecta de t⁶A, extrajimos tRNAs de larvas de *Drosophila* y realizamos ensayos HPA t⁶A con sondas específicas que hibridan en dos regiones distintas del tRNA iniciador, ASL y TL siguiendo el razonamiento anteriormente expuesto y esquematizado (Figura 8). Poseemos dos cepas, ambas alelos mutantes para CG4933. De los tRNAs provenientes de animales mutantes para CG4933 se observó una señal significativamente más intensa que en los obtenidos de animales control (Figura 9B y C), indicativo de una mayor unión de la sonda debido a la falta de t⁶A en el tRNA iniciador. Los resultados muestran que CG4933 es necesaria para la síntesis de t⁶A en *Drosophila*.

En conjunto estos resultados muestran que CG4933 es el ortólogo de *KAE1* y que es necesario para la síntesis de t⁶A en *Drosophila*. Considerando que CG4933 no ha sido nombrado y el fenotipo que presentan los mutantes (Figura 11A), propongo nombrarlo *pütrü*, que en Mapudungún significa “pequeño”. Así que en el resto del trabajo a CG4933, lo llamaré *pütrü* (*ptu*).

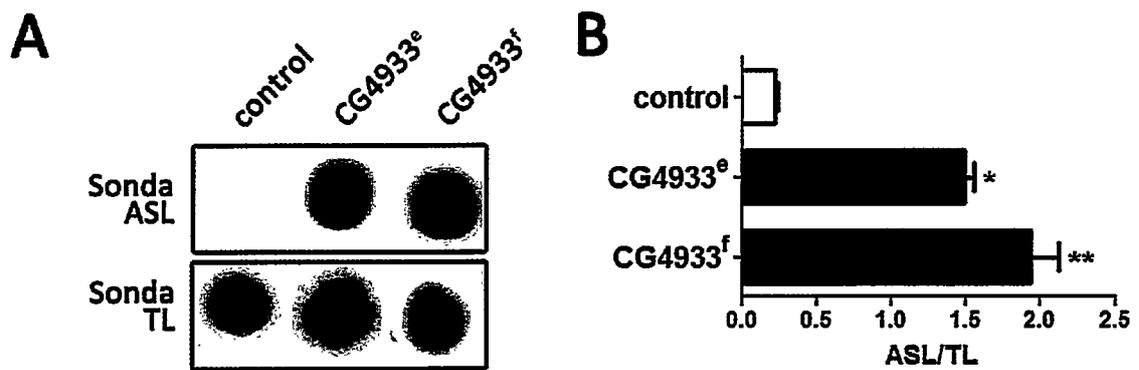


Figura 9: Mutantes para CG4933 presentan una disminución en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A

(A) Se muestran los spots obtenidos tras un ensayo HPA t⁶A realizado contra el tRNA iniciador de *Drosophila* utilizando las sondas ASL y TL (control de carga) que evidencia la ausencia de t⁶A en tRNAs provenientes de 2 alelos mutantes de CG4933 (CG4933^e y CG4933^f). En (B) se grafica una proporción entre la intensidad de la señal de ASL y TL (ASL/TL) (ANOVA n=3, p<0.005).

1.6. Prpk, el ortólogo de BUD32 en *Drosophila*, es necesario para la síntesis de t⁶A

Levadura mutantes para las enzimas encargadas de la síntesis de t⁶A presentan un problemas en sustentar su crecimiento (El Yacoubi y col. 2009, Daugeron y col. 2011, El Yacoubi y col. 2011). Asimismo nuestro laboratorio demostró en *Drosophila* que el silenciamiento de Prpk causó problemas de crecimiento celular (Ibar y col. 2013). Quisimos probar si también Prpk, ortólogo de BUD32, es necesario para la síntesis de t⁶A. Mediante ensayos de HPA^t6A se observó un aumento significativo en la señal obtenida para tRNAs provenientes de animales en los cuales Prpk fue silenciado de manera ubicua (Figura 10) de manera consistente con lo que se ha descrito en levadura.

En conjunto nuestros datos muestran que la maquinaria basal de síntesis de t⁶A esta conservada entre eucariontes unicelulares y metazoos.

∩

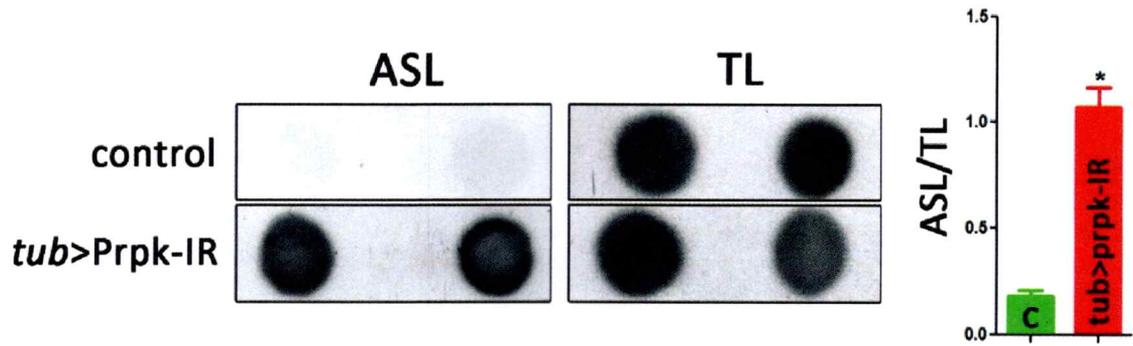


Figura 10: Prpk es necesaria para la síntesis de t⁶A

Ensayo HPA t⁶A realizado contra el tRNA iniciador de *Drosophila* que evidencia una disminución de t⁶A en tRNAs provenientes de animales en los cuales se ha silenciado de manera ubicua Prpk, el ortólogo de BUD32. Además se grafica una proporción entre la intensidad de la señal de ASL y TL (ASL/TL) (ANOVA n=3, p<0.005). El ensayo se muestra en duplicado.

2. Establecer que cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el tamaño celular y animal en *Drosophila melanogaster*

Una vez establecido que Pütrü se requiere para la síntesis de t⁶A en *Drosophila*, nos propusimos estudiar, en virtud de los resultados obtenidos en este trabajo y antes reportados por otros para levaduras (El Yacoubi y col. 2011), la posibilidad de que los niveles de tRNAs modificados con t⁶A sean un factor determinante del crecimiento celular y del organismo.

2.1. Caracterización de animales mutantes para *pütrü*

Están disponibles 2 cepas que tienen inserciones en el *locus* de *pütrü*. Una se encuentra en la región 5' no traducido y la otra en la secuencia codificante (Anexo 8, Figura S10). En los viales que se crecieron los animales mutantes se observó siempre pupas y adultos con presencia del cromosoma balanceador TM6b,Tb indicando que dichas mutaciones en homocigosis no permiten el desarrollo de los animales más allá de los estadios larvarios (información sobre genética de *Drosophila* se puede encontrar en el Anexo 2). Buscando larvas que no tuvieran el cromosoma balanceador, identificamos individuos homocigotos para la mutación. Para ambas cepas, se observó un tamaño menor que las contraparte control (Figura 11A). Expresamos la secuencia codificante de Pütrü de manera ubicua utilizando el *driver armadillo>Gal4* (*arm>Gal4*) en condiciones homocigotas para la mutación; esto rescató el fenotipo observado, mostrando que el fenotipo es debido a la falta de *pütrü*. Además cruzamos ambas cepas

entre sí y establecimos que no complementan, mostrando que son alelos mutantes del mismo gen (Figura 11A y B). No disponemos de anticuerpos que reconozcan a la proteína que *pütrü* codifica, por lo que detectamos su mRNA mediante RT-PCR. Mutantes homocigotos de ambas cepas, no presentaron el mRNA de *Pütrü* (Figura 11C). En la Figura 11D-E se muestra una comparación de glándulas salivales disectadas, después del mismo tiempo de desarrollo, desde animales control y mutantes homocigotos. La reducción del tamaño del tejido y de las células es evidente en los animales mutantes. En estos, no pudimos identificar tejido imaginal, no encontramos ninguno de los discos imaginales posiblemente debido a su reducido tamaño, o bien que estas estructuras no están presentes.

Los resultados en conjunto muestran que *Pütrü* es necesario para la síntesis de t⁶A y éste, tal como ocurre en *S. cerevisiae* (El Yacoubi y col. 2009, El Yacoubi y col. 2011) y otros organismos unicelulares (Perrochia y col. 2013), los tRNAs modificados con t⁶A son necesarios para sustentar el crecimiento.

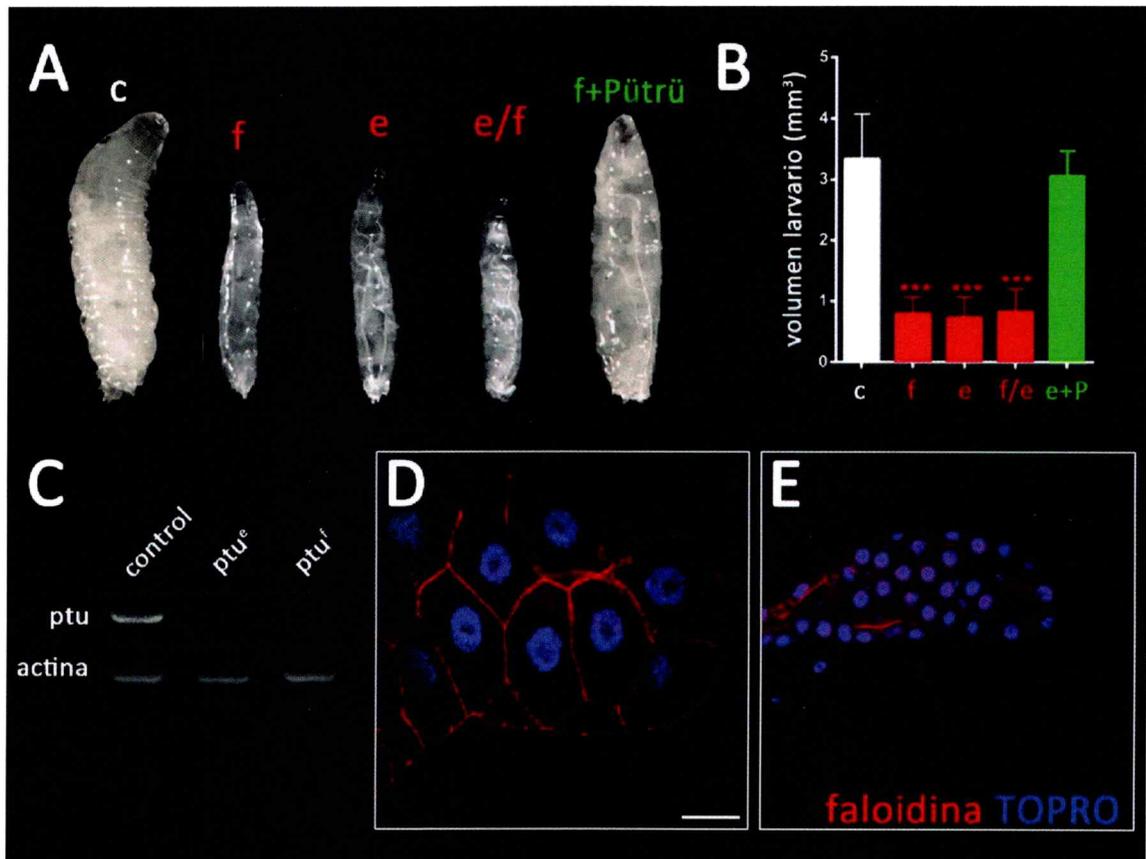


Figura 11: Los tRNAs modificados con t⁶A son necesarios para el crecimiento.

(A) Comparación entre larvas control (c), mutantes homocigotas para *pütrü* (e y f), trans-heterocigotas mutantes (e/f) y mutantes rescatadas expresando Pütrü con el driver *armadillo>Gal4* (f+Pütrü). (B) Una cuantificación del volumen de las larvas, muestra que los animales mutantes presentaron una disminución significativa de su tamaño (n=20, ANOVA *** p<0.005). (C) RT-PCR para detectar el mRNA de Pütrü. Imágenes representativas de glándulas salivales teñidas con faloidina, para visualizar la actina polimerizada, y TOPRO, para detectar el DNA, provenientes de animales control (D) y mutantes (E).

2.2. Los tRNAs modificados con t⁶A son necesarios para el crecimiento autónomo-celular

Los dILPs son hormonas producidas por células neurosecretoras, ubicadas en el cerebro de las larvas de *Drosophila* en desarrollo. La señalización de dILPs gobierna diversos aspectos de la fisiología del animal, entre ellos el crecimiento (Kannan y Fridell 2013). El fenotipo observado en los mutantes de *pütrü*, en términos de reducción del tamaño del organismo, es muy similar al que presentan animales carentes de células productoras de dILPs (Rulifson y col. 2002). Una posibilidad es que la falta de t⁶A afecte negativamente la liberación de esta hormona, causando los problemas de crecimiento observados. Por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-dILP2 se midió de manera indirecta la liberación de dILP2 en las células neuro-secretoras que lo producen. Se ha descrito que cambios en los niveles del péptido dILP2 en tales células guardan una estrecha correlación con la cantidad de péptido que se está liberando a la hemolinfa (Nassel y col. 2013). En nuestras condiciones experimentales no se observaron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia presentes en cerebros de animales control o mutantes homocigotos para *pütrü*, indicando que no hay cambios en la secreción de dILP2 (Figura 12) y sugiriendo que el fenotipo no es causado por una disminución en la secreción de esta hormona y que podría corresponder a un fenómeno autónomo-celular.

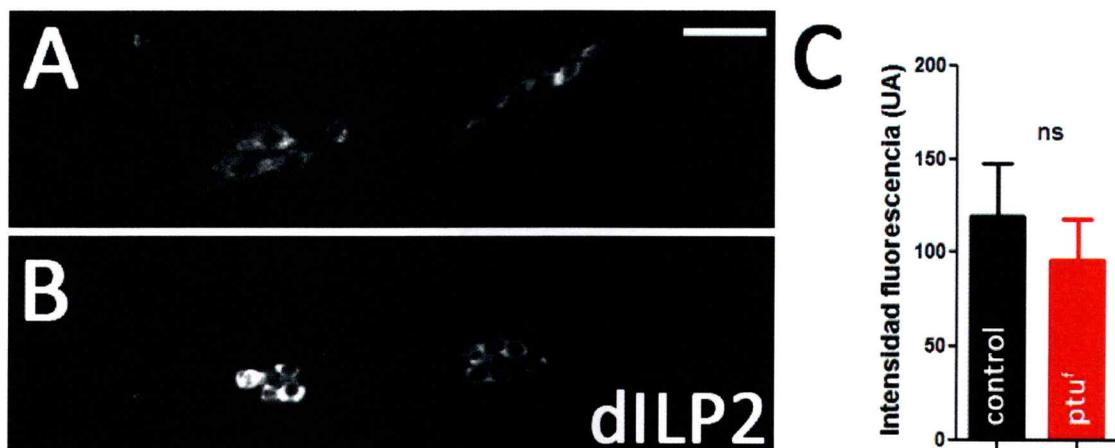


Figura 12: Presencia de dILP2 en las neuronas productoras de insulina

Imagen representativa de la detección por inmunofluorescencia de dILP2 en las células productoras de insulina ubicadas en el cerebro de *Drosophila*. (A) Corresponden a células de animales control, mientras que (B) muestra las de un mutante para *pütrü* (*ptu*^f). Barra 25 μ m. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de dILP2 (n=50, t test).

La generación de animales mosaicos nos permitió establecer que los tRNAs modificados con t⁶A son requeridos para sustentar el crecimiento autónomo-celular. Mediante recombinación mitótica se intentó generar clones mutantes en tejido imaginal a 36±12 y 60±12 horas post depósito del huevo, que es cuando las células imaginales se encuentran proliferando (Anexo 3, Figura S5). No se observó la población homocigota mutante para *pütru*. Luego generamos clones en tejido larvario. Se generaron clones mitóticos entre 0-3 horas post depósito del huevo. En este período las células progenitoras del cuerpo graso y de otros tejidos larvarios están proliferando (Arsham y Neufeld 2009), así observamos células mutantes homocigotas en el cuerpo graso. Las células mutantes presentaron un tamaño significativamente menor que las células control (Figura 13). Estos resultados muestran que Pütru y posiblemente tRNAs modificados con t⁶A son requeridos para sustentar el crecimiento autónomo-celular en *Drosophila*.

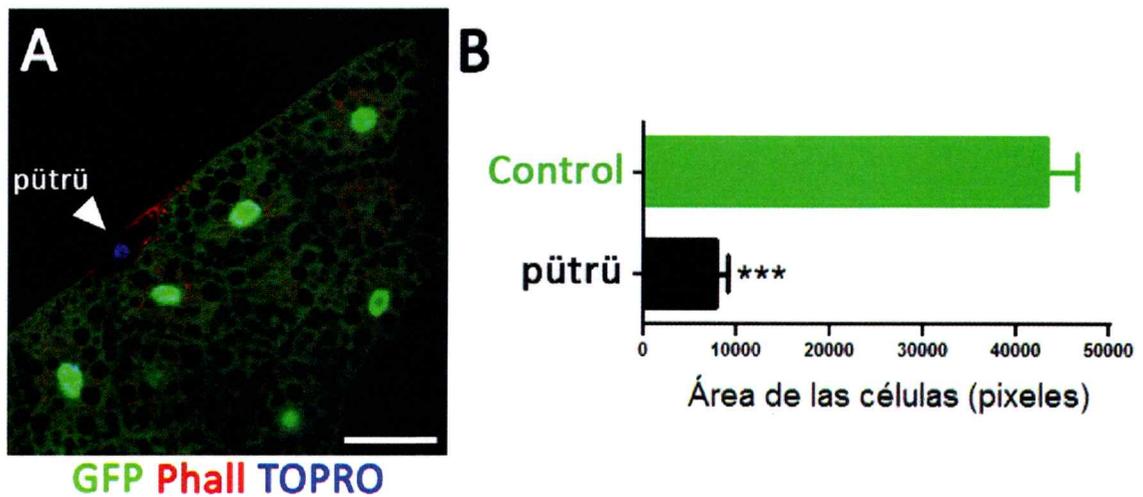


Figura 13: t^6A es necesario para sustentar el crecimiento autónomo-celular.

(A) Mediante recombinación mitótica, generamos animales mosaico. En la configuración utilizada, las células mutantes homocigotas no presentan marca de GFP (pütrü, punta de flecha blanca). (B) Se grafica el área de células control (GFP+) y mutantes homocigotas para *pütrü* (t test *** $p < 0.001$).

2.3. Los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan el potencial de crecimiento en eucariotes

Se ha descrito que en *Drosophila* los niveles de tRNA iniciador son limitantes para el crecimiento celular y del organismo (Rideout y col. 2012). Nuestro razonamiento es que el tRNA iniciador funcional y limitante, necesariamente debe estar modificado con t⁶A ya que ésta es requerida para la función decodificadora. Entonces, cambios en la proporción de tRNA iniciador modificado contra no modificados con t⁶A tendrá efectos sobre el crecimiento. Para manipular esta proporción, generamos animales transgénicos los cuales tienen una copia mutante extra del *locus* del tRNA iniciador, en la cual la adenosina de la posición 37 del tRNA, sustrato de la modificación t⁶A, fue sustituida por G con la idea que no pueda ser modificada (Figura 14A). Esta mutación interfiere con la secuencia consenso, necesaria para la adición de t⁶A al tRNA (Brule y col. 1998). La expresión del tRNA iniciador mutante es controlada por las secuencias endógenas que gobiernan la expresión del tRNA iniciador silvestre. Así, en animales control se encuentran 4 copias del *locus* del tRNA iniciador (Sharp y col. 1981), mientras que en los animales transgénicos se encuentran las mismas 4 copias y una extra, la que corresponde al iniciador mutante. Se midió el tamaño de estos animales transgénicos en comparación con las contrapartes control. Los animales transgénicos, que tienen el tRNA iniciador mutante, presentan alas de un área significativamente menor que los controles (Figura 14B).

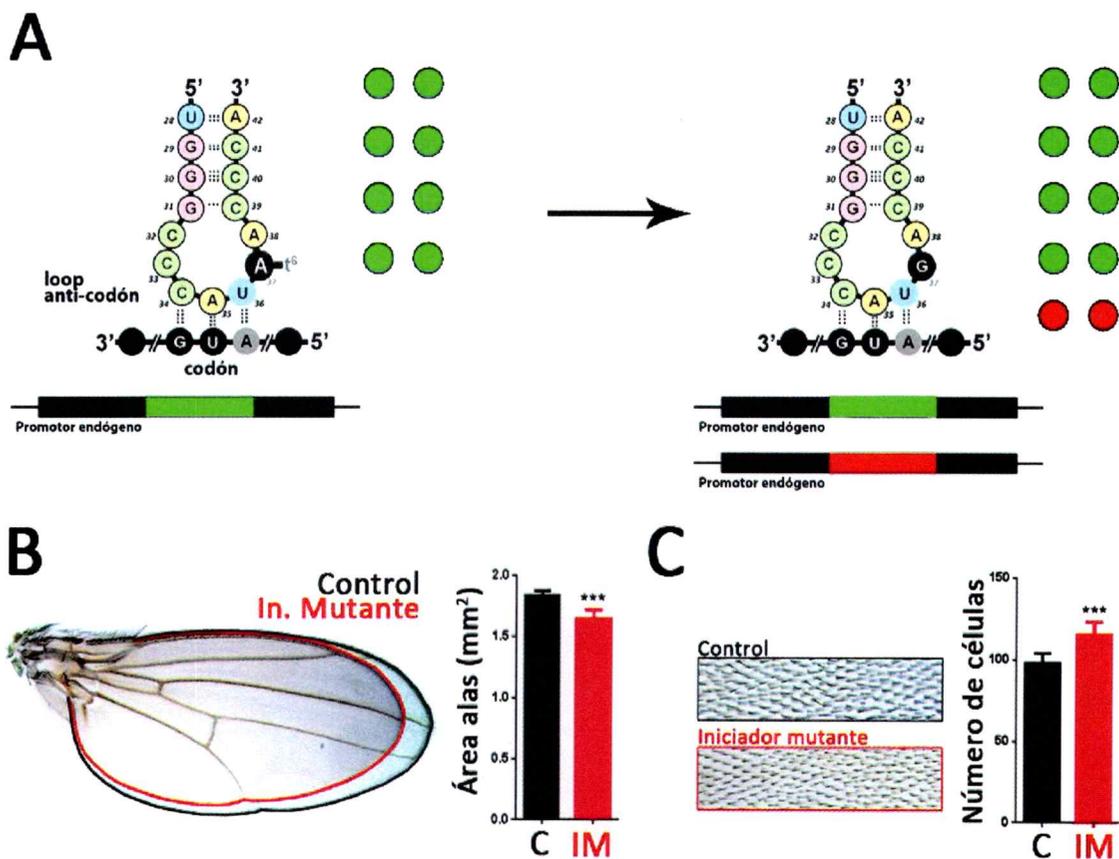


Figura 14: Disminución en la proporción de niveles del tRNA iniciador modificado con t⁶A reduce el crecimiento

(A) Creamos una versión del tRNA iniciador que no puede ser modificada en la posición 37 con t⁶A. La mutación es A > G. Este "iniciador mutante (IM)" está flanqueado por las secuencias promotora y terminadora endógenas presentes en el genoma. Al agregar un nuevo *locus* que codifica para el tRNA iniciador pero que no puede modificarse, apuntamos a cambiar la proporción entre tRNAs modificados y sin modificar. Al agregar el nuevo *locus* aumentamos la proporción de tRNAs sin modificación. Los puntos de color verde representan a cada *locus* que codifican un tRNA iniciador que puede ser modificado con t⁶A, mientras que los rojos a la forma mutante, que no puede modificarse. (B) Evaluamos y medimos el área de las alas y (C) la densidad celular en estos órganos. Se comparó entre control y transgénicos que poseían el iniciador mutante (n=50, t-test p<0.005).

De manera complementaria y para estimar cambios en el tamaño de las células que componen el ala, contamos la cantidad de pelos en un área del ala determinada. Los animales transgénicos presentaron una mayor densidad de pelos, indicando que las alas más pequeñas son compuestas por células de menor tamaño comparadas con la situación control (Figura 14C).

Con la idea de seguir explorando si la especie limitante para el crecimiento celular corresponde al tRNA iniciador modificado con t⁶A realizamos un experimento que apunta en la dirección contraria, es decir estimular la modificación del tRNA iniciador. El experimento ideal sería aumentar específicamente los niveles del tRNA iniciador modificado con t⁶A, sin embargo limitaciones experimentales no nos permiten hacer esto. Tomamos otro camino al sobre-expresar Pütrü de manera ubicua en larvas utilizando el sistema Gal4/UAS, en este caso utilizado el *driver daughterless>Gal4 (da>Gal4)* (Roignant y col. 2003). En primer lugar se controló que en las condiciones ensayadas se está sobre-expresando Pütrü. Un RT-PCR semi-cuantitativo mostró que los animales poseedores de la combinación *driver* y secuencia codificante de Pütrü río-abajo de un UAS presentaron mayores niveles de mensajero (Figura 15A). Una vez comprobada la sobre-expresión, medimos el área de las alas de los animales que sobre-expresaron Pütrü para contrastarla con la de individuos control (Figura 15B-C). Los animales que sobre-expresan Pütrü presentan un tamaño mayor y una menor densidad celular en sus alas, indicando que estos órganos de mayor área estaban compuestos por células de

mayor tamaño. También confirmamos, utilizando nuestro ensayo de HPA^t⁶A, que los animales que sobre-expresaron Pūtrū aumentaron los niveles de tRNA iniciador modificado con t⁶A. En las muestras provenientes de estos animales se observó una señal significativamente menor que en los control, mostrando aumentos en los niveles de tRNA iniciador modificado con t⁶A (Figura 15D).

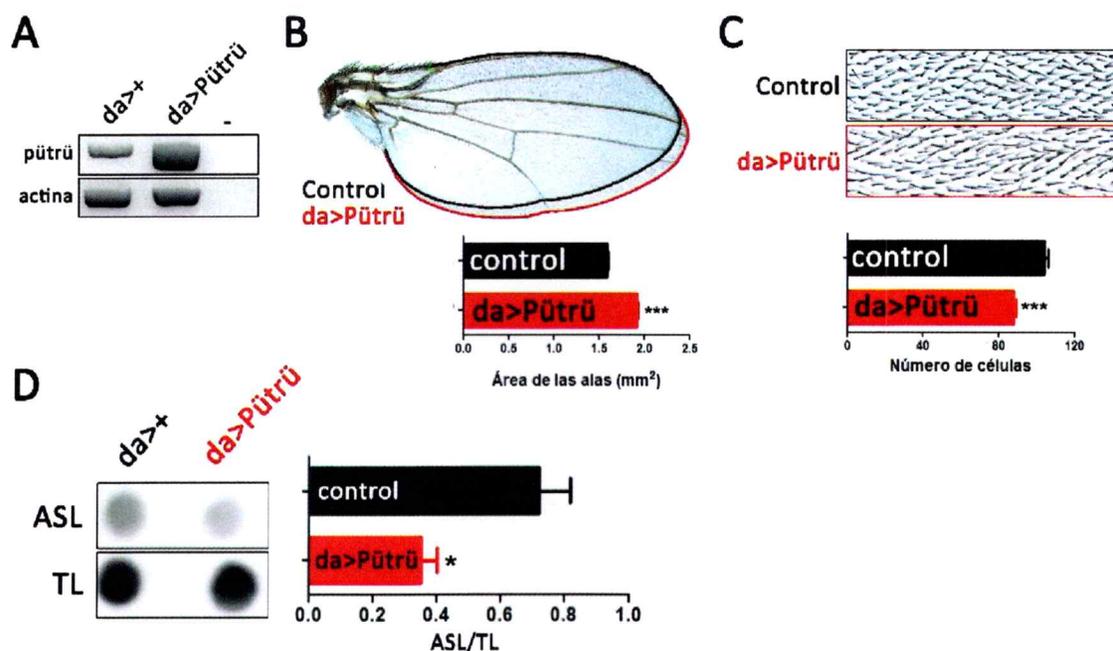


Figura 15: La sobreexpresión ubicua de Pütrü promueve el crecimiento

(A) Imagen representativa de un RT-PCR detectando el cDNA de Pütrü, actina fue utilizado como control de carga. (B) Comparación entre alas de animales control y los que sobre-expresan Pütrü (*da>Pütrü*). Asimismo se contó la cantidad de células en un área de las alas de estos animales (C) (t test, $n=50$, $***p<0.005$). (D) Muestra una imagen representativa de un ensayo HPA⁶A realizado sobre tRNAs extraídos de animales control (*da>+*) y que sobre-expresan Pütrü (*da>Pütrü*) ($n=3$, t test, $p<0.005$).

Habiendo establecido que la sobreexpresión de Pütrü aumenta los niveles de tRNA iniciador modificado con t⁶A, promoviendo el crecimiento, nos preguntamos si este es un fenómeno autónomo-celular o bien ocurre por un efecto sistémico. Para probar esto, en primer lugar utilizamos un *driver* tejido-específico, *hedgehog>Gal4 (hh>Gal4)* que expresa Gal4 en el compartimiento posterior de diversas estructuras durante el desarrollo de los animales. Una de ellas, es el disco imaginal que da origen al ala adulta (Tabata y col. 1992). Animales que sobre-expresaron Pütrü en este compartimiento o bien controles que sólo presentan el *driver* fueron crecidos en las mismas condiciones nutricionales y densidad poblacional. Se cuantificó el área del compartimiento posterior del ala y lo normalizamos por al área del compartimiento anterior (Figura 16A). Esto mostró que en alas de animales que sobre-expresan Pütrü ocurrió un aumento en el tamaño del compartimiento posterior (Figura 16B) y que éste es compuesto por células de mayor tamaño; esto a través de la cuantificación del número de células en un área determinada, y confirmado por un análisis de citometría de flujo (Figura 16C). Utilizando la configuración *FLP-out* generamos animales mosaico. Así sólo algunas células sobre-expresaron Pütrü y que quedan rodeadas de células control (Anexo 3, Figura S4). Se cuantificó el área de las células que expresan sólo GFP o Pütrü + GFP (Figura 16D-F). Cuando el área de dichas células fue cuantificada y normalizada por la de sus vecinas, observamos que las células que sobre-expresan Pütrü tuvieron un tamaños significativamente mayor que las control.

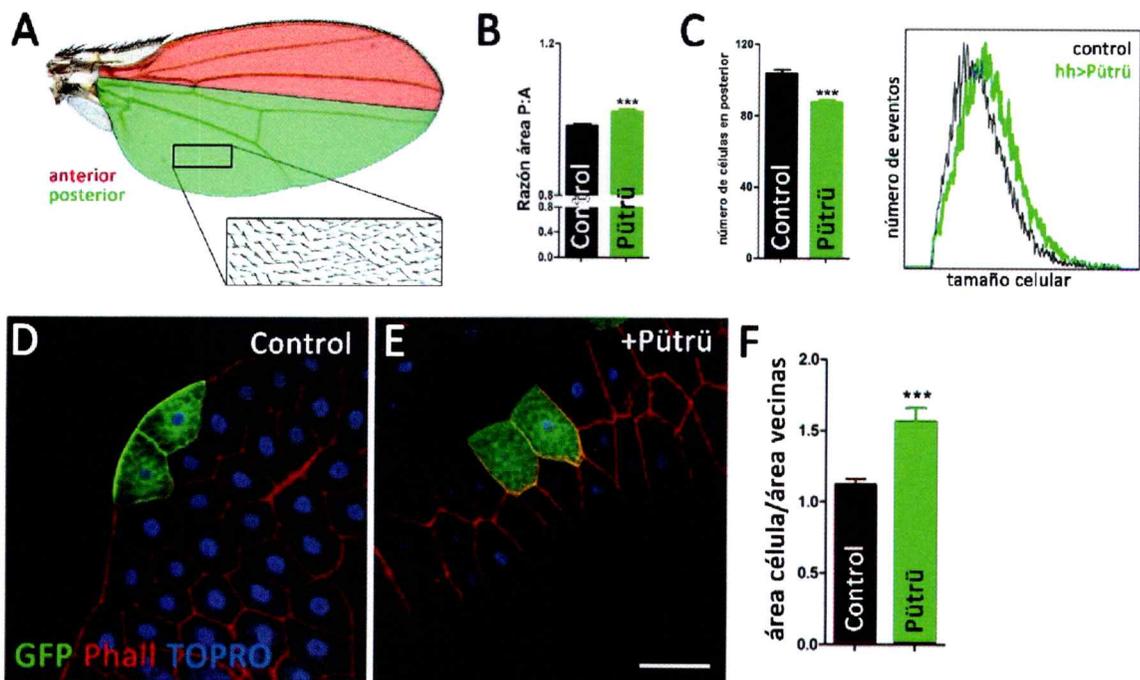


Figura 16: Pütrü promueve el crecimiento de manera autónoma celular

(A) Ala adulta de *Drosophila* en la cual el compartimiento posterior se encuentra coloreado en verde y el anterior en rojo. También se indica la región del sector E en la cual se contó el número de células en un área determinada. Considerando estas delimitaciones se cuantificó el área de los compartimiento y se hizo una proporción entre ellos que se grafica en (B). (C) También se graficó el número de células y se analizó el tamaño celular por citometría de flujo comparando la población sin GFP (anterior) con las que presentan marca (posterior). Histograma representativo de 3 experimentos independientes. Mediante *FLP-out* se generó animales mosaico, en (D) se presentan células control que sólo expresan GFP y (E) muestra células que expresan GFP y Pütrü. En (F) se grafica el área de las células normalizada por el área promedio de sus vecinas (t test, n=50 clones, ***p<0.005).



Considerando lo obtenido en *Drosophila*, nos preguntamos si cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A determinan la capacidad de crecimiento en otros organismos. Para poner a prueba esta idea, utilizamos una cepa silvestre de *S. cerevisiae* que transformamos con un vector de expresión vacío o que contenía la región codificante de KAE1. Como era de esperar se encontró que las células transformadas con el vector que contenía la región codificante de KAE1 presentaron niveles aumentados de t⁶A (Figura 17A). Estos organismos fueron cultivados tanto en medio sólido como líquido obteniendo en ambos casos resultados similares, las que sobre-expresan KAE1 crecen más rápido que las control (Figura 17B y C). Estos resultados muestran que los tRNAs modificados con t⁶A son un factor limitante para el crecimiento celular en eucariotas. Es posible que esto también ocurra en organismos más complejos o de otros dominios (arqueas).

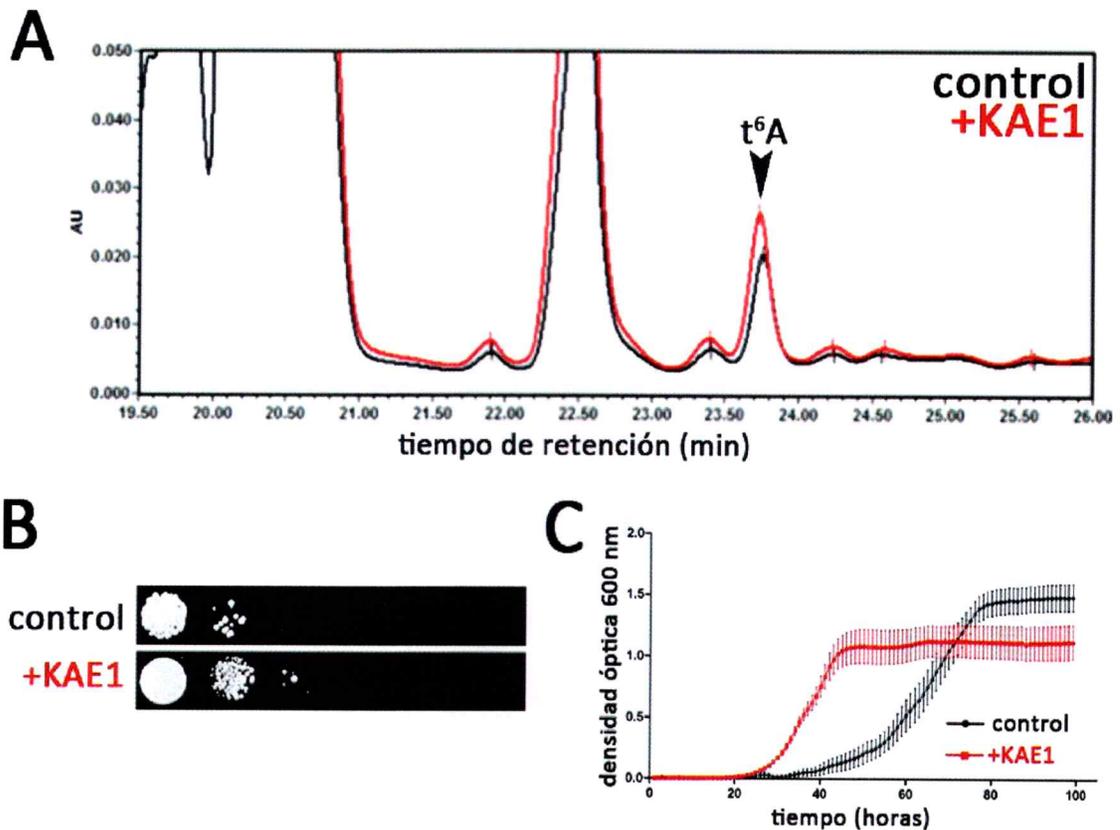


Figura 17: La sobre-expresión de KAE1 promueve el crecimiento en levadura

Levaduras silvestres (BY4741) fueron transformadas con el vector pYES vacío (control) o bien con el mismo plásmido que contiene el ORF de KAE1 (+KAE1). (A) Perfil de elución HPLC para nucleósidos provenientes de tRNAs de animales control o que sobre-expresan KAE1. Esta figura es representativa de 2 experimentos independientes. (B) Los ensayos de gota se hicieron con diluciones seriales (1:10) de una suspensión madre de densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0.6. (C) Por otro lado el crecimiento en líquido se evaluó midiendo el OD_{600} durante 100 horas. Las curvas representan el crecimiento de 10 pocillos independientes y son representativas de 3 experimentos utilizando diferentes colonias transformantes.

3. Determinar la relación epistática entre *pütrü*, componentes de la vía insulina/TOR y de homeostasis proteica

El estudio de los tRNAs históricamente ha estado centrado en sus propiedades bioquímicas y estructurales. Asimismo, la información relacionada con las modificaciones post-transcripcionales se limita a estos campos y pocos trabajos abordan las dependencias funcionales entre dichas modificaciones y la fisiología celular. En esta parte del trabajo se presentan experimentos que buscaron identificar y comprender las relaciones funcionales de los tRNAs modificados con algunos aspectos de la fisiología celular, especialmente los que conciernen a elementos relacionados con la homeostasis proteica.

3.1. La actividad de TOR es sensible a cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A

El principal controlador del crecimiento en eucariotas es TOR (Thomas y Hall 1997). Los fenotipos macroscópicos y celulares de los mutantes de *pütrü* guardan similitud con los descritos para mutantes de *tor* y de reguladores positivos de TORC1 (Rulifson y col. 2002, Stocker y col. 2003). Nos preguntamos si existen cambios en la actividad de TORC1 en animales mutantes para *pütrü*. El blanco clásico de TORC1 y que analizamos para medir su actividad, fue la fosforilación de S6K en la treonina 398 (Pullen y Thomas 1997). En ambos mutantes para *pütrü* se observó una dramática disminución de la fosforilación de S6K en dicho residuo, mientras que no se observaron variaciones en los niveles

de esta proteína (Figura 18A). Esto indica que la falta o disminución de tRNAs modificados con t⁶A reduce la actividad de TORC1. De manera consistente con una severa reducción en la actividad de TORC1, en los mutantes observamos una disminución en la proporción de ribosomas traduciendo (Anexo 10, Figura S12). Resultados similares de nuestro laboratorio han sido publicados previamente para animales en los cuales se ha silenciado Prpk de manera ubicua (Ibar y col. 2013).

La fosforilación en la serina 505 de Akt es llevada a cabo por TORC2 (Sarbasov y col. 2005). En los animales mutantes para *pütrü* se observa una disminución significativa en la fosforilación de Akt en dicho residuo (Figura 18A).

Por otro lado, también analizamos la fosforilación de S6K y Akt en condiciones de sobre-expresión ubicua de Pütrü. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de ambas quinasas aumentan al sobre-expresar Pütrü (Figura 18B). En conjunto, los resultados muestran que la actividad de ambos complejos TOR cambia al manipular los niveles de tRNAs modificados con t⁶A.

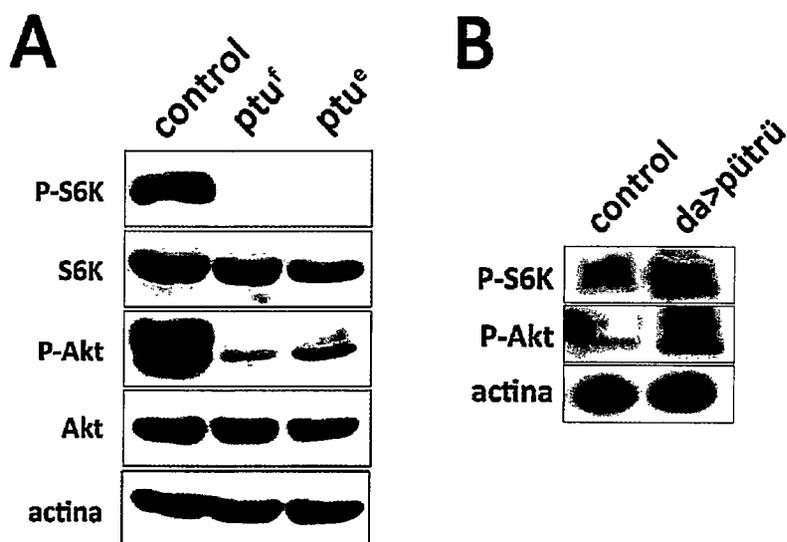


Figura 18: La actividad de TOR quinasa es sensible a los niveles de tRNAs modificados con t⁶A

(A) En la imagen se muestra la señal tras la detección por Western blot de S6K fosforilada en la treonina 298. Además analizamos la fosforilación en la serina 505 de Akt en animales control y mutantes para *pütrü* (*ptu^e* y *ptu^f*). La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. (B) Fosforilación de Akt y S6K en condiciones control y de sobreexpresión ubicua de *pütrü* (*da>pütrü*).

3.2. Relaciones epistáticas de tRNAs modificados con t⁶A y elementos relacionados con el crecimiento y la homeostasis proteica

La severa disminución en la actividad de TORC1 (fosforilación de S6K), sugiere que el fenotipo de crecimiento deficiente puede ser causado por la baja en la actividad de esta vía de señalización. Así, nos propusimos explorar las interrelaciones entre ellos a través de la posibilidad de rescatar el fenotipo observado manipulando la vía insulina/TOR. Modulamos la activación de la vía (Figura 3), sobre-expresando una forma permanentemente activado de PI3K, una forma de Akt mirotilada, que facilita su fosforilación y Rheb para activar directamente a TORC1. Además, con la expresión de una versión permanentemente activa de S6K se emuló parcialmente condiciones de hiper-activación del complejo TORC1. Ninguna de las manipulaciones realizadas fue capaz de revertir el fenotipo de crecimiento generado por la falta de *Pütrü* (Figura 19). Esto indica que *pütrü* es epistático sobre todos los componentes ensayados.

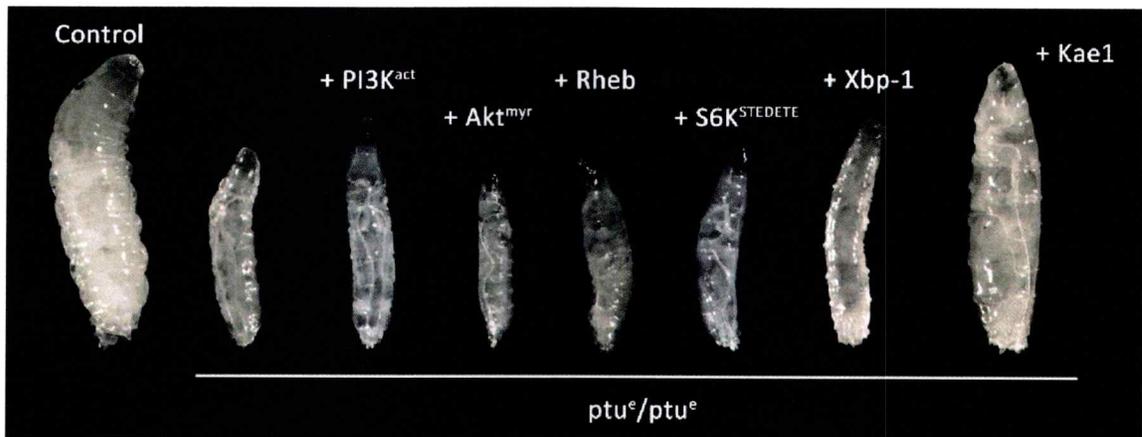


Figura 19: Relaciones epistáticas de *pütrü* y componentes de la vía insulina y el UPR.

Los mutantes para *pütrü* presentan un fenotipo de problemas de crecimiento. Utilizando un driver ubicuo (*armadillo-Gal4*, *arm-Gal4*) quisimos rescatar dicho fenotipo activando la vía de señalización Insulina/TOR en distintos puntos (PI3K, Akt, Rheb y S6K) y también de la UPR (Xbp-1). Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

Se ha mostrado en lavadura que los mutantes para *KAE1* presentan problemas de traducción como son el reconocimiento erróneo del codón de inicio y cambios en el marco de lectura (Daugeron y col. 2011). En consecuencia es probable que en dichas células se estén generando proteínas aberrantes, con tendencias a plegarse de forma incorrecta, generando entre otros, estrés de retículo endoplásmico y en consecuencia la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Ryoo y Steller 2007). Este razonamiento es el fundamento para pensar que en un sistema con actividad/niveles disminuidos de tRNAs modificados con t⁶A pueda favorecerse la generación de proteínas aberrantes, las cuales pueden presentar tendencia a plegarse de forma incorrecta y, para el caso específico de proteínas secretadas, generar estrés de retículo endoplásmico de manera crónica. Esta activación permanente de la UPR pudiera llevar a la disminución en la actividad de TOR. En *D. melanogaster* existen al menos 2 receptores (Ire-1 y PERK) que activan la UPR. Ire-1 es una proteína de transmembrana del retículo endoplásmico que cataliza el *splicing* no convencional del mRNA de Xbp-1 bajo condiciones de estrés de retículo. Luego del *splicing*, el mensajero de Xbp-1 es traducido para generar un factor de transcripción que entra al núcleo y activa la transcripción de diversos genes que asisten el correcto plegamiento de las proteínas (Plongthongkum y col. 2007). No obstante lo anterior el fenotipo de los mutantes para *pütrü* no fue revertido al sobre-expresar Xbp-1, uno de los actores fundamentales en la activación del UPR (Figura 19).

Por otra parte en condiciones de silenciamiento de Pütrü observamos activación del UPR (Rojas-Benitez y col. 2013), por lo que nos propusimos detectar si la UPR se encontraba activa en los mutantes de *pütrü*. Para esto tomamos dos aproximaciones distintas y complementarias. Analizamos en primer lugar el *splicing* de Xbp-1 mediante PCR para el que no observamos aumento en los animales mutantes (Figura 20A). Por otra parte, el estrés de retículo lleva, como parte del respuesta a proteínas mal plegadas, a la fosforilación de eIF2 α en la serina 51 catalizada por PERK (Williams y col. 2001). También estudiamos esta fosforilación sin lograr observar diferencias entre los animales control y mutantes (Figura 20B). En conjunto, estos resultados sugieren que la UPR no es el mecanismo a través del cual se está regulando el crecimiento y disminuyendo la actividad de TOR en respuesta a la falta de t⁶A en los tRNAs.



Figura 20: La UPR no se encuentra activo en mutantes para *pütrü*

(A) No detectamos incrementos en el *splicing* no-convencionales del mRNA de Xbp-1. La banda superior (Xbp-1u) corresponde al mRNA sin procesar, mientras que la inferior (Xbp-1s) corresponde a la forma ya procesada. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. (B) De manera consistente, los mutantes para *pütrü* no presentan aumentos en la fosforilación de eIF2 α , que ocurre como unos de los eventos iniciales de la UPR.

DISCUSIÓN

Este trabajo es parte del extenso y diverso universo de esfuerzos experimentales por identificar y comprender elementos que determinan el tamaño de las células y los organismos. Específicamente está relacionado con la posible diálogo que se da entre elementos reguladores del crecimiento celular y los aspectos estructurales y funcionales de los tRNAs. Estas son moléculas fundamentales para la síntesis de proteínas y en este contexto han sido estudiadas extensamente desde un prisma molecular, estructural y bioquímico, dejando de lado en cierta medida su escrutinio desde una perspectiva celular y considerando además la dimensión multicelular. El avance de las tecnologías y los cambios de los paradigmas en la investigación han invitado y ha permitido a explorar nuevas funciones de los tRNAs relacionadas o no con la traducción. Este trabajo buscó estudiar las funciones regulatorias de los tRNAs sobre procesos celulares. Quisimos analizar un aspecto particular de estas moléculas y su relación con el crecimiento celular. Específicamente considerando las modificaciones post-transcripcionales que sufren los tRNAs para convertirse en moléculas decodificadoras funcionales.

1. Los tRNAs modificados con t⁶A son elementos necesarios y limitantes para el crecimiento celular

Nuestros resultados muestran el carácter limitante que tiene el tRNA iniciador modificado con t⁶A sobre el crecimiento celular, no sólo en *Drosophila* sino que también en *S.cerevisiae*, sugiriendo que esta característica es conservada, al menos eucariontes. Los tRNAs y esta modificación en especial ha sido descrito en todos los tipos celulares analizados, por lo que es muy probable que ésta relación sea compartida por todos los dominios de la vida. Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con lo observado en levadura. Sin embargo al ser organismos unicelulares, el fenotipo se simplemente en que los mutantes crecen y proliferan más lento que las células silvestres (Daugeron y col. 2011, El Yacoubi y col. 2011). Por otro lado, *Drosophila* es un metazoo y el fenotipo en los mutantes de *pütrü* es más complejo. El fenotipo macroscópico se manifiesta como una disminución severa en el tamaño de los animales. Estos logran desarrollarse hasta estadios larvarios, considerablemente más lento que sus contrapartes control. Posiblemente es el aporte materno el que permite que los animales se desarrollen hasta estos estadios (Fitch y col. 1998). Las madres heterocigotas mutantes para *pütrü* aportan el mensajero que luego se traduce, y la enzima producida transfiere t⁶A a los tRNAs ANN, los cuales tienen una vida media de varios días (Kadaba y col. 2004), permitiendo sustentar la traducción por este período. El eliminar *pütrü* durante la ovogénesis, para obtener así animales sin aporte materno, permitiría estudiar el rol de los tRNAs modificados

con t⁶A durante el desarrollo temprano de *Drosophila*. Una posibilidad para realizar esto es generar clones por la configuración “Hembras Dominantes Estériles” que permite la generación de huevos homocigotos mutantes de interés (Perrimon 1998, St Johnston 2002), en este caso, de *pütrü*. Es muy posible que la falta de tRNAs modificados con t⁶A sea una condición inviable para las primeras etapas de la embriogénesis. Por ejemplo, la rápida etapa de clivaje que ocurre en el huevo previo a la celularización sería con mucha probabilidad una etapa que el animal en condiciones de ausencia de t⁶A no pueda completar.

También debemos tomar en cuenta que *Drosophila* está compuesto de distintos tipos celulares. Es de esperar que la falta de tRNAs modificados con t⁶A cause distintos efectos dependiendo de la población celular analizanda. Esto podría explicar por qué en los mutantes, por un lado se produce la disminución del tamaño de las estructuras larvarias, por ejemplo el cuerpo graso, y en el mismo animal, la falta de células imaginales. En las primeras, una cantidad de tRNAs modificados con t⁶A que se generó temprano en el desarrollo gracias al aporte materno, permitió el crecimiento hasta un cierto punto. Cuando los tRNAs con t⁶A han sido reemplazados por otros que no poseen la modificación, la traducción es deficiente y no puede sustentar más el crecimiento. Por otra parte, las células imaginales se encuentran en activa proliferación durante las fases larvarias (Morata 2001) y la ausencia de ellas en las larvas mutantes sugiere que la presencia, o bien la capacidad de mantener ciertos niveles de tRNAs modificados con t⁶A es fundamental para sustentar las necesidades traduccionales de células con rápido ritmo de proliferación. Esto es consistente

con la incapacidad de generar clones mitóticos en células imaginales, y si se producen es que probable que fueran eliminados a través del mecanismo de competencia celular. Fenómeno en el cual células de mayor capacidad proliferativa eliminan a las vecinas, menos capaces en término de crecimiento y proliferación (Morata y Martin 2007). La idea de que los tRNAs modificados con t⁶A son indispensables en condiciones de activa proliferación es apoyada por resultados obtenidos en linfocitos estimulados con IL-2, a partir de los cuales originalmente se identificó a Prpk. Cuando los linfocitos fueron activados y proliferaron, ocurre un aumento en los niveles del mRNA de Prpk (Abe y col. 2001). Es posible que también el mRNA de Pütrü aumente en condiciones similares de estimulación de la proliferación, para así sustentar la modificación de tRNAs con t⁶A, y preparar así la maquinaria de traducción para los nuevos requerimientos traduccionales impuestos por la señal de crecimiento. Surge entonces la pregunta ¿Cómo cambia el repertorio de modificaciones presentes en los tRNAs en relación a la disponibilidad de factores de crecimiento o agentes mitógenos? Esta es una interrogante que emerge bajo el prisma de esta tesis como un campo fértil de investigación.

En organismos unicelulares, el crecimiento celular depende básicamente de los niveles de nutrientes. En los metazoos por otra parte la presencia de factores de crecimiento también controla este proceso (Dennis y col. 2011). El fenotipo observado en los mutantes de *pütrü* es similar al que presentan animales carentes de células productoras de péptidos similares a la insulina (dILPs) (Rulifson y col. 2002). La generación de clones mitóticos mostró que el fenotipo

es autónomo celular y no era causado en consecuencia por una falla en la secreción de dILP2. Los clones mutantes sólo fueron posibles de generar en células larvales, específicamente se identificaron en el cuerpo graso, un órgano análogo funcional al hígado y tejido graso de los mamíferos (Arrese y Soulages 2010). En este órgano no ocurre el fenómeno de competición celular y, una vez establecidos los progenitores durante la embriogénesis estos no proliferan, aumentando el tamaño del tejido solo por acumulación de biomasa sustentada por eventos de endoreplicación (Arrese y Soulages 2010). De tal forma, en este tejido cambios en el crecimiento se apreciarán directamente como modificaciones en el tamaño final de las células. Logramos obtener clones y observar la disminución del tamaño de las células mutantes. El hecho de que el fenotipo de falta de Pütrü sea autónomo celular nos indica además que el mRNA, la enzima codificada por éste y su producto (tRNAs modificados con t⁶A) no son transportados entre células vecinas.

La modificación de niveles de tRNAs en respuesta a cambios de las condiciones fisiológicas de una célula es un fenómeno del cual se tiene conocimiento hace años, tanto durante procesos fisiológicos (Cooper y Braverman 1981), patológicos (Kanduc y col. 1997) o bien cuando se enfrentan a condiciones de estrés (Pang y col. 2014). Ajustes de este tipo permiten que las células se adapten, al regular la síntesis de proteínas, a las condiciones imperantes. Al modificar los niveles de las distintas poblaciones de tRNAs que reconocen codones en particulares, se puede desfavorecer o promover la traducción de determinados mensajeros. Este tipo de conducta transcripcional

selectiva de los tRNAs ha sido sugerida y sólo recientemente ha sido mostrada; células que se encuentra en fase G₀ del ciclo celular presentan un repertorio de tRNAs significativamente distinto al de una población que está proliferando, lo cual se correlaciona con marcas epigenéticas en los genes que codifican para tRNAs específicos. Así, las células pueden controlar de manera fina la expresión de genes a nivel de su traducción produciendo un proteoma particular (Gingold y col. 2014). Este procesos se ha denominado traducción adaptativa (Pan 2013). Sin embargo los cambios en las modificaciones post-transcripcional de los tRNAs no ha sido considerado extensamente como una capa extra de regulación en este contexto. Cambios en el repertorio de modificaciones que posee un tRNA o un grupo de ellos, lleva a modificar sus características estructurales y funcionales (Phizicky y Alfonzo 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo invitan a pensar que al menos t⁶A tiene un importante rol en este sentido, entregando a los tRNAs que tengan esta modificación, particularmente al tRNA iniciador, una característica especial dentro del repertorio y que incluso posee un rol regulatorio sobre los proceso celulares, condicionando entre otros el potencial de crecimiento de la célula.

Se ha mostrado que los niveles del tRNA iniciador son limitantes para el crecimiento celular en levadura (Francis y Rajbhandary 1990), en células humanas *in vitro* (Pavon-Eternod y col. 2013) y en *Drosophila* (Rideout y col. 2012). Los mutantes para *pütrü* nos indican que los tRNAs modificados con t⁶A son limitantes para el crecimiento. Al cambiar los niveles de tRNAs modificados con t⁶A agregando, un tRNA iniciador que no puede ser modificado o bien sobre-

expresando Pütrü, observamos cambios en la capacidad de crecimiento celular y del organismo completo. Resultado que apoya la noción de que los niveles de tRNAs modificados con t⁶A modulan el crecimiento.. Una posibilidad respaldada por la literatura es que son exclusivamente los niveles de tRNA iniciador modificado con t⁶A los que condicionen la capacidad de crecimiento. En relación a los experimentos de sobre-expresión de KAE1 en levadura, también observamos como el aumento de los tRNAs modificados con t⁶A promovieron el crecimiento. Así, los resultados en levadura y *Drosophila* en conjunto, muestran que los tRNAs modificados con t⁶A son un factor que condiciona la capacidad de crecimiento en eucariontes. Una forma de explicar el efecto observado es que al tener una mayor cantidad de tRNA iniciador modificado con t⁶A se favorece la formación del complejo de pre-iniciación y en consecuencia se inicia la traducción con mayor frecuencia, aumentando la capacidad biosintética y el crecimiento celular. De nuestros resultados se desprende que una característica estructural de los tRNAs, como es la presencia de t⁶A, condiciona a través de una mayor disponibilidad de un elemento funcional, la forma en que la célula responde a las condiciones nutricionales del ambiente.

2. tRNAs modificados con t⁶A y actividad de TOR quinasa

Como se ha descrito en extenso y es ampliamente aceptado, el complejo TORC1 es el principal regulador del crecimiento celular en eucariontes (Weidmann y col. 2014). Integra diversas señales intra- y extra-celulares para controlar procesos relacionados con la biosíntesis de diversas macromoléculas, favoreciendo la acumulación de biomasa en condiciones ambientales favorables (Shimobayashi y Hall 2014). Uno de estos procesos que canónicamente es controlado por TOR quinasa es la transcripción de rRNAs y tRNAs (Kantidakis y col. 2010). Sin embargo, se ha mostrado que reducciones en los niveles de tRNAs citoplasmáticos tiene un efecto negativo sobre la actividad de TORC1 (Huynh y col. 2010), sugiriendo un mecanismo de retro-alimentación entre TORC1 y los niveles de tRNAs (Lee y col. 2012, Willis y Lee 2012). Nuestros resultados sugieren que parte de ese mecanismo de retro-alimentación puede depender de los niveles de tRNAs modificados con t⁶A. En nuestro razonamiento, sólo los tRNAs modificado serán los completamente funcionales, y considerando que TORC1 asegura la disponibilidad de una maquinaria de traducción apropiada para la condición celular y ambiental enfrentada, es posible que exista a su vez un mecanismo recíproco, aún desconocido, que permite censar los niveles de tRNAs funcionales y ajustar la actividad de TORC1 a la capacidad traduccional subyacente de la célula. Con los resultados obtenidos hasta ahora, no podemos proponer un mecanismo molecular específico que de cuenta de esta proposición.

La actividad de TORC2 también se encontró severamente disminuida en

animales mutantes para *pütrü*. Esta baja podría explicarse por los cambios observados en la proporción de ribosomas en la fracción de polisomas, debida posiblemente a una reducción importante en el ensamblaje de los complejos iniciadores de la traducción debido a la baja fidelidad de la interacción de la maquinaria traduccional con el tRNA iniciador sin modificar. En consecuencia se formará una menor cantidad de ribosomas 80S, lo cual no permitiría la activación efectiva de TORC2, observándose la baja en la actividad de este complejo. Así, la caída en la actividad de TORC2 viene posiblemente dada por una falla generalizada en la maquinaria de traducción. Consistentemente, este razonamiento, aplicado de manera inversa, explica de forma perfecta los resultados obtenidos al aumentar la cantidad de tRNAs modificados con t⁶A.

2.1. ¿Son los cambios en la actividad de TOR la razón subyacente de los fenotipos observados?

Nuestros resultados muestran que la activación de la vía insulina/TOR no fue suficiente para rescatar los fenotipo de crecimiento evidenciados en los mutantes (Figura 19); un hecho que no inesperado si consideramos que t⁶A tiene un rol estructural esencial para sustentar la función decodificante de un sub-grupo amplio de tRNAs, que incluyen entre otros al tRNA iniciador (Weissenbach y Grosjean 1981, Daugeron y col. 2011, El Yacoubi y col. 2012). La maquinaria de traducción de los mutantes para *pütrü* presenta un defecto estructural en los tRNAs que unen codones ANN, haciéndolos menos eficientes en su actividad de codificadora (Weissenbach y Grosjean 1981), como resultado las señales río-

arriba que estimulan a la maquinaria de traducción no pueden ser correctamente implementadas, llevando a una falla generalizada en la síntesis de proteínas y causando en consecuencia la disminución de tamaño observada en los mutantes. Así, las manipulaciones que hicimos sobre la vía insulina/TOR serán transducidas a la maquinaria de traducción, pero no ejecutadas apropiadamente. Por ejemplo, la sobreexpresión de Rheb (activación directa de TOR) es capaz de activar a TORC1, sin embargo, río-abajo a ésta la maquinaria de traducción no opera correctamente (ya que presenta un defecto estructural severo) y por tanto la síntesis de proteínas y el crecimiento no se verán restaurados. En otras palabras, *pūtrū* es epistático sobre esta vía de señalización Insulina/TOR al realizar una acción que corresponde a un requerimiento estructural para la síntesis de proteínas.

Otra alternativa para explicar el fenotipo de los mutantes de *pūtrū* es que la falta de t⁶A en los tRNAs lleve a problemas en la aminoacilación del tRNA iniciador y de los otros tRNAs del sub-grupo que presentan la modificación t⁶A. Estos al no ser cargados con su amino ácido correspondiente, no podrán participar en la síntesis de proteínas y eventualmente no se podrá sustentar el crecimiento. Sin embargo clones mutantes donde se ha silenciado (Arsham y Neufeld 2009) o nulos para la metionil-tRNA sintetasa, enzima encargad de transferir la metionina a los tRNAs aceptores correspondientes, incluye al iniciador (Liu y col. 2015) no presentan el mismo fenotipo de crecimiento observado en los mutantes de *pūtrū*. Esto nos indica que el fenotipo observado no es causado por defectos en la aminoacilación de tRNAs. Además ha sido

descrito que la aminoacilación de tRNAs no depende de la presencia de t⁶A (Yadavalli y Ibba 2012). Conjuntamente a lo anterior, en los mutantes *pütrü* no se detectó un aumento en la fosforilación de eIF2 α , indicativo de niveles de tRNAs no amino-acilados elevados, como si ocurre en células que han sido privadas de amino ácidos (Wek y col. 1995).

TORC2 ha sido relacionado generalmente con el control del citoesqueleto de actina (Huang y col. 2013) y sólo recientemente se ha asociado a otros procesos como son: la respuesta a la inestabilidad genómica (Weisman y col. 2014), el control de la síntesis de esfingolípidos complejos (Muir y col. 2014), la supervivencia y proliferación a través de Akt en células cancerosas (Read y col. 2013). El rol de TORC2 en el control del crecimiento celular en *Drosophila* es marginal (Lee y Chung 2007) y la fosforilación que ejerce sobre Akt en la serina 505 (Sarbasov y col. 2005) no es necesaria para sustentarlo (Hietakangas y Cohen 2007). La falta de comprensión de los mecanismos que regulan a TORC2 no nos permite explorar de forma más profunda su papel en el fenotipo de los mutantes *pütrü*. La disminución en la actividad de TORC2 sería sólo una consecuencia de la disminución en la fracción de ribosomas traduciendo activamente, ya que para la activación de TORC2 su asociación a ribosomas ensamblados es fundamental (Zinzalla y col. 2011). Así la reducción en la actividad de ambos complejos parece una consecuencia de un sistema traduccional deficiente. De hecho la actividad de TORC1 también se ve disminuida en levaduras que carecen de la modificación 5-metoxicarbonilmetil-2-thiouridina (mcm⁵s²U) en los tRNAs (Scheitdr 2015). Este antecedente junto a

nuestros resultados sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo molecular desconocido que sirve de control de calidad sobre los tRNAs en relación a su función, información que es transmitida a TOR en sus dos complejos. Es interesante notar que los cambios en la actividad de TOR ocurren de forma bidireccional, es decir cuando no hay tRNAs modificados la actividad de los complejos cae severamente, mientras que cuando niveles de estos son altos aumenta.

Se ha mostrado que en condiciones de falta de tRNAs modificados, se favorece el reconocimiento erróneo del codón de inicio y cambios en el marco de lectura durante la síntesis de proteínas (Daugeron y col. 2011). De tal forma, la generación de proteínas aberrantes con alta probabilidad de plegarse incorrectamente puede llevar a un estrés de retículo endoplásmico crónico, activando la UPR (*Unfolded Protein Response*); respuesta fisiológica activada cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico (Ryoo y Steller 2007). Sin embargo, en los mutantes para *pütrü* no se detectó activación de este proceso (Figura 20). Esto sugiere que, para el momento de desarrollo analizado, la UPR no juega un papel en la disminución de la actividad de los complejos TOR en los mutantes *pütrü*. Otra antecedente importante es que no se detectó variaciones en la fosforilación de eIF2 α (Figura 20B), revelando además que los mutantes no carecen de amino ácidos (Williams y col. 2001) o sufren otros tipos de estrés (Wek y col. 2006) que de cuenta de la baja actividad de los complejos TOR. Por otro lado, resultados que obtuvimos utilizando interferentes contra *Pütrü*, muestran que la UPR si se encuentra

activada en estas condiciones (Anexo 12, Figura S17) (Rojas-Benitez y col. 2013). Sin embargo, la condición de silenciamiento no es tan severa como la de los mutantes de *pūtrū* y es posible entonces que en el tiempo que fueron analizados la UPR ya no se encuentre activa tras haber enfrentado condiciones severas y crónicas de estrés o se haya bloqueado de manera importante la traducción. Cuando el UPR se mantiene activo por tiempos prolongados se induce apoptosis (Urta y col. 2013), y así otra explicación tentativa es que las células que sufrieron activación crónica fueron eliminadas, mientras que las que constituyen a los mutantes son las que fueron capaces de lidiar con el estrés crónico y sólo se afectó su crecimiento.

3. La maquinaria de síntesis de t⁶A es universalmente conservada

Importantes lecciones se han aprendido del estudio de los *Mollicutos*, una clase monofilética de bacterias que han adoptado un estilo de vida parasítico. Estos organismos durante su co-evolución con sus hospederos eucariotes han perdido progresivamente genes involucrados en la síntesis de metabolitos que se encuentran disponibles en sus hospederos (Weisburg y col. 1989). Así, sus genomas son mucho más reducidos (580-1840 kpb) que los de bacterias modelo (4.215-4639 kpb). Sin embargo, estas bacterias son capaces de sintetizar su DNA, RNA y todas las proteínas requeridas para sustentar su estilo de vida (Yus y col. 2009). Dentro de los genes que han sido conservados en la mayoría de estas bacterias se encuentran los que codifican para los ortólogos de *KAE1* y *SUA5*, ambos necesarios para síntesis de t⁶A (Deutsch y col. 2012). Esto sugiere que esta modificación es importante para la función de la maquinaria de traducción en todos los organismos (Grosjean y col. 2014). La conservación es extensa, sin embargo en nuestros resultados, la complementación de levaduras mutantes con los ortólogos de *Drosophila* sólo fue parcial, de hecho, los niveles de t⁶A no fueron reestablecidos en los mutantes para *KAE1* y *BUD32* cuando fueron transformados con el correspondiente ortólogo de *Drosophila*. Es un resultado inesperado, considerando que la identidad entre las proteínas es cercana al 60%, sugiriendo que cumplen funciones similares. Sin embargo proponemos una explicación. El rescate de los mutantes para *KAE1* y *BUD32* no se ve acompañado por un aumento detectable en los niveles de t⁶A, una

posibilidad es que estas proteínas rescaten el crecimiento lento por una función distinta a la síntesis de esta modificación. Por otro lado, es también posible que tanto Pürü como Prpk, al ser proteínas que forma un complejo (Mao y col. 2008) tengan una regulación recíproca que únicamente puede darse eficientemente al interactuar con la proteína compañera de la misma especie.

4. Ensayos de HPA^t6A y su contribución metodológica en la detección de tRNAs modificados con t⁶A

Los RNAs endógenos de una célula sufren una enorme gama de modificaciones post-transcripcionales (El Yacoubi y col. 2012, Jaffrey 2014). Su detección no es simple y una diversidad de métodos han sido utilizados (Giessing y Kirpekar 2012). Existen métodos basados en transcripción reversa, que son de bajo costo, pero requiere el uso de moléculas radiactivas y sus resultados son confusos de interpretar (Motorin y col. 2007). Los basados en cromatografía son otra alternativa, sin embargo requieren una cantidad considerable de tRNAs, su digestión hasta nucleósidos y el uso de equipos sofisticados y de alto costo (Lakings y Gehrke 1971). Los mejores métodos para la detección de nucleótidos modificados son los que se basan en espectrometría de masas, que se han utilizado extensamente para el estudio de modificaciones post-traduccionales en proteínas y ha sido adaptado exitosamente al estudio de ácidos nucleicos (Douthwaite y Kirpekar 2007, Giessing y Kirpekar 2012). Sin embargo este tipo de métodos también requiere equipos sofisticados y de alto costo. En el afán de detectar los tRNAs con modificaciones adaptamos una metodología basada en las interacciones Watson-Crick de sondas con regiones particulares del tRNA que ha sido exitosamente utilizada para la detección de una modificación análoga a t⁶A, la N⁶-isopentenil-adenosina (i⁶A); i⁶A se encuentra en posición 37 en los tRNAs que reconocen codones del tipo UNN (Laten y col. 1978, El Yacoubi y col. 2012). La metodología establecida no requiere equipos sofisticados, reactivos de

alto costo o grandes cantidades de tRNAs purificados (con alrededor de 100 ng es posible realizar los ensayos). Esto la posiciona como una excelente alternativa rápida y de bajo costo para el estudio de cambios en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A en diversos escenarios, por ejemplo durante el desarrollo y de manera tejido-específica. Incluso la técnica, al basarse en hibridación, podría en teoría ser adaptada para detectar los tRNAs con modificaciones directamente en animales completos (*Drosophila*, pez cebra, embriones de *Xenopus*, etc) o bien en cortes histológicos, incluyendo biopsias de pacientes con diversas patologías.

5. Los tRNAs como reguladores de procesos biológicos, posibles roles de modificaciones post-transcripcionales

Más allá de su rol canónico en la síntesis de proteínas, los tRNAs también llevan a cabo funciones adicionales tanto en procariontes como en eucariontes. Se ha mostrado que los tRNAs no cargados (sin un amino ácido asociado) participan como sensores de los niveles de amino ácidos (Hinnebusch 2005) y regulan la degradación de proteínas citosólicas (Mogk y col. 2007). Además los tRNAs son fragmentados, no de manera azarosa pero constituyendo moléculas funcionales que regulan la síntesis de proteínas y la transcripción (Lee y col. 2009); controlando los mRNAs que serán traducidos y también actuando como microRNAs (miRNAs) específicos (Maute y col. 2013). Incluso se ha mostrado que los tRNAs pueden regular la activación de la apoptosis a través de la vía intrínseca al interactuar específicamente con Caspasa-9 y Citocromo-c, inhibiendo la formación del apoptosoma (Mei y col. 2010). Estas son funciones regulatorias que están empezando a comprenderse, sin embargo no se conoce cuál es la relación de éstas con las modificaciones post-transcripcionales presentes en los tRNAs.

6. Investigación a futuro relacionada con t⁶A

Este trabajo ha revelado un rol determinante de los tRNAs modificados con t⁶A sobre el crecimiento celular en *Drosophila* y *S. Cerevisiae*, sugiriendo que esta relación es conservada en eucariontes. La posibilidad de que TOR, directa o indirectamente, pueda censar la proporción de tRNAs modificados con t⁶A muestra que TOR no es sería capaz de regular la síntesis de tRNAs, sino que también aseguraría la provisión de una maquinaria de traducción funcional, capaz de satisfacer los requerimientos traduccionales de un momento y estado celular determinado. La relación de TOR y los tRNAs modificados con t⁶A puede ser un aspecto interesante de explotación en biomedicina aplicada. La rapamicina y otros inhibidores de TOR han sido ampliamente utilizados como inmunosupresores, administrados especialmente en casos de trasplante para impedir el rechazo (Somers y Paul 2014). Así también la desregulación de la actividad de TOR ha sido relacionada con el origen y progresión de diversos tipos de cáncer (Blachly y Baiocchi 2014, Ciruelos Gil 2014, Fumarola y col. 2014). Buscar moléculas que inhiban la síntesis de t⁶A puede constituir una buena opción como terapias complementarias a las ya utilizadas que se basan en la inhibición de TOR. De hecho la excreción de t⁶A en la orina fue utilizada como un indicador de metástasis en cáncer de mama (Vold y col. 1986). La relación entre tRNAs modificados con t⁶A y el cáncer ha sido poco abordada, siendo este un campo fértil para la investigación con proyecciones biomédicas.

Un aspecto que ha permanecido sin estudio, es cómo cambia t⁶A durante

el desarrollo o durante los procesos de diferenciación. Esta es una tarea compleja de abordar, no obstante implementar un sistema de análisis *in situ* sería muy ventajoso. Por otra parte, utilizar un organismo modelo de mayor tamaño facilitaría el estudio, por ejemplo se puede utilizar ratones o ratas para estudiar t⁶A en relación al desarrollo del animal o de un órgano en particular. Incluso se pueden utilizar células en cultivo que presenten distintos ritmos de proliferación como prueba de concepto. Un sistema particularmente interesante son los linfocitos que pueden ser activados *in vitro*, recreando una situación de inflamación. Ésta se ha mostrado guarda una correlación con los niveles del tRNA iniciador (Cooper y Braverman 1981). En este sentido, el papel que t⁶A tenga en este tipo de procesos no ha sido abordado a la fecha aun cuando *PRPK* fue identificado como un mensajero que aumentaba en condiciones de estimulación con IL-2. Finalmente, las levaduras son una opción para estudiar cómo cambia la proporción de tRNAs modificados durante las diferentes fases del ciclo celular y también en respuesta a nutrientes u otras condiciones ambientales.

La interdependencia de la presencia de t⁶A con la síntesis de otras modificaciones post-transcripcionales permanece en el misterio. El advenimiento de nuevas tecnologías para el estudio de las modificaciones de tRNAs está permitiendo el estudio de éstas de manera sistémica (Chan y col. 2012). En resumen, el estudio de t⁶A, su relación con la fisiología celular y la síntesis de otras modificaciones post-transcripcionales de tRNAs u otras especies de RNAs es en este momento un tópico de enorme interés y proyección futura.

CONCLUSIONES

1. *pütrü*, el ortólogo de *KAE1* es requerido para la síntesis de t⁶A en *Drosophila melanogaster*
2. Los tRNAs modificados con t⁶A son necesarios para el crecimiento autónomo-celular y del organismo
3. La proporción de tRNAs modificados con t⁶A es limitante para el crecimiento en eucariontes
4. La actividad de TOR es determinada por los niveles de tRNAs modificados con t⁶A
5. *pütrü* es epistático a la vía insulina/TOR y componentes del UPR

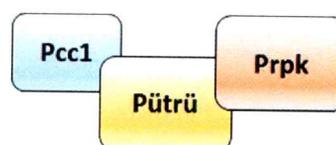
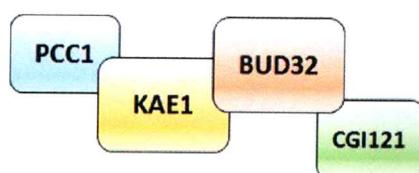
ANEXOS

Anexo 1

A

Complejo KEOPS/EKC *S. cerevisiae*

Complejo KEOPS/EKC *Drosophila*



B

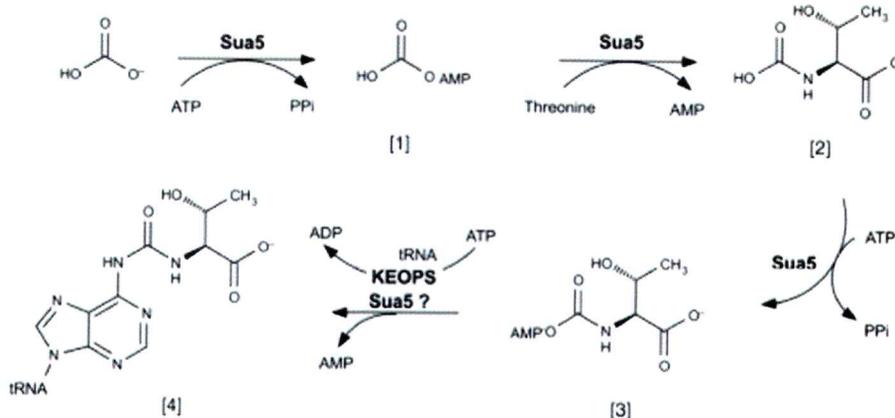


Figura S1: El complejo KEOPS/EKC y mecanismo de síntesis de t⁶A

(A) Esquemas representando la composición del complejo KEOPS/EKC en levadura y *Drosophila melanogaster*. (B) Mecanismo de síntesis de t⁶A. Cada paso es catalizado por la enzima indicada sobre las flechas. Las primeras 2 reacciones son catalizadas por Sua5. La activación del bicarbonato a carboxi-AMP [1], condensación de éste con treonina para formar el carbamoiltreonina [2]; activación del carbamoiltreonina a carbamoiltreoniladenilato [3]; transferencia de este adenilato al sitio activo de Kae1/YgjD donde una segunda condensación tiene lugar para formar el tRNA modificado con t⁶A (tRNA-t⁶A) [4].

Anexo 2

Como modelo de estudio, *Drosophila melanogaster* ha mostrado tener el potencial de combinar aproximaciones genéticas y moleculares para abordar el estudio de la expresión y de la función de genes, de tópicos de biología celular, molecular relacionadas con el desarrollo y la neurobiología. Dentro de la larga lista de ventajas del modelo, destaca su corto ciclo de vida (Figura S2A), el bajo costo de mantención de los individuos, una progenie numerosa y poseer un desarrollo externo altamente estereotipado que permite evidenciar diferencias fenotípicas fácilmente. El genoma de *D. melanogaster* se encuentra completamente secuenciado y anotado de manera muy precisa. Esto mostró que un importante número de genes encontrados en este animal se encuentran conservados en vertebrados, permitiendo la extrapolación de los resultados obtenidos a otros organismos como ratón y humanos.

Drosophila ha sido utilizado como un modelo genético por más de cien años, es su reducido número de cromosomas el que ha permitido su posicionamiento como un organismo modelo genético de primera línea. *D. melanogaster* posee 4 pares de cromosomas: un par sexual, X e Y además de 3 somáticos: 2, 3 y 4 (Figura S2B).

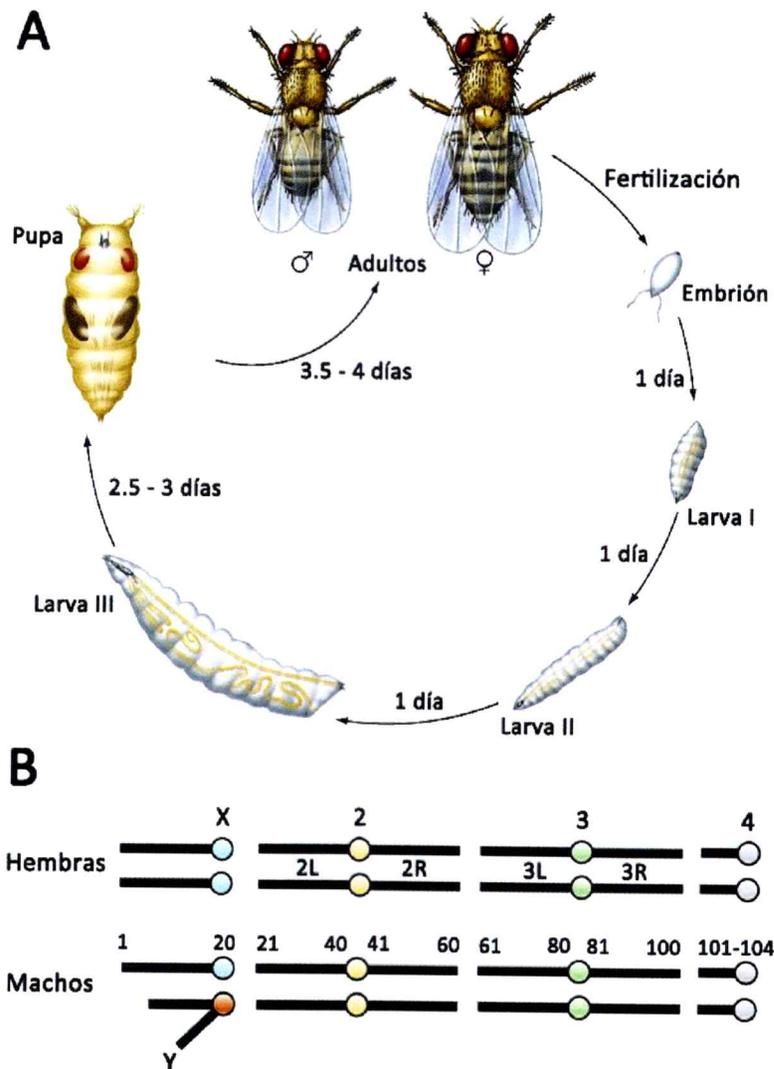


Figura S2: El ciclo de vida de *D. melanogaster* y sus cromosomas.

(A) Existen cuatro etapas en el ciclo de vida de este animal: embrión, larva, pupa y adulto o imago. Existen 3 estadios en la etapa larvaria, cada uno separado por períodos de muda. Luego de ellos, es en el pupario donde ocurre la metamorfosis. A una temperatura constante de 25°C se generarán nuevos adultos en aproximadamente 10 días. La vida del adulto puede durar varias semanas. (B) Se esquematiza los 4 pares de cromosomas que posee *D. melanogaster*. En la parte superior se indica la identidad del cromosoma (X, Y, 2, 3 ó 4). La leyenda inferior (2L, 2R, 3L y 3R) se refiere a la identidad de los brazos del cromosoma correspondiente, L para el izquierdo y R para el derecho. El cromosoma X y 4 poseen un brazo izquierdo grande y casi no presentan el derecho. Los números sobre los cromosomas de los machos corresponden a las posiciones citológicas determinadas por la observación de cromosomas politénicos.

Un aspecto que permitió el desarrollo de *Drosophila* como un excelente modelo genético es la capacidad de mantener e identificar mutaciones y/o transgenes por generaciones. Mediante el uso de cromosoma balanceadores (o simplemente balanceadores) en estos animales se puede mantener por generaciones un cromosoma modificado de interés por un número indefinido de generaciones. Los balanceadores son cromosomas que han sufrido una extensa reordenación de su secuencia por inversión y translocaciones que el resultado de cualquier recombinación meiótica que tenga lugar durante la ovogénesis (sólo las hembras recombinan) no es viable, asegurando la transmisión del cromosoma homólogo intacto a la siguiente generación. Además, cada balanceador posee un marcador dominante, fácilmente reconocible. Existen balanceadores para los cromosomas X, 2 y 3; el cromosoma Y no posee genes relevantes para el desarrollo de los machos, pero si algunos relacionados con la movilidad de los espermatozoides. El cromosoma 4 es tan pequeño y su densidad génica es tan baja que no se utiliza para efectos prácticos.

Nomenclatura

En este trabajo, se utilizó la nomenclatura simplificada. Para ilustrar de mejor forma la nomenclatura, revisamos un ejemplo:

y,w/w; +/UAS-GFP; hh>Gal4, UAS-RFP/Tb

Los cromosomas se escriben en orden, partiendo por X, en la izquierda y hacia la derecha el resto, terminando con el cromosoma 3. Ni el cromosoma Y ni

4 son indicados. Cada uno de ellos se separa por un signo ;. Los elementos que se encuentran en el mismo cromosoma son separados por , y los cromosomas homólogos se separan con /. Las letras minúsculas representan mutaciones recesivas, mientras que las mayúsculas hacen lo propio con las dominantes. Las secuencias bajo el control de UAS se indican con un – (por ejemplo, UAS-GFP), mientras que los drivers con un signo > (hh>Gal4, por ejemplo). De tal forma, el ejemplo indica un animal hembra, que es mutante heterocigoto para el gen *yellow* (*y*), homocigoto para *white* (*w*) en el cromosoma x; uno de sus cromosomas 2 es silvestre, mientras que el homólogo posee una inserción UAS-GFP, uno de los cromosomas 3 tiene un *driver* que se indica hh>Gal4 y una inserción UAS-RFP y el homólogo la mutación dominante *Tb*. Cuando se indica sólo un cromosoma, esto implica que el animal es homocigoto para éste.

Anexo 3

El sistema Gal4/UAS

Utiliza el factor de transcripción de levadura Gal4 para dirigir la expresión de secuencias acopladas a la secuencia activadora UAS (*Upstream Activating Sequence*). La mayoría de las cepas UAS (Tabla 1) y Gal4 (Tabla 2) están disponibles para la comunidad científica en diversas colecciones como se indica en cada tabla.

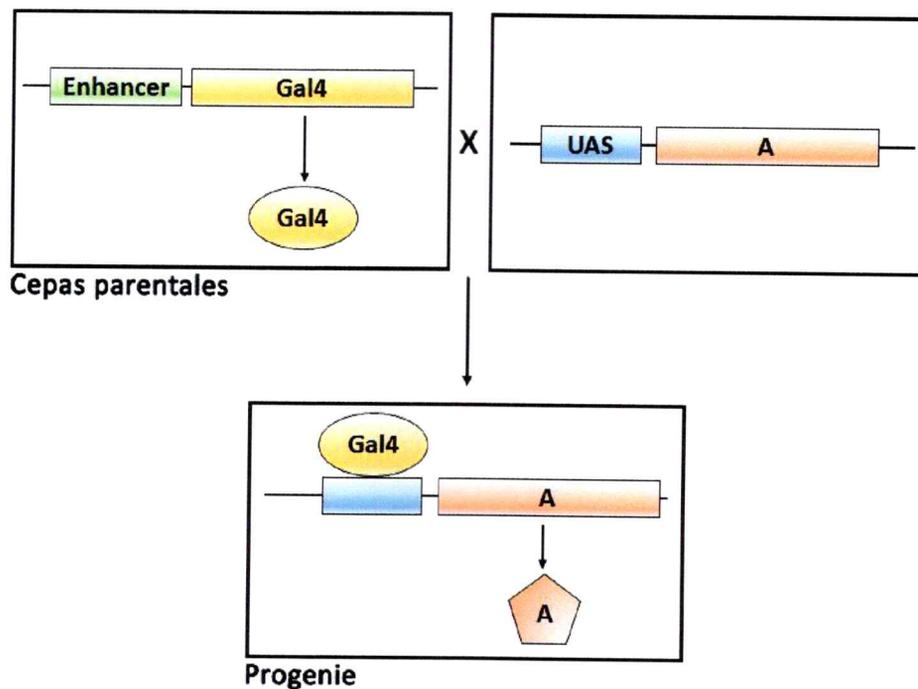


Figura S3: Esquema general del sistema bipartito Gal4/UAS

Los experimentos en rasgos generales se realizan cruzando moscas transgénicas que expresen Gal4 bajo un *enhancer* particular (tejido específico o ubicuo) con animales que poseen insertada una construcción donde la secuencia de interés, en este caso "A" se encuentra bajo el control de un elemento UAS. En la progenie de este cruce, Gal4 es capaz de unirse a la secuencia UAS activando la transcripción de la secuencia A

Configuración FLP-out

Esta configuración permite generar animales mosaico que expresen distintos elementos de interés bajo el control de un Gal4 con expresión ubicua o específica.

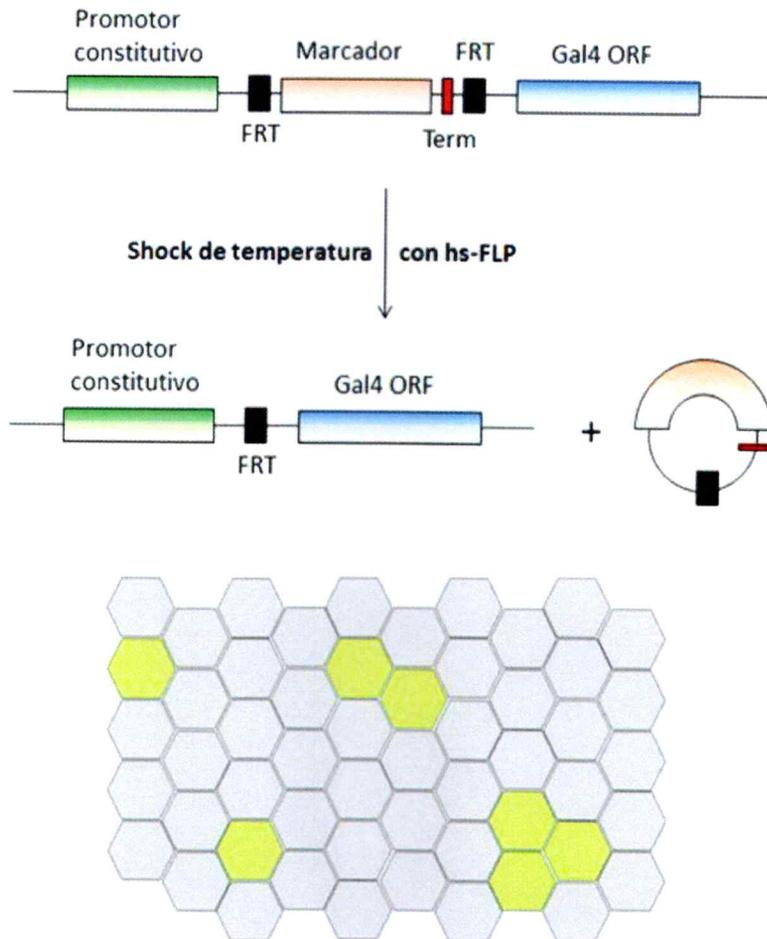


Figura S4: Esquema de la configuración FLP-out

En esta construcción, el promotor se encuentra bloqueado y no puede activar la expresión del Gal4 río-abajo. Cuando la recombinasa FLP elimina *in cis* la región entre los sitios FRT, empieza la transcripción del Gal4 que activa las secuencias bajo el control de UAS que se encuentran en la célula. Generalmente se incluye una secuencia UAS-GFP para identificar las células donde ha ocurrido la recombinação. En esta configuración, para generar clones no se requiere que las células estén en mitosis.

Clones mitóticos

Cuando una mutación en particular es letal para el animal, en *Drosophila* este escollo puede ser superado por la generación de células mutantes homocigotas y silvestres en un fondo de mutantes heterocigotas, pudiendo así comparar diversos parámetros de interés en un tejido particular.

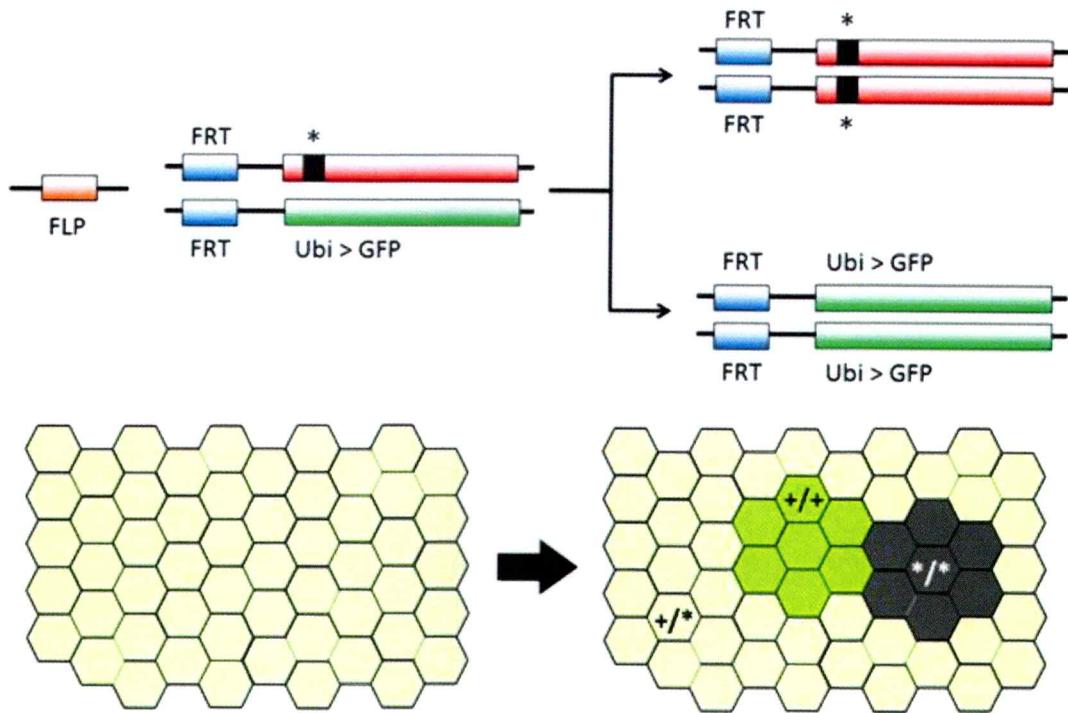


Figura S5: Generación de clones mitóticos

Luego de inducir la flipasa (FLP) mediante un golpe de alta temperatura, los cromosomas homólogos sufren una recombinación en sitios FRT específicos. Si la recombinación ocurre en una célula que es mutante heterocigota para un gen de interés, luego de su división dará origen a dos poblaciones celulares, una homocigota para la mutación (clon mutante) y otra que no posee la mutación (*twin*). Generalmente se utiliza un marcador, ubicado en *trans* al gen mutante en la célula parental para identificar las poblaciones. Las mutantes carecen del marcador, las heterocigotas presentan el marcador (GFP en este caso) y las silvestres presentan dos copias del marcador (mayor intensidad de GFP). La recombinación sólo ocurrirá en células que se encuentren en mitosis.

Anexo 4

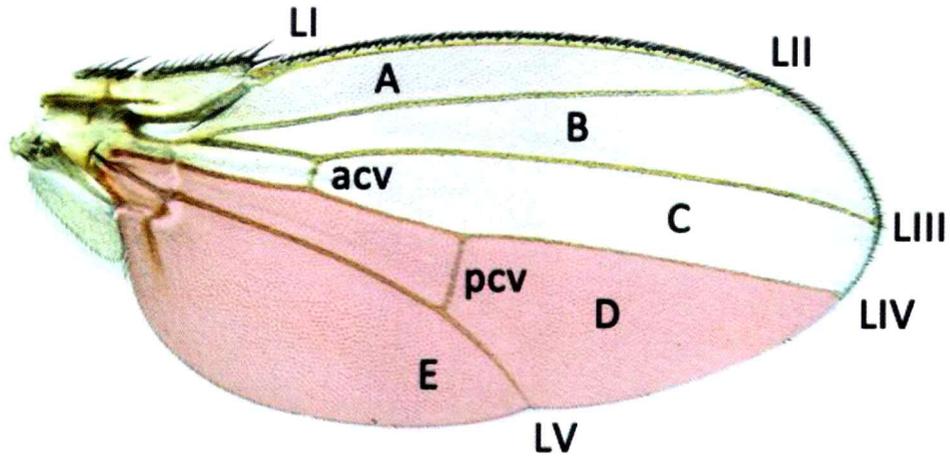


Figura S6: Anatomía del ala adulta de *Drosophila melanogaster*.

Este órgano está compuesto por 5 venas longitudinales, numeradas LI-LV y dos venas transversales, una anterior (acv, *anterior cross vein*) y una posterior (pcv, *posterior cross vein*). Además se indican los sectores delimitados por las venas (A-E). Coloreado en rojo se indica la región del ala que se midió como el compartimiento posterior. Para determinar la densidad celular se contó en el sector C o E el número de células por un área determinada.

Anexo 5

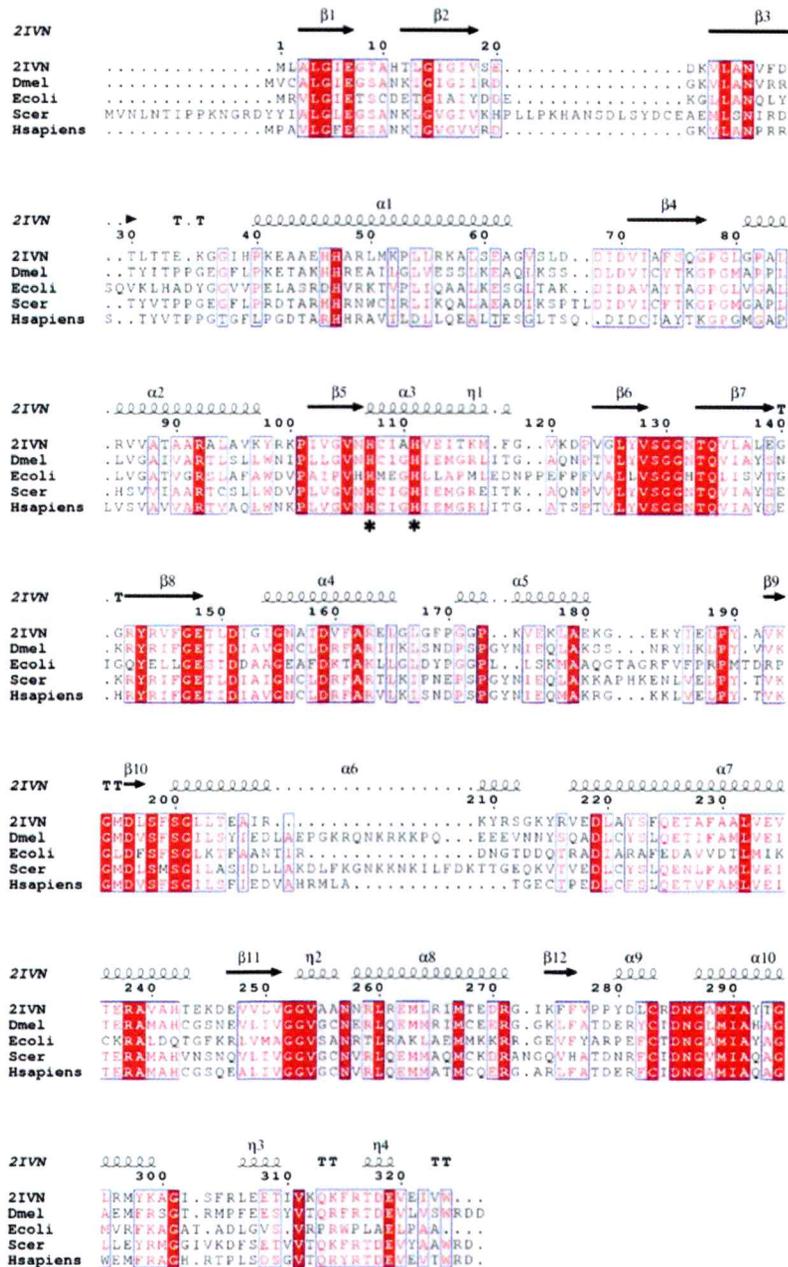


Figura S7: Representación esquemática de la familia Kae1/YgjD.

Alineamiento de proteínas pertenecientes a la familia Kae1/YgjD. Las cajas rojas indican residuos conservados. Los residuos necesarios para la actividad de las proteínas (sitio activo) se encuentran indicados por un asterisco de color negro. Cada secuencia está asociada a un código: *Pyrococcus Abbsi* (2IVN), *Drosophila melanogaster* (Dmel), *Escherichia coli* (Ecoli), *Saccharomyces cerevisiae* (Scer) y *Homo sapiens* (Hsapiens)

Anexo 6

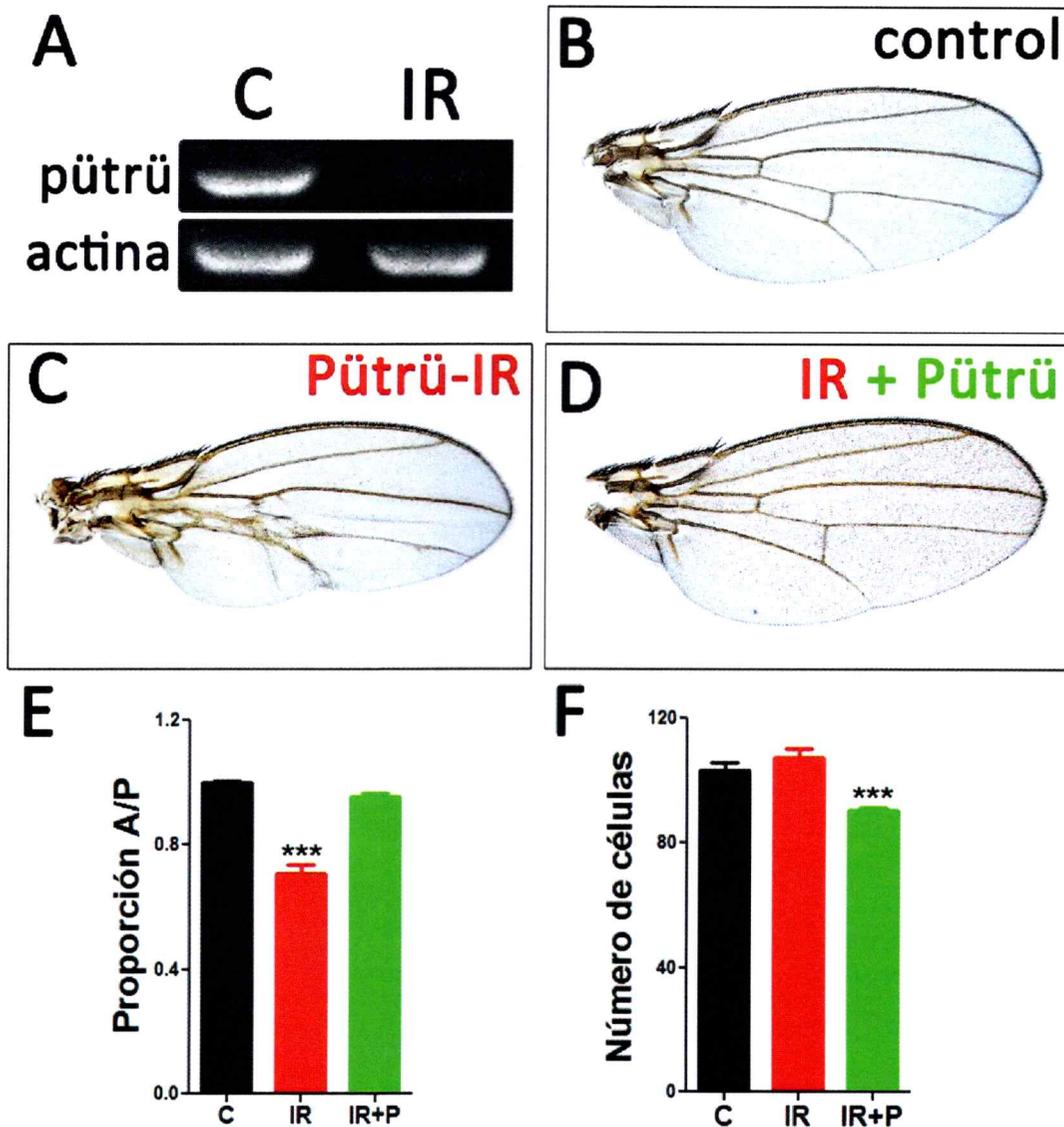


Figura S8: Eficiencia y especificidad del interferente contra Pütrü

(A) RT-PCR representativo de la amplificación del mRNA de Pütrü a partir de cDNA proveniente de larvas en estadio III control o de larvas en las cuales se está silenciando de manera ubicua Pütrü utilizando el *driver da-Gal4*. (B) Ala adulta control, (C) ala adulta en la cual se ha silenciado Pütrü en el compartimiento posterior utilizando el *driver en>Gal4*. (D) Co-expresión del RNA interferente junto con el cDNA de Pütrü. (E) Se midió el área del compartimiento posterior y fue normalizado por la de anterior. (F) Se contó el número de células en un área determinada del compartimiento posterior en distintas condiciones. Para E y F: C es el control, IR el RNA interferente e IR+P corresponde al interferente junto con el cDNA de Pütrü (n=50, *** p<0.005).

Anexo 7

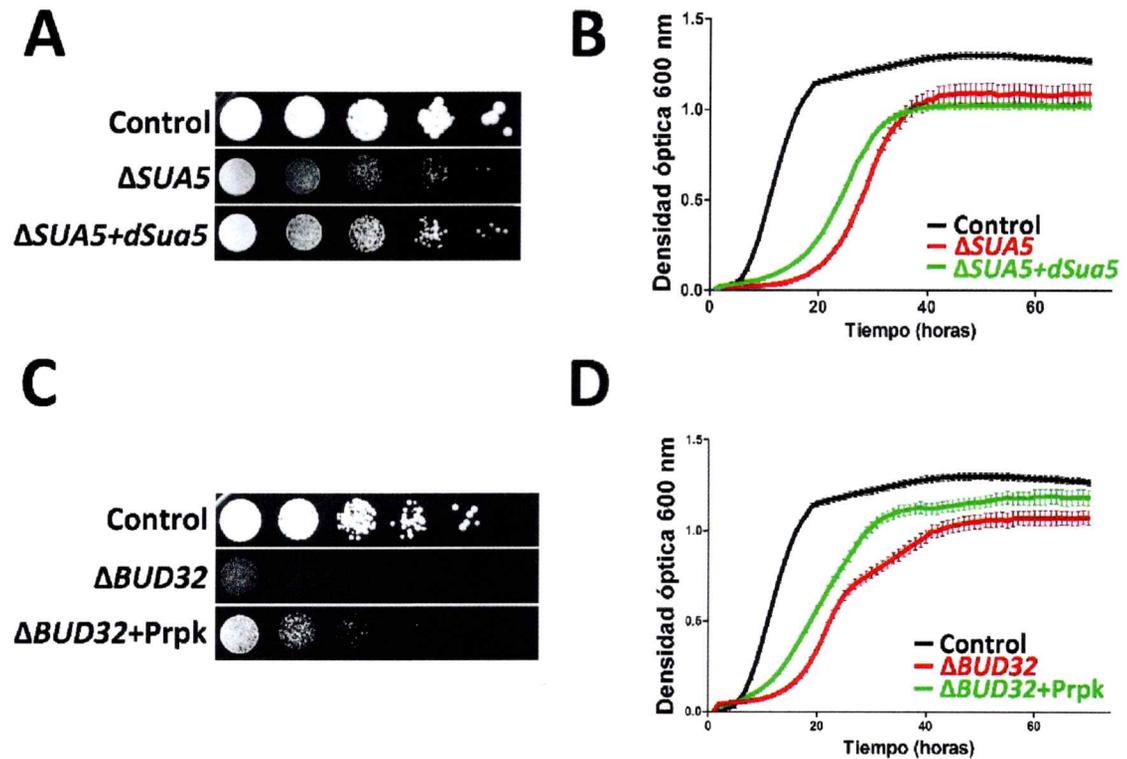


Figura S9: Complementación de levaduras mutantes para *SUA5* y *BUD32*

Levaduras mutantes para *SUA5* y *BUD32* fueron transformadas con un vector de expresión (pYES) que contiene el ORF de Sua5 o Prpk respectivamente, proveniente de *Drosophila* (pYES-dSua5 o -Prpk). (A y C) Los experimentos se hicieron en medio sólido haciendo diluciones seriadas en factor de 10 de una suspensión madre que para todas las condiciones contenía el mismo título de células. Las imágenes son representativas de 4 experimentos independientes. (D y F) Asimismo buscamos la complementación en medio líquido. Me midió los cambios de la densidad óptica (OD a 600 nm) de los distintos cultivos por 100 horas. Cada curva representa el promedio de 10 curvas de crecimiento independientes.

Anexo 8

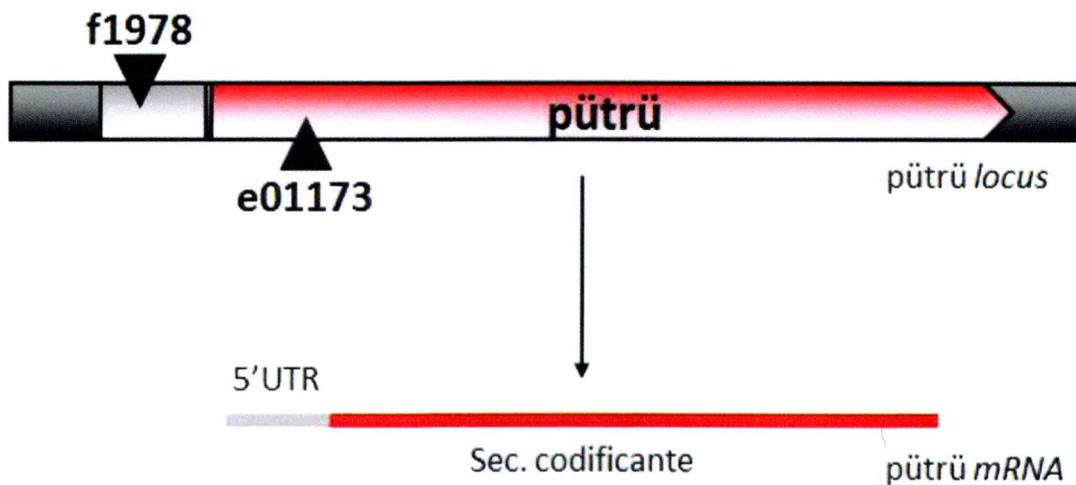


Figura S10: Esquema del *locus pütrü* y las inserciones de los transposones Piggybac

Esquema de los alelos mutantes para *pütrü*. Una de las inserciones se encuentra en la región 5' no traducida (f1978) y la otra se localiza en plena región codificante (e01173). Los genotipos se pueden encontrar en la sección materiales y métodos, Tabla 3.

Anexo 9

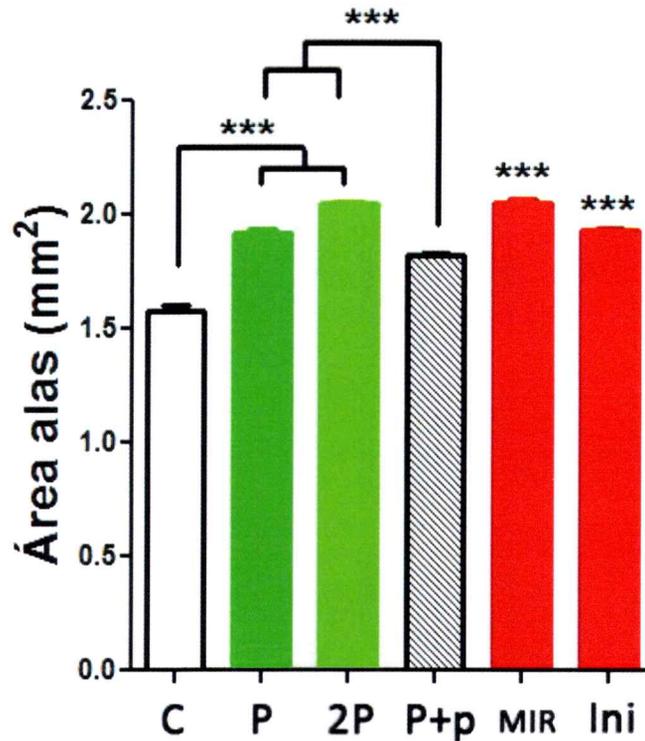


Figura S11: Controles de la sobreexpresión de Pütrü.

Pütrü fue sobreexpresado de manera ubicua utilizando el *driver da>Gal4*. Existe un aumento significativo del tamaño de los animales (barra P), mientras que con 2 copias del UAS (barra 2P) el tamaño de los animales aumenta en mayor medida. La sobreexpresión en condiciones mutantes heterocigotas (barra P+p) inhibe parcialmente el aumento de tamaño. Como control positivo del aumento en el tamaño de los animales silenciamos Maf1 (barra MIR) y también medimos el área de las alas de animales que tienen una copia extra del tRNA iniciador (barra Ini) (Rideout y col. 2012)

Anexo 10

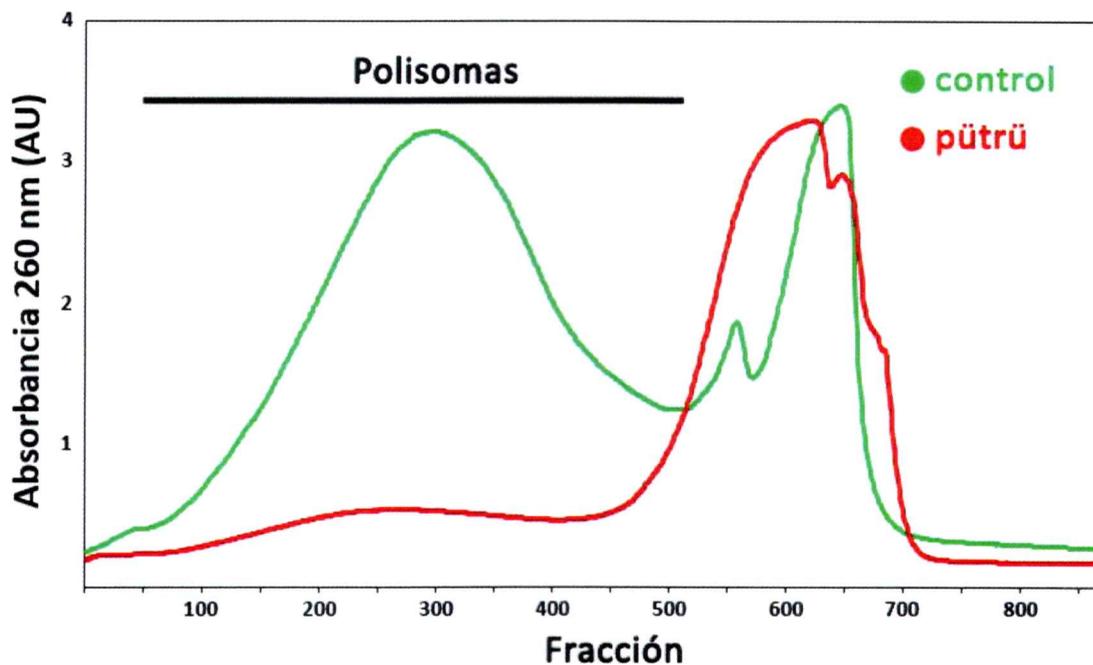


Figura S12: La fracción de polisomas está reducida en mutantes de *pütrü*

Perfil de polisomas representativo de muestras control y mutantes para *pütrü*. Los polisomas, de mayor peso, luego de la centrifugación se desplazan más rápido hacia el fondo del tubo y aparecen en las primeras fracciones en el detector, mientras que los ribosomas libres, más livianos, se mantienen en la parte superior. La región hasta la cual migran los polisomas, se identificó haciendo extracciones con tampón libre de cationes divalente y agentes quelantes, impidiendo la formación de polisomas.

ANEXO 11

Resultados: Silenciamiento de Pütrü para buscar relaciones funcionales

La condición de falta de función de *pütrü* es tan severa que no permite establecer relaciones funcionales. Por eso, decidimos utilizar una estrategia alternativa, para generar condiciones de análisis menos severas, silenciando Pütrü en el compartimiento posterior del ala con un invertido repetido eficiente y específico que activa el RNA de interferencia contra el mRNA de Pütrü. Observamos una disminución del área del compartimiento posterior, acompañado con problemas en la formación de venas (Figura S13B y F). En combinación con uno de los alelos mutantes de *pütrü*, el fenotipo se ve acentuado, tanto que no pudimos medir el área del compartimiento posterior (Figura S13C y F). La expresión del cDNA de Pütrü en condiciones de silenciamiento rescató significativamente el fenotipo, tanto en la formación de venas como en el área del compartimiento (Figura S13D y F). La expresión de Prpk no revirtió el fenotipo de tamaño, sin embargo el de formación anormal de venas se vio parcialmente rescatado (Figura S13E y F).

El cambio en la morfología de las venas longitudinales del ala nos sugiere que durante la generación de este órgano hay un aumento en la apoptosis de las células imaginales que podría explicar el fenotipo macroscópico observado. Para poner esto a prueba, junto con silenciar Pütrü expresamos dos inhibidores distintos de la apoptosis: la proteína p35 del *Baculovirus* (Hay y col. 1994) y una forma dominante negativa de Basket, el ortólogo de JNK en *Drosophila*, una

quinasa relacionada con la activación de la apoptosis (McEwen y Peifer 2005). La expresión de ambas proteínas rescató el fenotipo de formación de venas (Figura S14A-D), sin embargo el área del compartimiento posterior no se recuperó (Figura S14E). Detectando Caspasa-3 activada se confirmó que las células en que Pütrü fue silenciada entran en apoptosis (Figura S14F). Los resultados sugieren que el fenotipo de crecimiento no es causado únicamente a un aumento en la apoptosis en las células del disco imaginal.

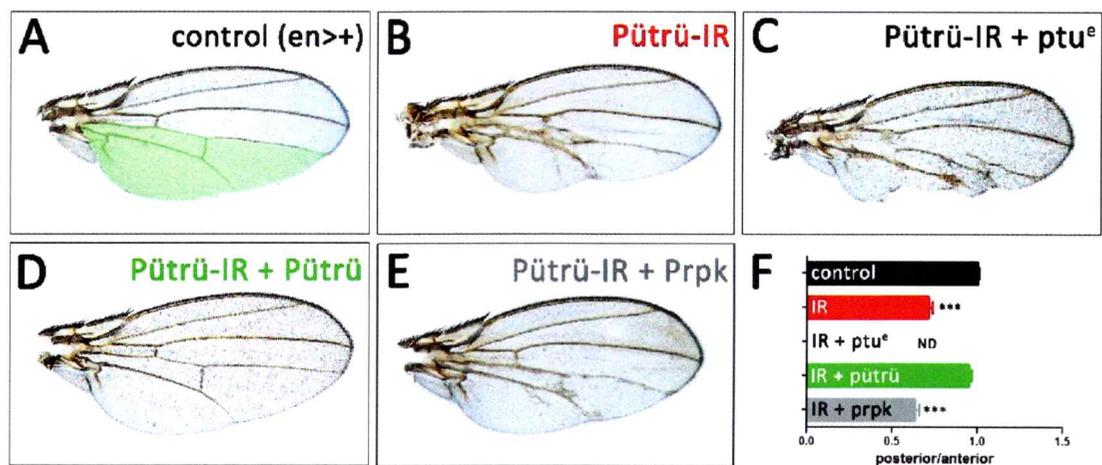


Figura S13: Fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü en el compartimiento posterior del ala adulta

(A) Ala adulta control. Posterior está coloreado en verde. (B) Silenciamiento de *putrü* en el compartimiento posterior. (C) Expresión del invertido repetido de Pütrü en un fondo genético heterocigótico mutante para *pütrü*. (D) Se silenció Pütrü y simultáneamente se expresó su cDNA. (E) Silenciamiento de Pütrü y simultáneamente se expresó el cDNA de Prpk. (F) Se grafica una proporción entre el área del compartimiento posterior y anterior (P/A) (n=50, ANOVA $p < 0.005$).

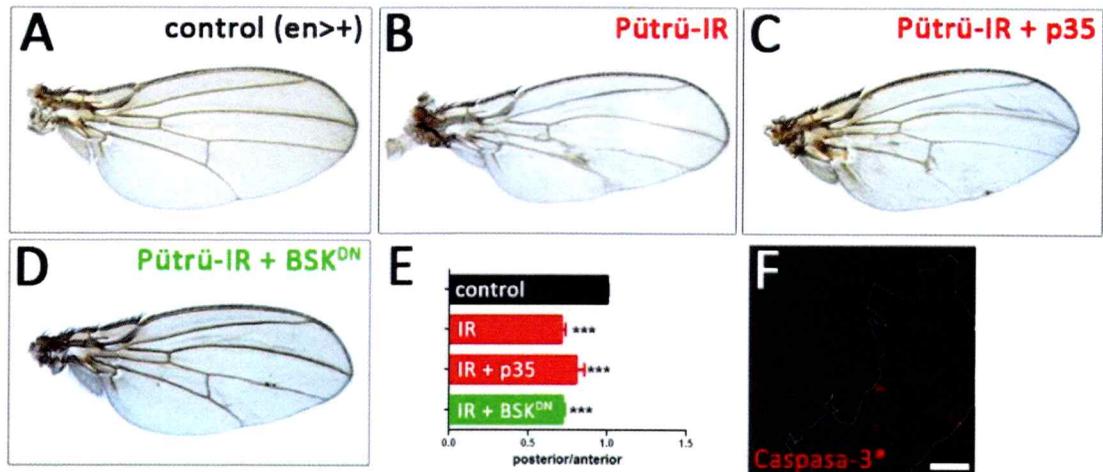


Figura S14: Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü utilizando inhibidores de la apoptosis

(A) Ala adulta control (B) Silenciamiento de Pütrü en el compartimiento posterior. (C) Silenciamiento de Pütrü y expresión de p35. (D) Silenciamiento de Pütrü y expresión de una versión dominante negativa de Basket (BSK^{DN}). (E) Se grafica una proporción entre el área del compartimiento posterior y anterior (P/A) (n=50, ANOVA $p < 0.005$). (F) Inmunofluorescencia contra Caspasa-3 activada (rojo) en un disco imaginal de ala en el cual se ha silenciado Pütrü en el compartimiento posterior, que se muestra delimitado por una línea blanca.

En condiciones de silenciamiento de Pütrü en la región del disco imaginal que da origen al ala propiamente tal, pusimos a prueba si la modificación de la actividad de la vía insulina/TOR rescataba el fenotipo. En este caso se usó el driver *nubbin-Gal4* (*nub>Gal4*); el silenciar Pütrü se observa una desaparición de las alas (Figura S15B), lo cual es revertido cuando se expresó Pütrü (Figura S15C). La expresión de una forma permanentemente activada de PI3K rescató parcialmente el fenotipo (Figura S15D), mientras que el silenciamiento de Tsc-2 (activación de TORC1) o la expresión de S6K activada no lo hicieron (Figura S15E-F). Por otro lado, la expresión de Myc y la adición de un *locus* extra que

codifica para el tRNA iniciador silvestre de *Drosophila* rescataron parcialmente el fenotipo (Figura S15G-H), mientras que la presencia en heterocigosis de una mutación en la proteína ribosomal Rpl14 no rescató (Figura S15I). Estos resultados muestran que la activación de TORC1 por sí solo no es la causa subyacente del fenotipo, sugiriendo que es causado por cambios en otras vías de señalización. Modificaciones de carácter pleiotrópico, como la expresión de PI3K activado y Myc son capaces de rescatar parcialmente, asimismo la adición más tRNA iniciador.

Probamos condiciones de silenciamiento de Pütrü en el ala y expresamos diversos componentes del UPR (Figura S16). La expresión de Xbp-1, Hsc70-3 y EDEM2 rescataron el fenotipo de malformación de venas, sin embargo no recuperaron el área del compartimiento posterior (Figura S16C-F). Los resultados muestran que el estrés de retículo y el UPR están relacionados con el fenotipo observado al silenciar Pütrü. También utilizando un reportero *in vivo* confirmamos la activación del UPR cuando Pütrü es silenciado (Figura S17).

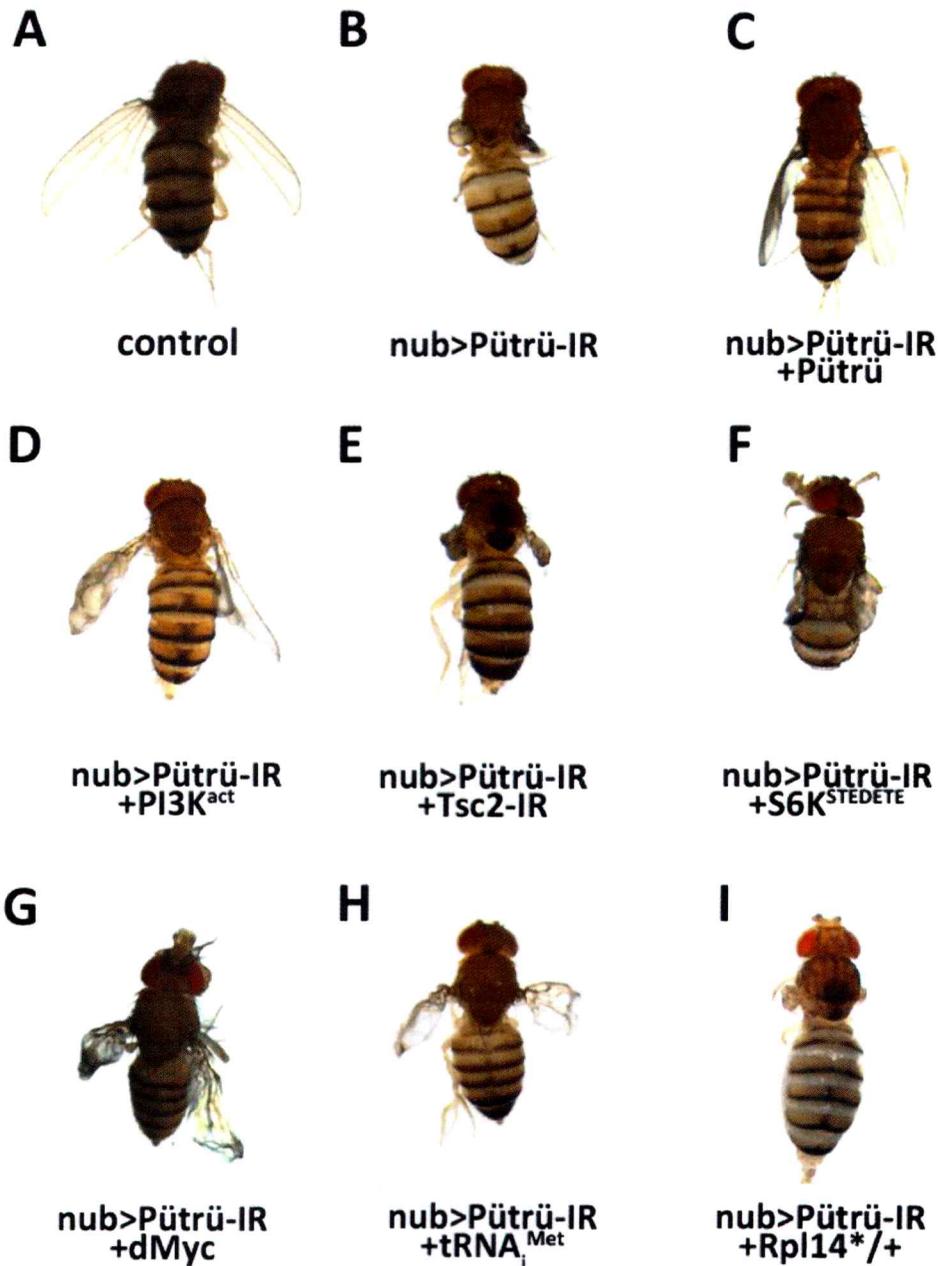


Figura S15: Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü manipulando la actividad de la vía insulina/TOR

(A) Fotografía dorsal de una hembra control (*nub>+*) adulta de *Drosophila*. (B) Silenciamiento de Pütrü usando el driver *nub>Gal4*. Silenciamiento de Pütrü y expresión de (C) Pütrü, (D) una versión activada de PI3K, (E) un invertido repetido de Tsc-2 (activación de TORC1), (F) S6K activada y (G) dMyc. En condiciones de silenciamiento (H) copia extra del tRNA iniciador e (I) presencia en heterocigosis de una mutación en la proteína ribosomal 14.

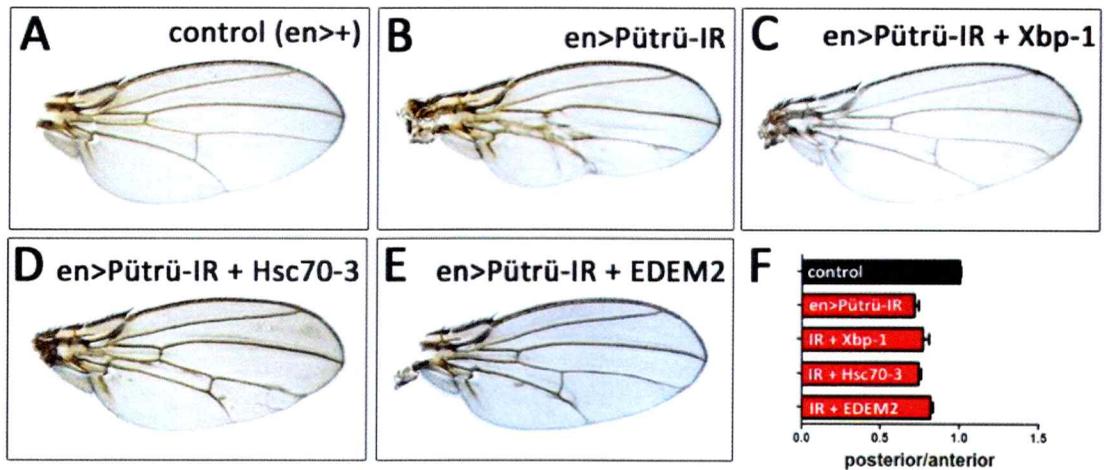


Figura S16: Rescate del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü utilizando componentes del UPR

(A) Ala adulta control (B) Silenciamiento de Pütrü en el compartimiento posterior. (C) Silenciamiento de Pütrü y expresión de Xbp-1, (D) Hsc70-3 (ortólogo de hsp-70), (E) EDEM2 (componente del ERAD). (F) Se grafica una proporción entre el área del compartimiento posterior y anterior (P/A) (n=50, ANOVA $p < 0.005$).

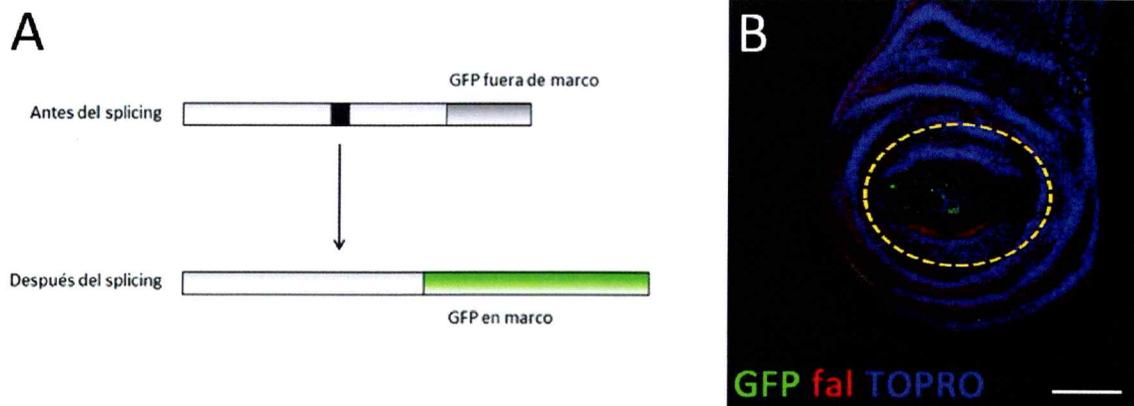


Figura S17: El silenciamiento de Pütrü activa la UPR en células imaginales

(A) Se esquematiza el reportero de activación del UPR utilizado. Se hizo una fusión del cDNA de Xbp-1 con el cDNA de GFP que antes del *splicing*, se traduce una proteína que no incluye a GFP. Al activarse el UPR, el *splicing* ocurre y se genera una proteína de fusión Xbp-1::GFP. Así, en las células que se active el UPR tendrán señal positiva para GFP y mayores niveles de Xbp1. (B) Inmunofluorescencia detectando GFP en un disco imaginal de ala en el cual se silenció la expresión de Pütrü con el *driver nub>Gal4*, su territorio de expresión se encuentra indicado por una línea amarilla punteada. Se utilizó faloidina (fal) para marcar el contorno celular y TOPRO para teñir el núcleo.

Discusión

En conjunto, los resultados obtenidos al silenciar Pütrü en lugar de analizar su falta de función han permitido establecer que en células imaginales, la disminución en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A llevan a la activación del UPR y la apoptosis a través de Basket, probablemente por la presencia crónica de estrés de retículo. Estos resultados apoyan la ocurrencia de problemas en la síntesis de proteínas, como selección errónea del codón de inicio o cambios en el marco de lectura, tal como ocurre en levaduras mutantes para *KAE1* (Daugeron y col. 2011). La expresión de diversos componentes del UPR también rescató parcialmente el fenotipo; la formación de venas se vio recuperada. Sin embargo el tamaño del compartimiento posterior permaneció disminuido, indicando que dicha reducción no se debe a una baja en el número de células, si no que éstas poseen un tamaño menor que las silvestres.

Prpk es un compañero obligado de Pütrü en el complejo KEOPS/EKC (Mao y col. 2008) y se ha mostrado que el primero, promueve la actividad del segundo (Perrochia y col. 2013). Se esperaba que Prpk rescatara parte del fenotipo causado por el silenciamiento de Pütrü, sin embargo esto no ocurrió en relación al tamaño del compartimiento posterior, pero el patrón de venas se rescató parcialmente, indicando que la expresión de Prpk activó a el poco Pütrü remanente, y que ésto restableció los niveles de tRNAs modificados con t⁶A, permitiendo la supervivencia de las células imaginales que forman las venas.

Por otro lado, los resultados relacionados con la activación de la vía insulina/TOR están de acuerdo con lo obtenido con los mutantes, la disminución en la actividad de TOR no es la única causa subyacente al fenotipo observado. La expresión de PI3K activada es una manipulación con efectos pleiotrópicos (Okkenhaug 2013) que no permite establecer un mecanismo por el cual se ve el rescate parcial observado. Una posibilidad es que active a Akt, promoviendo la sobrevivencia y crecimiento de las células imaginales (Scanga y col. 2000). Asimismo ocurrió con la expresión de Myc, que posee efectos pleiotrópicos ya que integra diversas vías de señalización (Gallant 2013). Sin embargo, es sabido que Myc regula la biogénesis de ribosomas y tRNAs, asegurando la integridad de la maquinaria de traducción (Schmidt 1999, Gomez-Roman y col. 2006). De tal forma, una sobre-expresión de Myc lleva a una maquinaria de síntesis de proteínas más robusta, que posiblemente es capaz de suplir la disminución en los niveles de tRNAs modificados con t⁶A. Algo similar a lo que ocurre con la expresión del tRNA iniciador, sin embargo los mecanismos por los cuales éste regula la fisiología celular son al momento desconocidos. En relación a la adición de una mutación en heterocigosis de una proteína ribosomal, esperábamos que disminuyendo el ritmo de síntesis de proteínas como ocurre en los mutantes del tipo *minute* (Saeboe-Larssen y col. 1997) permitiera a la maquinaria de traducción adaptarse a la disminución de los tRNAs modificados con t⁶A, sin embargo esto no ocurrió y el fenotipo no se rescató.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J. A., C. S. Francklyn y S. M. Robey-Bond (2014). "Transfer RNA and human disease." Front Genet **5**: 158.
- Abe, Y., S. Matsumoto, S. Wei, K. Nezu, A. Miyoshi, K. Kito, N. Ueda, K. Shigemoto, Y. Hitsumoto, J. Nikawa y Y. Enomoto (2001). "Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes." J Biol Chem **276**(47): 44003-44011.
- Adamiak, R. W., E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz, J. Okupniak, J. Stawinski y M. Wiewiorowski (1978). "The chemical synthesis of the anticodon loop of an eukaryotic initiator tRNA containing the hypermodified nucleoside N6-/N-threonylcarbonyl/-adenosine/t6A/1." Nucleic Acids Res **5**(6): 1889-1905.
- Arrese, E. L. y J. L. Soulages (2010). "Insect fat body: energy, metabolism, and regulation." Annu Rev Entomol **55**: 207-225.
- Arsham, A. M. y T. P. Neufeld (2009). "A genetic screen in *Drosophila* reveals novel cytoprotective functions of the autophagy-lysosome pathway." PLoS One **4**(6): e6068.
- Bar-Peled, L. y D. M. Sabatini (2014). "Regulation of mTORC1 by amino acids." Trends Cell Biol **24**(7): 400-406.
- Ben-Sahra, I., J. J. Howell, J. M. Asara y B. D. Manning (2013). "Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1." Science **339**(6125): 1323-1328.
- Blachly, J. S. y R. A. Baiocchi (2014). "Targeting PI3-kinase (PI3K), AKT and mTOR axis in lymphoma." Br J Haematol **167**(1): 19-32.
- Broach, J. R. (2012). "Nutritional control of growth and development in yeast." Genetics **192**(1): 73-105.
- Brule, H., H. Grosjean, R. Giege y C. Florentz (1998). "A pseudoknotted tRNA variant is a substrate for tRNA (cytosine-5)-methyltransferase from *Xenopus laevis*." Biochimie **80**(12): 977-985.
- Cai, L. y B. P. Tu (2012). "Driving the cell cycle through metabolism." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 59-87.

- Cantara, W. A., P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. Vendeix, D. Fabris y P. F. Agris (2011). "The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D195-201.
- Chan, C. T., Y. L. Pang, W. Deng, I. R. Babu, M. Dyavaiah, T. J. Begley y P. C. Dedon (2012). "Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins." Nat Commun **3**: 937.
- Ciruelos Gil, E. M. (2014). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer." Cancer Treat Rev **40**(7): 862-871.
- Clandinin, M. T. y G. A. Schultz (1975). "Levels and modification of methionyl-transfer RNA in preimplantation rabbit embryos." J Mol Biol **93**(4): 517-528.
- Claypool, J. A., S. L. French, K. Johzuka, K. Eliason, L. Vu, J. A. Dodd, A. L. Beyer y M. Nomura (2004). "Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes." Mol Biol Cell **15**(2): 946-956.
- Cooper, H. L. y R. Braverman (1981). "Close correlation between initiator methionyl-tRNA level and rate of protein synthesis during human lymphocyte growth cycle." J Biol Chem **256**(14): 7461-7467.
- Crick, F. H. (1968). "The origin of the genetic code." J Mol Biol **38**(3): 367-379.
- Cybulski, N. y M. N. Hall (2009). "TOR complex 2: a signaling pathway of its own." Trends Biochem Sci **34**(12): 620-627.
- Daugeron, M. C., T. L. Lenstra, M. Frizzarin, B. El Yacoubi, X. Liu, A. Baudin-Baillieu, P. Lijnzaad, L. Decourty, C. Saveanu, A. Jacquier, F. C. Holstege, V. de Crécy-Lagard, H. van Tilbeurgh y D. Libri (2011). "Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t⁶A modification of tRNAs." Nucleic Acids Res **39**(14): 6148-6160.
- Dennis, M. D., J. I. Baum, S. R. Kimball y L. S. Jefferson (2011). "Mechanisms involved in the coordinate regulation of mTORC1 by insulin and amino acids." J Biol Chem **286**(10): 8287-8296.
- Deutsch, C., B. El Yacoubi, V. de Crécy-Lagard y D. Iwata-Reuyl (2012). "Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t⁶A), a universal tRNA nucleoside." J Biol Chem **287**(17): 13666-13673.
- Dieci, G., G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann y A. Pagano (2007). "The expanding RNA polymerase III transcriptome." Trends Genet **23**(12): 614-622.
- Douthwaite, S. y F. Kirpekar (2007). "Identifying modifications in RNA by MALDI mass spectrometry." Methods Enzymol **425**: 3-20.

Dupasquier, M., S. Kim, K. Halkidis, H. Gamper y Y. M. Hou (2008). "tRNA integrity is a prerequisite for rapid CCA addition: implication for quality control." J Mol Biol **379**(3): 579-588.

El Yacoubi, B., M. Bailly y V. de Crécy-Lagard (2012). "Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs." Annu Rev Genet **46**: 69-95.

El Yacoubi, B., I. Hatin, C. Deutsch, T. Kahveci, J. P. Rousset, D. Iwata-Reuyl, A. G. Murzin y V. de Crécy-Lagard (2011). "A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification." EMBO J **30**(5): 882-893.

El Yacoubi, B., B. Lyons, Y. Cruz, R. Reddy, B. Nordin, F. Agnelli, J. R. Williamson, P. Schimmel, M. A. Swairjo y V. de Crécy-Lagard (2009). "The universal YrdC/Sua5 family is required for the formation of threonylcarbamoyladenosine in tRNA." Nucleic Acids Res **37**(9): 2894-2909.

Fitch, K. R., G. K. Yasuda, K. N. Owens y B. T. Wakimoto (1998). "Paternal effects in *Drosophila*: implications for mechanisms of early development." Curr Top Dev Biol **38**: 1-34.

Francis, M. A. y U. L. Rajbhandary (1990). "Expression and function of a human initiator tRNA gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **10**(9): 4486-4494.

Fumarola, C., M. A. Bonelli, P. G. Petronini y R. R. Alfieri (2014). "Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer." Biochem Pharmacol **90**(3): 197-207.

Gallant, P. (2013). "Myc function in *Drosophila*." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(10): a014324.

Gangloff, Y. G., M. Mueller, S. G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J. F. Spetz, S. H. Um, E. J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas y S. C. Kozma (2004). "Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development." Mol Cell Biol **24**(21): 9508-9516.

Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen y X. Jiang (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." J Biol Chem **284**(18): 12297-12305.

Giessing, A. M. y F. Kirpekar (2012). "Mass spectrometry in the biology of RNA and its modifications." J Proteomics **75**(12): 3434-3449.

Gilbert, S. F. (2010). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.

Gingold, H., D. Tehler, N. R. Christoffersen, M. M. Nielsen, F. Asmar, S. M. Kooistra, N. S. Christophersen, L. L. Christensen, M. Borre, K. D. Sorensen, L. D.

Andersen, C. L. Andersen, E. Hulleman, T. Wurdinger, E. Ralfkiaer, K. Helin, K. Gronbaek, T. Orntoft, S. M. Waszak, O. Dahan, J. S. Pedersen, A. H. Lund y Y. Pilpel (2014). "A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation." Cell **158**(6): 1281-1292.

Gomez-Roman, N., Z. A. Felton-Edkins, N. S. Kenneth, S. J. Goodfellow, D. Athineos, J. Zhang, B. A. Ramsbottom, F. Innes, T. Kantidakis, E. R. Kerr, J. Brodie, C. Grandori y R. J. White (2006). "Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III." Biochem Soc Symp(73): 141-154.

Green, R. A., E. Paluch y K. Oegema (2012). "Cytokinesis in animal cells." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 29-58.

Grosjean, H., M. Breton, P. Sirand-Pugnet, F. Tardy, F. Thiaucourt, C. Citti, A. Barre, S. Yoshizawa, D. Fourmy, V. de Crecy-Lagard y A. Blanchard (2014). "Predicting the minimal translation apparatus: lessons from the reductive evolution of mollicutes." PLoS Genet **10**(5): e1004363.

Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk y R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.

Hartwell, L. H. (1967). "Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast." J Bacteriol **93**(5): 1662-1670.

Hay, B. A., T. Wolff y G. M. Rubin (1994). "Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*." Development **120**(8): 2121-2129.

Hay, N. y N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.

Heitman, J., N. R. Movva y M. N. Hall (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." Science **253**(5022): 905-909.

Hietakangas, V. y S. M. Cohen (2007). "Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth." Genes Dev **21**(6): 632-637.

Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast." Annu Rev Microbiol **59**: 407-450.

Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro y N. Mizushima (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.

Huang, W., P. J. Zhu, S. Zhang, H. Zhou, L. Stoica, M. Galiano, K. Krnjevic, G. Roman y M. Costa-Mattioli (2013). "mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory." Nat Neurosci **16**(4): 441-448.

Huynh, L. N., M. Thangavel, T. Chen, R. Cottrell, J. M. Mitchell y M. Praetorius-Ibba (2010). "Linking tRNA localization with activation of nutritional stress responses." Cell Cycle **9**(15): 3112-3118.

Ibar, C., V. F. Cataldo, C. Vasquez-Doorman, P. Olguin y A. Glavic (2013). "*Drosophila* p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth." Development **140**(6): 1282-1291.

Ibba, M. y D. Soll (2000). "Aminoacyl-tRNA synthesis." Annu Rev Biochem **69**: 617-650.

Jaffrey, S. R. (2014). "An expanding universe of mRNA modifications." Nat Struct Mol Biol **21**(11): 945-946.

Jewell, J. L., R. C. Russell y K. L. Guan (2013). "Amino acid signalling upstream of mTOR." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(3): 133-139.

Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu y D. H. Kim (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." Mol Biol Cell **20**(7): 1992-2003.

Kadaba, S., A. Krueger, T. Trice, A. M. Krecic, A. G. Hinnebusch y J. Anderson (2004). "Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*." Genes Dev **18**(11): 1227-1240.

Kanduc, D., M. Grazia di Corcia, A. Lucchese y C. Natale (1997). "Enhanced expression of initiator tRNA^(Met) in human gastric and colorectal carcinoma." Biochem Mol Biol Int **43**(6): 1323-1329.

Kannan, K. y Y. W. Fridell (2013). "Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction." Front Physiol **4**: 288.

Kantidakis, T., B. A. Ramsbottom, J. L. Birch, S. N. Dowding y R. J. White (2010). "mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11823-11828.

Kim, J., M. Kundu, B. Viollet y K. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13**(2): 132-141.

Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, E. Hartmann y D. Gorlich (1998). "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor." Mol Cell **1**(3): 359-369.

Lakings, D. B. y C. W. Gehrke (1971). "Analysis of base composition of RNA and DNA hydrolysates by gas-liquid chromatography." J Chromatogr **62**(3): 347-367.

Laplanche, M. y D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.

Laten, H., J. Gorman y R. M. Bock (1978). "Isopentenyladenosine deficient tRNA from an antisuppressor mutant of *Saccharomyces cerevisiae*." Nucleic Acids Res **5**(11): 4329-4342.

Lee, G. y J. Chung (2007). "Discrete functions of rictor and raptor in cell growth regulation in *Drosophila*." Biochem Biophys Res Commun **357**(4): 1154-1159.

Lee, J., R. D. Moir, K. B. McIntosh y I. M. Willis (2012). "TOR signaling regulates ribosome and tRNA synthesis via LAMMER/Clk and GSK-3 family kinases." Mol Cell **45**(6): 836-843.

Lee, Y. S., Y. Shibata, A. Malhotra y A. Dutta (2009). "A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)." Genes Dev **23**(22): 2639-2649.

Liu, L., K. Zhang, H. Sandoval, S. Yamamoto, M. Jaiswal, E. Sanz, Z. Li, J. Hui, B. H. Graham, A. Quintana y H. J. Bellen (2015). "Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration." Cell **160**(1-2): 177-190.

Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe y M. N. Hall (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-468.

Long, X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa y J. Avruch (2005). "Rheb binds and regulates the mTOR kinase." Curr Biol **15**(8): 702-713.

Lowe, T. M. y S. R. Eddy (1997). "tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence." Nucleic Acids Res **25**(5): 955-964.

Lum, J. J., R. J. DeBerardinis y C. B. Thompson (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 439-448.

Ma, X. M. y J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Machnicka, M. A., K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki y H. Grosjean (2013). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D262-267.

Mao, D. Y., D. Neculai, M. Downey, S. Orlicky, Y. Z. Haffani, D. F. Ceccarelli, J. S. Ho, R. K. Szilard, W. Zhang, C. S. Ho, L. Wan, C. Fares, S. Rumpel, I. Kurinov, C. H. Arrowsmith, D. Durocher y F. Sicheri (2008). "Atomic structure of the

KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine." Mol Cell **32**(2): 259-275.

Maute, R. L., C. Schneider, P. Sumazin, A. Holmes, A. Califano, K. Basso y R. Dalla-Favera (2013). "tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(4): 1404-1409.

Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan y I. Grummt (2004). "mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability." Genes Dev **18**(4): 423-434.

McEwen, D. G. y M. Peifer (2005). "Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis." Development **132**(17): 3935-3946.

Mei, Y., J. Yong, H. Liu, Y. Shi, J. Meinkoth, G. Dreyfuss y X. Yang (2010). "tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation." Mol Cell **37**(5): 668-678.

Misquitta, L. y B. M. Paterson (1999). "Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1451-1456.

Mogk, A., R. Schmidt y B. Bukau (2007). "The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies." Trends Cell Biol **17**(4): 165-172.

Montagne, J., M. J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S. C. Kozma y G. Thomas (1999). "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size." Science **285**(5436): 2126-2129.

Morata, G. (2001). "How Drosophila appendages develop." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 89-97.

Morata, G. y F. A. Martin (2007). "Cell competition: the embrace of death." Dev Cell **13**(1): 1-2.

Motorin, Y., S. Muller, I. Behm-Ansmant y C. Branlant (2007). "Identification of modified residues in RNAs by reverse transcription-based methods." Methods Enzymol **425**: 21-53.

Mount, D. W. (2007). "Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)." CSH Protoc **2007**: pdb top17.

Muir, A., S. Ramachandran, F. M. Roelants, G. Timmons y J. Thorner (2014). "TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids." Elife **3**.

Murphy, F. V. t., V. Ramakrishnan, A. Malkiewicz y P. F. Agris (2004). "The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1186-1191.

Nassel, D. R., O. I. Kubrak, Y. Liu, J. Luo y O. V. Lushchak (2013). "Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*." Front Physiol **4**: 252.

Neufeld, T. P., A. F. de la Cruz, L. A. Johnston y B. A. Edgar (1998). "Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing." Cell **93**(7): 1183-1193.

Neufeld, T. P. y B. A. Edgar (1998). "Connections between growth and the cell cycle." Curr Opin Cell Biol **10**(6): 784-790.

Okkenhaug, K. (2013). "Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells." Annu Rev Immunol **31**: 675-704.

Pajvani, U. B., L. Qiang, T. Kangsamaksin, J. Kitajewski, H. N. Ginsberg y D. Accili (2013). "Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability." Nat Med **19**(8): 1054-1060.

Pan, T. (2013). "Adaptive translation as a mechanism of stress response and adaptation." Annu Rev Genet **47**: 121-137.

Pang, Y. L., R. Abo, S. S. Levine y P. C. Dedon (2014). "Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number." Nucleic Acids Res.

Parthasarathy, R., J. M. Ohrt y G. B. Chheda (1977). "Modified nucleosides and conformation of anticodon loops: crystal structure of t6A and g6A." Biochemistry **16**(23): 4999-5008.

Pavon-Eternod, M., S. Gomes, M. R. Rosner y T. Pan (2013). "Overexpression of initiator methionine tRNA leads to global reprogramming of tRNA expression and increased proliferation in human epithelial cells." RNA **19**(4): 461-466.

Peng, T., T. R. Golub y D. M. Sabatini (2002). "The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation." Mol Cell Biol **22**(15): 5575-5584.

Perrimon, N. (1998). "Creating mosaics in *Drosophila*." Int J Dev Biol **42**(3): 243-247.

Perrochia, L., E. Crozat, A. Hecker, W. Zhang, J. Bareille, B. Collinet, H. van Tilbeurgh, P. Forterre y T. Basta (2013). "*In vitro* biosynthesis of a universal t⁶A tRNA modification in *Archaea* and *Eukarya*." Nucleic Acids Res **41**(3): 1953-1964.

Perrochia, L., D. Guetta, A. Hecker, P. Forterre y T. Basta (2013). "Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t⁶A tRNA modification." Nucleic Acids Res **41**(20): 9484-9499.

Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck y D. M. Sabatini (2011). "mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway." Cell **146**(3): 408-420.

Phizicky, E. M. y J. D. Alfonzo (2010). "Do all modifications benefit all tRNAs?" FEBS Lett **584**(2): 265-271.

Phizicky, E. M. y A. K. Hopper (2010). "tRNA biology charges to the front." Genes Dev **24**(17): 1832-1860.

Plongthongkum, N., N. Kullawong, S. Panyim y W. Tirasophon (2007). "Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in *Drosophila melanogaster*." Biochem Biophys Res Commun **354**(3): 789-794.

Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung y A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." Cell Metab **8**(3): 224-236.

Pullen, N. y G. Thomas (1997). "The modular phosphorylation and activation of p70s6k." FEBS Lett **410**(1): 78-82.

Quevillon, E., V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler y R. Lopez (2005). "InterProScan: protein domains identifier." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W116-120.

Read, R. D., T. R. Fenton, G. G. Gomez, J. Wykosky, S. R. Vandenberg, I. Babic, A. Iwanami, H. Yang, W. K. Cavenee, P. S. Mischel, F. B. Furnari y J. B. Thomas (2013). "A kinome-wide RNAi screen in *Drosophila* Glia reveals that the RIO kinases mediate cell proliferation and survival through TORC2-Akt signaling in glioblastoma." PLoS Genet **9**(2): e1003253.

Rideout, E. J., L. Marshall y S. S. Grewal (2012). "*Drosophila* RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNA^{Met} synthesis and systemic insulin signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(4): 1139-1144.

Robitaille, A. M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L. L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe y M. N. Hall (2013). "Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis." Science **339**(6125): 1320-1323.

Roignant, J. Y., C. Carre, B. Mugat, D. Szymczak, J. A. Lepesant y C. Antoniewski (2003). "Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*." RNA **9**(3): 299-308.

Rojas-Benitez, D., C. Ibar y A. Glavic (2013). "The *Drosophila* EKC/KEOPS complex: roles in protein synthesis homeostasis and animal growth." Fly (Austin) **7**(3): 168-172.

Rubin, G. M. y A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-353.

Rulifson, E. J., S. K. Kim y R. Nusse (2002). "Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes." Science **296**(5570): 1118-1120.

Ryoo, H. D. y H. Steller (2007). "Unfolded protein response in *Drosophila*: why another model can make it fly." Cell Cycle **6**(7): 830-835.

Saeboe-Larssen, S., B. Urbanczyk Mohebi y A. Lambertsson (1997). "The *Drosophila* ribosomal protein L14-encoding gene, identified by a novel Minute mutation in a dense cluster of previously undescribed genes in cytogenetic region 66D." Mol Gen Genet **255**(2): 141-151.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali y D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.

Scanga, S. E., L. Ruel, R. C. Binari, B. Snow, V. Stambolic, D. Bouchard, M. Peters, B. Calvieri, T. W. Mak, J. R. Woodgett y A. S. Manoukian (2000). "The conserved PI3K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*." Oncogene **19**(35): 3971-3977.

Scheitdr, V. J., A.; Bär, C.; Klassen, R. and Schaffrath, R. (2015). "Loss of wobble uridine modification in tRNA anticodons interferes with TOR pathway signaling." Microbial Cell **1**(12): 416-424.

Schiffer, E. R., G. Reber, P. De Moerloose y D. R. Morel (2002). "Evaluation of unfractionated heparin and recombinant hirudin on survival in a sustained ovine endotoxin shock model." Crit Care Med **30**(12): 2689-2699.

Schimmel, P. (1987). "Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs." Annu Rev Biochem **56**: 125-158.

Schmelzle, T. y M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-262.

Schmidt, E. V. (1999). "The role of c-myc in cellular growth control." Oncogene **18**(19): 2988-2996.

Sharp, S., D. DeFranco, M. Silberklang, H. A. Hosbach, T. Schmidt, E. Kubli, J. P. Gergen, P. C. Wensink y D. Soll (1981). "The initiator tRNA genes of *Drosophila melanogaster*: evidence for a tRNA pseudogene." Nucleic Acids Res **9**(22): 5867-5882.

Shimobayashi, M. y M. N. Hall (2014). "Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 155-162.

Silverman, S., J. Heckman, G. J. Cowling, A. D. Delaney, R. J. Dunn, I. C. Gillam, G. M. Tener, D. Soll y U. L. RajBhandary (1979). "The nucleotide sequence of the initiator tRNA from *Drosophila melanogaster*." Nucleic Acids Res **6**(2): 421-433.

Somers, M. J. y E. Paul (2014). "Safety Considerations of Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex and Renal Transplantation." J Clin Pharmacol.

Sprinzi, M. y K. S. Vassilenko (2005). "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D139-140.

St Johnston, D. (2002). "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*." Nat Rev Genet **3**(3): 176-188.

Stocker, H., T. Radimerski, B. Schindelholz, F. Wittwer, P. Belawat, P. Daram, S. Breuer, G. Thomas y E. Hafen (2003). "Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*." Nat Cell Biol **5**(6): 559-565.

Tabata, T., S. Eaton y T. B. Kornberg (1992). "The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation." Genes Dev **6**(12B): 2635-2645.

Teixeira, L. K. y S. I. Reed (2013). "Ubiquitin ligases and cell cycle control." Annu Rev Biochem **82**: 387-414.

Thiaville, P. C., D. Iwata-Reuyl y V. De Crecy-Lagard (2015). "Diversity of the biosynthesis pathway for Threonylcarbamoyladenosine (tA), a universal modification of tRNA." RNA Biol: 0.

Thomas, G. y M. N. Hall (1997). "TOR signalling and control of cell growth." Curr Opin Cell Biol **9**(6): 782-787.

Thoreen, C. C., L. Chantranupong, H. R. Keys, T. Wang, N. S. Gray y D. M. Sabatini (2012). "A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation." Nature **485**(7396): 109-113.

Tumaneng, K., R. C. Russell y K. L. Guan (2012). "Organ size control by Hippo and TOR pathways." Curr Biol **22**(9): R368-379.

Tumaneng, K., K. Schlegelmilch, R. C. Russell, D. Yimlamai, H. Basnet, N. Mahadevan, J. Fitamant, N. Bardeesy, F. D. Camargo y K. L. Guan (2012). "YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29." Nat Cell Biol **14**(12): 1322-1329.

Urrea, H., E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera y C. Hetz (2013). "When ER stress reaches a dead end." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3507-3517.

Valvezan, A. J., J. Huang, C. J. Lengner, M. Pack y P. S. Klein (2014). "Oncogenic mutations in adenomatous polyposis coli (Apc) activate mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) in mice and zebrafish." Dis Model Mech **7**(1): 63-71.

Vold, B. S., L. E. Kraus, V. G. Rimer y R. C. Coombes (1986). "Use of a monoclonal antibody to detect elevated levels of a modified nucleoside, N-[9-(beta-D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]-L-threonine, in the urine of breast cancer patients." Cancer Res **46**(6): 3164-3167.

Walker, S. C. y D. R. Engelke (2006). "Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(2): 77-102.

Weidmann, V., J. Ploog, S. Kliewer, M. Schaffrath y W. Maison (2014). "Variants of the prins cyclization for the synthesis of terpenoid spiroethers and oxabicyclo[3.3.1]nonane derivatives." J Org Chem **79**(21): 10123-10131.

Weinkove, D., T. P. Neufeld, T. Twardzik, M. D. Waterfield y S. J. Leever (1999). "Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by Drosophila class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor." Curr Biol **9**(18): 1019-1029.

Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten y et al. (1989). "A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification." J Bacteriol **171**(12): 6455-6467.

Weisman, R., A. Cohen y S. M. Gasser (2014). "TORC2-a new player in genome stability." EMBO Mol Med **6**(8): 995-1002.

Weissenbach, J. y H. Grosjean (1981). "Effect of threonylcarbamoyl modification (t⁶A) in yeast tRNA Arg III on codon-anticodon and anticodon-anticodon interactions. A thermodynamic and kinetic evaluation." Eur J Biochem **116**(1): 207-213.

Wek, R. C., H. Y. Jiang y T. G. Anthony (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 7-11.

Wek, S. A., S. Zhu y R. C. Wek (1995). "The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids." Mol Cell Biol **15**(8): 4497-4506.

Williams, D. D., G. D. Pavitt y C. G. Proud (2001). "Characterization of the initiation factor eIF2B and its regulation in *Drosophila melanogaster*." J Biol Chem **276**(6): 3733-3742.

Willis, I. M. y J. Lee (2012). "Two new kinases in the TOR signaling network regulate ribosome and tRNA synthesis." Cell Cycle **11**(15): 2769-2770.

Wullschleger, S., R. Loewith y M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Yadavalli, S. S. y M. Ibba (2012). "Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity." Adv Protein Chem Struct Biol **86**: 1-43.

Yao, P. y P. L. Fox (2013). "Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease." EMBO Mol Med **5**(3): 332-343.

Yus, E., T. Maier, K. Michalodimitrakis, V. van Noort, T. Yamada, W. H. Chen, J. A. Wodke, M. Guell, S. Martinez, R. Bourgeois, S. Kuhner, E. Raineri, I. Letunic, O. V. Kalinina, M. Rode, R. Herrmann, R. Gutierrez-Gallego, R. B. Russell, A. C. Gavin, P. Bork y L. Serrano (2009). "Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation." Science **326**(5957): 1263-1268.

Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger y M. N. Hall (2011). "Activation of mTORC2 by association with the ribosome." Cell **144**(5): 757-768.