



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

“*p53-related protein kinase (PRPK)* es necesario para la dinámica del citoesqueleto de actina y la migración de hemocitos, a través de su interacción con Rab35 e independiente del complejo KEOPS en *Drosophila*”.

Memoria para optar al Título de Bioquímico.

Emiliano Matías Molina Reyes

DIRECTOR

Dr. Álvaro Glavic Maurer

Laboratorio de Biología del Desarrollo

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile.

PATROCINADORA

Dra. Daniela Seelenfreund H.

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Agosto, Santiago, Chile 2015

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	VI
FINANCIAMIENTO.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Lamelipodios.....	2
1.2 Filopodios.....	5
1.3 Hemocitos.....	6
1.3.1 Origen y Migración.....	6
1.3.2 Compartimentos de hemocitos.....	8
1.3.2.1 Hemocitos circulantes.....	8
1.3.2.2 Glándula Linfática.....	9
1.3.2.3 Hemocitos sésiles.....	10
1.3.3 Hemocitos en pupa y adultos.....	10
1.3.4 Mecanismos Involucrados en la Migración de hemocitos...	11
1.4 p53-related protein kinase (PRPK).....	16
1.4.1 PRPK en el complejo KEOPS.....	17
1.4.2 PRPK en Drosophila Melanogaster.....	18
1.4.3 PRPK y la determinación de la forma celular.....	19

2. HIPOTESIS	22
2.1 Objetivo General.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
3.1 Drosophila Melanogaster como modelo experimental.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Animales y su Mantenición.....	28
4.2 Stocks transgénicos.....	28
4.3 Extracción de proteínas e Inmunoblot.....	30
4.4 Inmunoprecipitación.....	31
4.5 Cultivos primarios de hemocitos e Inmunocitoquímica.....	32
4.6 Time-Lapse Imaging	34
4.7 Ensayo de Migración de hemocitos embrionarios.....	35
4.8 Ensayo de Reclutamiento de hemocitos en larva, en respuesta a daño tisular.....	36
4.9 Ensayo de Migración de hemocitos en pupa.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Objetivo 1: “Análisis de la interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35”.....	38
5.2 Objetivo 2: “Análisis de la interacción física entre PRPK y la subunidad del complejo KEOPS, Kae1”.....	41
5.3 Objetivo 3: “Evaluación de los efectos morfológicos de condiciones de pérdidas de función de Kae1 en hemocitos”.....	43
5.4 Objetivo 4: “Evaluación del efecto del silenciamiento de PRPK sobre la dinámica de protrusiones de membrana.....	54

5.5 Objetivo 5: “Evaluación del efecto <i>in vivo</i> del silenciamiento de PRPK en el patrón de migración de los hemocitos embrionarios, en respuesta a daño tisular en larva y en contexto de migración aleatoria”	57
5.5.1 Estadío embrionario.....	57
5.5.2 Estadío larvario.....	60
5.5.3 Ensayo de migración de hemocitos en pupa.....	62
6. DISCUSIÓN.....	66
6.1 Interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35.....	66
6.2 Interacción física entre PRPK y Kae1	69
6.3 PRPK posee un rol independiente de KEOPS en la regulación del citoesqueleto de actina.....	69
6.4 PRPK y su rol estructural en la dinámica del citoesqueleto.....	70
6.5 PRPK y su rol en el reclutamiento de hemocitos en respuesta a daño tisular.....	71
6.6 PRPK y su rol en la migración de hemocitos <i>in-vivo</i>	73
7. CONCLUSIONES.	74
8. BIBLIOGRAFÍA.....	75
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Vías involucradas en la activación del complejo WAVE y lamellipodin.....	4
Figura 2. Regulación transcripcional de la hematopoyesis.....	8
Figura 3. Esquema con las principales vías de señalización que dirigen la migración de plasmatocitos embrionarios durante el desarrollo normal y en respuesta a daño.....	15
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Figura 5. Esquema del Sistema Gal4/UAS.....	26
Figura 6. Diseño experimental.....	27
Tabla1. Stocks transgénicos utilizados.....	29
Figura 7. Co-inmunoprecipitación de PRPK y las distintas versiones de Rab35.....	40
Figura 8. Co-inmunoprecipitación de PRPK y Kae1 en extractos proteicos de cuerpo graso de larvas en <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Figura 9. Cuantificación del fenotipo estrellado en cultivos primarios de hemocitos.....	44
Figura 10. Distribución de Fascin en hemocitos Rac1, cdc42 ^{V12} , PRPK IR y Kae1IR.....	46
Figura 11. Distribución de β -Tubulina en hemocitos Rac1, cdc42 ^{V12} , PRPK IR y Kae1IR.....	47
Figura 12. Fenotipo mutante para kae1 (<i>kae1</i> ^{-/-}) en hemocitos.....	49
Figura 13. Morfología de hemocitos mutantes para Kae1, Kae1i en mosca completa y ganancia de Kae1 en <i>background</i> mutante para Kae1.....	51
Figura 14. Cuantificación del fenotipo estrellado en cultivos primarios de hemocitos.....	53

Figura 15. Histogramas para la proteína LifeAct-GFP en hemocitos control, <i>cdc42^{V12}</i> , <i>Arpc4</i> IR y PRPK IR.....	56
Figura 16. Patrón de migración de hemocitos en embriones control y PRPK IR	59
Figura 17. Reclutamiento de hemocitos en respuesta a daño tisular.....	61
Figura 18. Ensayo de migración <i>in-vivo</i>	63
Figura 19. Distribución de Miosina total (Myo2) y la cadena liviana de la miosina 2 fosforilada (p-MLCII) en hemocitos control, PRPK IR y <i>Kae</i> IR.....	65
Figura 20. Antagonismo entre Rab35 y Arf6.....	68
Figura Suplementaria 1	81
Figura Suplementaria 2	82

AGRADECIMIENTOS

Con esta memoria de tesis concluye una etapa hermosa de mi vida y comienza una nueva. Quiero agradecer profundamente a mi familia por haberme apoyado no solo durante mi etapa universitaria, sino que durante toda mi vida. A mis padres que me criaron a mí y a mis hermanas con profundo amor y nos enseñaron a ver el mundo con otro prisma, donde las cosas superficiales son solo ilusiones que nos alejan de las cosas importantes. A mis hermanas Valentina y Amelia, que aunque no lo demuestre siempre, las amo con todo mi alma.

Me faltan palabras para agradecer a mis tatas (Jane, Jorge y Lidia) y a mi Nonno (Guillermo), los cuales siempre han estado presente en cada uno de mis pasos y que me han apoyado durante toda mi educación, los amo mucho y les agradezco por todo. A mis tíos Jaime, Ana, Carla, Jorge, Tita, Andrés y Paola. A mis primos, al clan Holmes (en especial a mi tía Paty), a los Molina, a los Jure, a los Sáez de Curicó y a los Reyes de Molina.

Agradezco a todos los profesores (colegio y Universidad) que han contribuido a mi formación, no solo como bioquímico, sino como persona. A Daniela Seelenfreund por todo su apoyo y en especial a mi tutor Álvaro Glavic por haberme aceptado en su laboratorio y por haberme inculcado diversos valores que sin duda me marcarán como Bioquímico.

A mis fieles amigos Juan Pablo y Carlos, que han soportado mi ingratitud y me han ofrecido su sincera amistad siempre. A mis amigos Sebastián, Camila, Viviana, Jorge, Carito, Andrés, Diego, Samanta y Maca, les agradezco por todos estos años de amistad.

En estos últimos años he conocido amigos increíbles que siempre han estado: en las buenas y las no tanto. Muchas Gracias Luis Solano, Perroperi, Diego, Mario, Arturo, Cristian, Andrea, Consu Ibar (mi mentora), Salomé, Margarita, Consu Anguita, Sandra, Feña Lourido, Feña Lisbona, Cata, Carlitos, Elvis, Esteban, Undu, Karina y a la Gástrula Mecánica.

A Bárbara, a quien amo profundamente, muchas gracias por ser tal como eres. Agradezco a la vida por haberte encontrado y agradezco tu amor y paciencia durante estos años.

FINANCIAMIENTO

-Proyecto FONDECYT Regular N°1140522 otorgado al Dr. Álvaro Glavic Maurer

-Durante la realización de esta tesis, se presentó un *poster* en el XXVIII Congreso de Biología Celular organizado por la Sociedad Chilena de biología Celular (SBCCH) titulado: “**p53-related protein kinase (PRPK) is necessary for haemocytes migration in *Drosophila***”

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µm	Micrómetros
ABL1	Oncogén vírico Abelson de leucemia murina, homólogo 1
APF	Acrónimo de <i>After Pupa^{ri}um F^ormation</i>
Arp2/3	Complejo de las proteínas relacionadas con la actina 2 y 3
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
Cdc 42 ^{V12}	Proteína controladora de la división celular 42
Cg	Colágeno
CHAPS	3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano
CNV	Cordón nervioso ventral
Crq	Croquemort
Dia	<i>Diaphanus</i>
Dpp	Decapentaplegic
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ENA/VASP	ENA-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores
FOG1	Acrónimo de <i>F^rie<u>n</u>d of <u>G</u>ATA1</i>
g	Gramos

GAP	Proteína activadora de GTPasa
GATA1	Factor de transcripción eritroide
GCM	Acrónimo de <i>Glial-cells missing</i>
GCM2	Acrónimo de <i>Glial-cell missing 2</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Proteína intercambiadora de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
GL	Glándula linfática
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
Hh	Hedgehog
Hml	Hemolectina
IR	Invertido repetido
IRSp53	Sustrato del receptor de insulina p53
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
Kae1i	Ácido ribonucleico interferente para <i>Kae1</i>
KEOPS	Acrónimo de <i>Kinase putative endopetidase and other proteins of small size</i>
L	Litros
Lpd	Lamelipodina
Lz	Lozenge
min	Minutos
mL	Mililitros
MLC2	Cadena liviana de la miosina-2

NPFs	Factores promotores de nucleación
N-WASP	Proteína neuronal del síndrome de Wiskott-Aldrich
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PBT	Triton X-100 en tampón fosfato salino
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
pMLC2	Fosforilación de la cadena liviana de la miosina-2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRPK	Proteína quinasa relacionada con p53
PRPKi	Ácido ribonucleico interferente para PRPK
PSC	Centro de señalización posterior
Pvf	Factor similar a PDGF/VEGF
Pvr	Receptor relacionado a PDGF y VEGF
RAC	Acrónimo de <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rap1	Acrónimo de <i>Ras-related protein 1</i>
RIPA	Tampón de radioinmunoprecipitación
RUNX1	Factor de transcripción relacionado con Run 1
S2	Línea celular derivada de hemocitos embrionarios
S6K	S6 quinasa
SCAR	Supresor del receptor de adenosín monofosfato cíclico

SDS	Dodecilsulfato Sódico
SRC	Proto-oncogén tirosina quinasa
Srp	Serpent
T6A	N6-treonil carbamoil de adenosina
TOR	Acrónimo de <i><u>T</u>arget of <u>R</u>apamicyn</i>
TRITC	Tetramethylrhodamine
UAS	Acrónimo de <i><u>U</u>pstream <u>A</u>ctivating <u>S</u>equence</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WAVE	Acrónimo de <i><u>W</u>iskott-<u>A</u>ldrich syndrome protein family <u>v</u>erprolin homologs</i>
WASP	Acrónimo de <i><u>W</u>iskott-<u>A</u>ldrich syndrome protein</i>
WT	Silvestre
YFP	Proteína fluorescente amarilla

RESUMEN

La migración celular es un proceso esencial en organismos pluricelulares, cobrando gran importancia durante la embriogénesis y en la respuesta inmune. Para migrar las células deben ser capaces de generar protrusiones fuera del margen celular. Los principales tipos de protrusiones generados por la polimerización de actina son lamelipodios y filopodios, siendo los primeros generados a través del complejo Arp2/3 (*Actin related protein*). Se ha reportado que la polimerización de actina es regulada por varias GTPasas pequeñas, entre ellas Rab35, la cual recluta a Rac1 y Cdc42 a sitios de formación de protrusiones modulando la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente.

PRPK (*p53 related protein kinase*) es una quinasa atípica, altamente conservada perteneciente al complejo KEOPS (*kinase, putative endopeptidase and other proteins of small size*), el cual modula la eficiencia del reconocimiento de codones de tipo ANN. En *Drosophila* se ha visto que PRPK es necesario para la integración de las señales de la vía PI3K/TOR, las cuales se traducen en crecimiento celular y proliferación. Sin embargo, hemos visto que la pérdida de función de PRPK altera la forma celular en hemocitos-células inmunes homólogas a los macrófagos-, generando un fenotipo estrellado, similar a la pérdida de función del complejo Arp2/3. Este fenotipo es suprimido al co-expresar Rab35. También se ha reportado la interacción física entre PRPK y Rab35 en células humanas.

Con estos antecedentes me propuse determinar si PRPK posee un rol fuera del complejo KEOPS, participando en la dinámica de protrusiones de membrana y el patrón de migración de hemocitos en *Drosophila melanogaster*. Para ello manipulamos los niveles de PRPK en tiempos y tejidos específicos a través del sistema Gal4/UAS. Se analizó la dinámica del citoesqueleto de actina y los parámetros de migración celular mediante microscopía confocal, en contextos particulares de migración y cultivo celular. Finalmente se realizaron co-inmunoprecipitaciones para determinar la interacción física entre PRPK-Kae1 (otro miembro del complejo KEOPS) y PRPK-Rab35.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la pérdida de función de PRPK altera la dinámica del citoesqueleto de actina *in vitro*, el patrón de migración de hemocitos en estadios embrionarios, disminuye el reclutamiento de hemocitos en larvas en respuesta a un daño tisular y disminuye la velocidad de migración de hemocitos en estadio pupal. También se corroboró la interacción física entre PRPK y Rab35 y, aún cuando PRPK interactúa con Kae1, se concluyó que el rol de PRPK en la determinación de la forma celular se debe a un rol no canónico fuera del complejo KEOPS. **Estos resultados sugieren que PRPK posee dos roles: Integración de señales de crecimiento y migración celular.**

ABSTRACT: “p53-related protein kinase (PRPK) is necessary for the actin cytoskeleton dynamic and haemocyte migration through their interaction with Rab35 and independent of KEOPS complex in *Drosophila*”

Cell migration is an essential process in multicellular organisms, gaining great importance during embryogenesis and in the immune response. To migrate the cells must be able to generate protrusions outside the cell margin. The main types of actin protrusions are lamellipodia and filopodia, both generated by actin polymerization through the Arp2/3 (Actin related protein) complex. It has been reported that the activation of numerous small GTPases complex including Rab35, which recruits Rac1 and Cdc42 to the site of protrusions formation, where the latter are involved in the formation of lamellipodia and filopodia respectively.

p53-related protein kinase (PRPK) is a highly conserved atypical kinase. It is a member of the KEOPS (kinase, putative endopeptidase and other proteins of small size) complex, which modulates the efficiency of recognition of ANN codons. In *Drosophila* PRPK is necessary for the translation of PI3K/TOR growth signals, which lastly support cell growth and proliferation. However, we observed that loss of function of PRPK alters cellular shape in haemocytes - macrophage-like cells-, generating a star-like phenotype which is also observed in loss of function of the Arp2/3 complex. The phenotype is suppressed by co-expressing Rab35. Also, it has been reported physical interaction between PRPK and Rab35 in human cells.

With all this evidence I decided to determine if PRPK has a function independent of the KEOPS complex participating in the dynamics of membrane protrusions and migration pattern of haemocytes in *Drosophila melanogaster*. To do this, we manipulated PRPK levels in tissues and times specific through the Gal4 / UAS system. In particular contexts, migration and cell cultures, the actin cytoskeleton dynamics and cell migration's parameters were analyzed by confocal microscopy. Finally co-immunoprecipitations were performed to determine the physical interaction between PRPK-kae1 (another member of the complex KEOPS) and PRPK-Rab35.

The results obtained in this study show that the loss of function of PRPK alters the dynamics of membrane protrusions *in vitro* and the migration pattern of embryonic haemocytes, reduces the recruitment of larval haemocytes in response to tissue damage and decreases haemocyte migration rate in pupal stage. We confirmed the physical interaction between PRPK and Rab35 and even when PRPK interacts with kae1, it was concluded that the role of PRPK in determining cell shape is due to a non-canonical role independent of the KEOPS complex. **These results suggest that PRPK has two roles: Integration of growth signals and cell migration.**

1. INTRODUCCIÓN

La migración celular es un proceso esencial en organismos pluricelulares, lo cual se evidencia durante la embriogénesis, donde las células requieren migrar coordinadamente, proliferar y diferenciarse para formar distintos tejidos y órganos; o durante la respuesta inmune, donde las células inmunes son capaces de patrullar distintos tejidos en respuesta a una infección o daño. La migración celular requiere de una fina integración espacio-temporal de cientos de proteínas, entre las que se encuentran receptores de membrana, kinasas, fosfatasas, adaptadores y los componentes del citoesqueleto (filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios) .(Revisado en Alberts y cols., 2002; Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011).

Diversos tipos celulares poseen la capacidad de migrar: fibroblastos, células epiteliales, células inmunes, etc. En todos estos casos, la célula genera protrusiones fuera del margen celular, formadas por redes de filamentos de actina (Blanchoin y cols., 2014; Krause y Gautreau, 2014).

En la mayoría de los casos las protrusiones se generan de manera polarizada, hacia la dirección de migración y en respuesta a señales quimio-atrayentes, sin embargo algunas células extienden protrusiones a modo exploratorio y en ausencia de estímulos (Petrie y cols., 2009). Se distinguen 2 tipos principales de protrusiones, los lamelipodios y los filopodios.

1.1 Lamelipodios

Los lamelipodios son protrusiones tipo lámina conformadas por una red altamente ramificada de filamentos delgados y cortos de actina. La lamela se encuentra siempre asociada y hacia el cuerpo celular, con arreglos menos ramificados y más lineales de los filamentos de actina (Cramer y cols., 1997). Los lamelipodios son responsables de la generación de nuevos contactos de adhesión y en conjunto con el sistema contráctil de miosina-2 generan la motilidad celular (Vicente-Manzanares y cols., 2009).

Muchos estímulos extracelulares son capaces de inducir la formación de lamelipodios, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, y receptores de adhesión. La mayoría de estas señales lleva a la activación de Arp2/3, el principal nucleador de actina en la formación de lamelipodios (revisado en Ridley, 2011).

Arp2/3 es un complejo de siete subunidades (Arp2, Arp3 y Arpc1-5) que se une a los lados de los filamentos de actina pre-existentes y promueve el crecimiento de un nuevo filamento en un ángulo de 70°. Esta actividad causa la expansión de una red de filamentos ramificados que provocan la extensión de la membrana plasmática. Adicionalmente a WAVEs, Arp2/3 también puede ser activado por las proteínas WASPs (WASP y N-WASP, en *Drosophila* existe sólo un ortólogo; WASP) que a su vez son activadas por la GTPasa pequeña Cdc42.

El complejo Arp2/3 requiere de factores promotores de nucleación (acrónimo en inglés: NPFs) para su activación, entre los cuales se destaca la familia SCAR/WAVE (en *Drosophila* solo existe un ortólogo, SCAR), el cual actúa formando junto a 4 proteínas más, el complejo WAVE. La activación de este complejo es provocada por la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) a su receptor (EGFR), lo cual activa diversas vías, que desembocan en el reclutamiento y activación tanto de WAVE como lamellipodin (Lpd) en la membrana plasmática. En una primera instancia EGFR activa a PI3K, lo que promueve la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática. PIP3 activa a RAC (RAC-GTP) a través de su proteína intercambiadora de GTP o GEF. RAC-GTP promueve la unión de lamellipodin a WAVE por medio de la subunidad ABI1, activando a JNK, el cual fosforila a WAVE y activa a WAVE de forma directa.

Por otro lado, EGFR activa a RAS (RAS-GTP) a través de su GEF. RAS-GTP activa a Lpd y a la serina/treonina kinasa ERC, la cual fosforila a WAVE. Una tercera vía consiste en la activación de las tirosina kinasas SRC y ABL por EGFR. Ambas fosforilan a WAVE y ABL también fosforila a Lpd, promoviendo el reclutamiento de proteínas ENA/VASP al lamelipodio, las cuales regulan la elongación de los filamentos de actina y la dinámica del lamelipodio (Krause y Gautreau, 2014) (Figura 1).

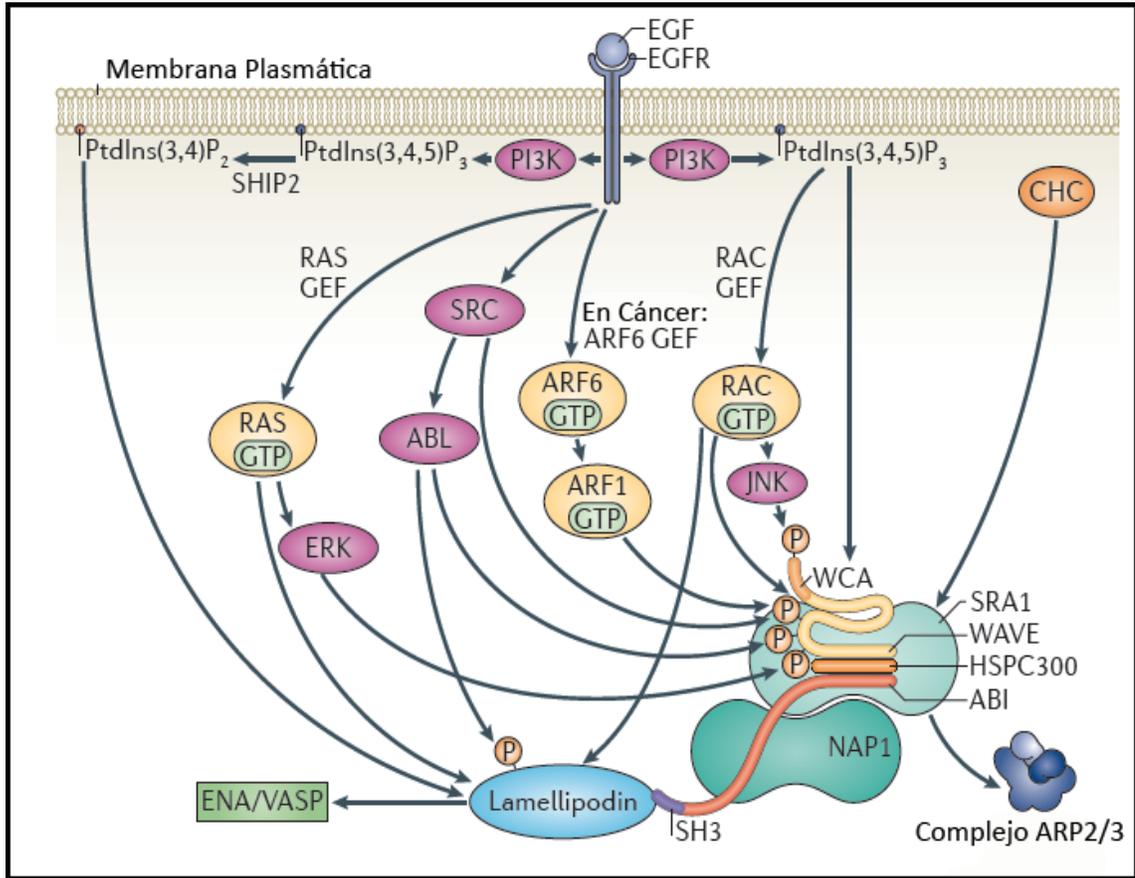


Figura 1. Vías involucradas en la activación del complejo WAVE y lamellipodin. La unión de EGF a su receptor (EGFR) desencadena diversas vías. En este esquema se resumen las principales proteínas que regulan la actividad del complejo WAVE, el cual activa al complejo Arp2/3, el principal nucleador de actina (Modificado de Krause y Gautreau, 2014).

1.2 Filopodios

Los filopodios son protrusiones largas, delgadas y altamente dinámicas, formadas por filamentos de actina paralelos y estabilizados por la proteína Fascin. Aún no se sabe con exactitud cómo se inicia la formación de filopodios. Sin embargo, el modelo más aceptado es el de elongación convergente, donde la formación de filopodios está condicionada a la presencia de lamelipodios y el orden secuencial sería: Arp2/3 es reclutado a la membrana, luego se polimeriza la actina y son reclutadas las forminas, finalmente se reclutan las proteínas ENA/VASP y Fascin. Otros estudios, afirman que la formación de filopodios es independiente de Arp2/3 (Yang y Svitkina, 2011; Mattila y Lappalainen, 2008). En *Drosophila* el principal inductor de filopodios es Cdc42 a través de la activación de nucleadores de actina como *Diaphanus* (Dia) e IRSp53 (Mattila y cols., 2008).

El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los eventos de migración es difícil de analizar en modelos murinos y en líneas celulares de mamíferos, dado que existe la dificultad de seguir específicamente las células migratorias y distinguir el aporte de las distintas señales químicas (quimioquinas, citoquinas pro-inflamatorias, morfógenos, etc.). Por el contrario, *Drosophila melanogaster* constituye un modelo sumamente simple, ya que en el confluyen las técnicas más sofisticadas de manipulación genética y de

microscopía. *Drosophila* posee un sistema inmune innato, donde existen células con capacidad migratoria, denominados hemocitos (Wang y cols., 2014).

1.3 Hemocitos

Entre los hemocitos podemos distinguir tres tipos: plasmacitos, células cristal y lamelocitos, donde el 95% corresponden a plasmacitos, los cuales son homólogos a los macrófagos y cuya principal función es fagocitar células muertas y microorganismos patógenos. Estas células, al igual que otras células móviles, son capaces de generar protrusiones, las cuales consisten en extensiones celulares fuera de los límites del cuerpo celular (núcleo y organelos). El otro 5% lo constituyen las células cristal y su función es melanizar (reacción de oscurecimiento provocada por la síntesis *de novo* o la deposición de melanina) y coagular heridas, mediante la formación de fibras donde el principal componente es la hemolectina (hml). El tercer tipo celular son los lamelocitos y están encargados de encapsular parásitos más voluminosos. Se observan en respuesta a infección por avispas parásitas (Revisado en Lemaitre y Hoffman, 2007).

1.3.1 Origen y Migración

El proceso de hematopoyesis en *Drosophila* tiene diversas similitudes con el proceso que ocurre en vertebrados. Un ejemplo de esto es que tanto el factor de transcripción relacionado con Runt (RUNX1) y el factor de transcripción eritroide (GATA1), como sus homólogos en *Drosophila*, Lozenge

(Lz) y Serpent (Srp), respectivamente interactúan físicamente para regular la expresión de genes blancos.

Existen diversos factores de transcripción que dirigen la hematopoyesis en *Drosophila*. La expresión de Srp es específica de los hemocitos y es necesaria durante su maduración. En el caso específico de los plasmatocitos se requiere de la expresión del factor *glial-cells missing* (GCM) y GCM2 (Figura 2) (Wood y Jacinto, 2007; Honti y cols., 2013).

El desarrollo de las células sanguíneas en *Drosophila* ocurre en dos fases. En una primera instancia una pequeña población de hemocitos se origina a partir del segmento procefálico del mesodermo, dando origen a plasmatocitos, los cuales a partir del estadio 10 embrionario comienzan a migrar desde su origen en el mesodermo y adoptan un patrón altamente estereotipado, en el cual migran tanto desde el extremo anterior como del extremo posterior del embrión a lo largo de la línea media ventral. Al cabo del estadio 13 ambas poblaciones de hemocitos se encuentran cerca de los neurómeros (segmentos del cordón nervioso ventral (CNV)) 7 y 8. A partir de este momento los hemocitos ocupan posiciones más laterales formando 3 líneas paralelas a lo largo del eje antero-posterior. También se ha observado que a partir de este momento los hemocitos incrementan su velocidad de migración desde $0,4 \mu\text{m min}^{-1}$ a $1,8 \mu\text{m min}^{-1}$ (Wood y Jacinto, 2007). Los plasmatocitos constituyen el 95% de los hemocitos del embrión y persisten durante los estadios larvarios, la

metamorfosis, e incluso un número pequeño de estos es detectable en la mosca adulta. El 5% restante de hemocitos embrionarios la constituyen las células cristal, las cuales a diferencia de los plasmátocitos no migran y permanecen localizados alrededor del proventrículo.

Un segundo evento hematopoyético ocurre en estadios tardíos de la embriogénesis, en el cual precursores en el mesodermo cardiogénico dan origen a la glándula linfática (GL) embrionaria.

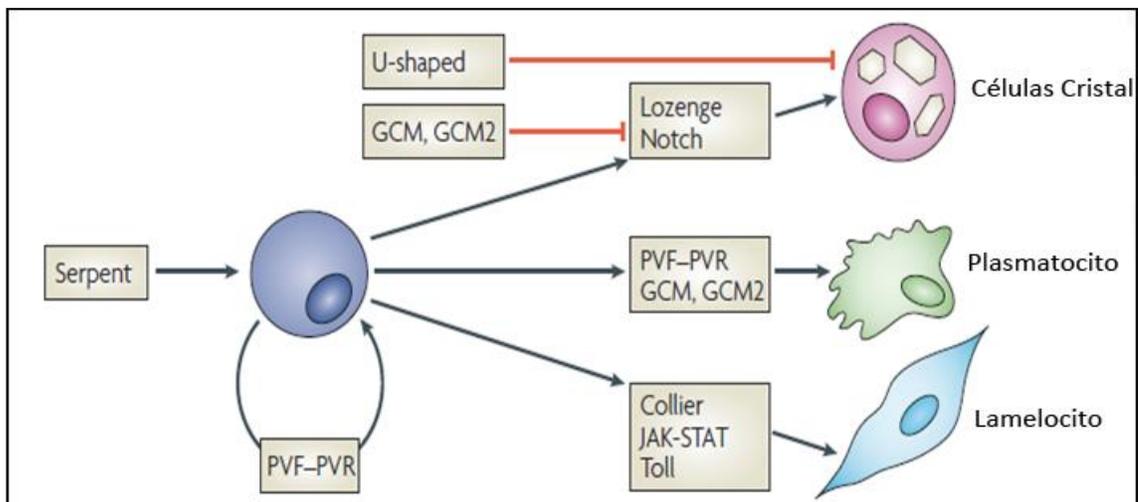


Figura 2. Regulación transcripcional de la hematopoyesis. (Modificado de Wood y Jacinto, 2007).

1.3.2 Compartimentos de hemocitos

1.3.2.1 Hemocitos circulantes

Esta población proviene de los hemocitos originados del mesodermo procefálico. Circulan de manera libre en la hemolinfa, donde un 90% de estos

son plasmacitos, encargados de fagocitar a los posibles patógenos y remover los tejidos dañados. El otro 10% lo constituyen células cristal y su función es melanizar y coagular heridas. El número total de células circulantes incrementa durante el desarrollo larvario, desde unas pocas en el estadio larvario 1 temprano, hasta 3000-5000 en el estadio larvario 3 (Honti y cols. 2013).

1.3.2.2 Glándula linfática (GL)

Como mencionamos anteriormente, esta glándula se genera a partir de precursores del mesodermo cardiogénico llamados hemoganglioblastos, donde la mayoría consiste en progenitores unipotentes y un pequeño número son oligopotentes.

La GL contiene células hematopoyéticas primordiales, las cuales se dividen activamente para formar un conjunto de pro-hemocitos que se diferencian, ya sea en plasmacitos o células cristal, entre el final de la embriogénesis y el final del primer estadio larvario. Al final del estadio larvario la GL está compuesta por un par de lóbulos primarios en la región anterior - originados durante la embriogénesis- y un número variable de lóbulos secundarios en la región posterior, originados durante el desarrollo larvario (Krzemien y cols., 2007; Krzemien y cols., 2010; Honti y cols., 2013).

1.3.2.3 Hemocitos sésiles

Los hemocitos sésiles corresponden a una pequeña población localizada en la capa sub-epidermal de la larva y se distribuyen en un patrón segmentado. Experimentos *in vitro* indican que los hemocitos se adhieren a la lámina basal mediante syndecan (Narita y cols., 2004). Resultados recientes, sugieren que el proceso de adhesión de hemocitos sésiles a la pared del cuerpo involucra un proceso dinámico, en el cual el sistema nervioso periférico juega un rol esencial, regulando el reclutamiento y el anclaje de estos. Otros estudios demuestran que frente a una infección con avispas parásitas, los hemocitos son capaces de desanclarse de la pared del cuerpo y se diferencian en lamelocitos (Honti y cols., 2013).

Todos estos antecedentes sugieren que los hemocitos efectores - capaces de montar una respuesta inmunológica frente a un insulto- no provienen solo de la población circulante, sino que de cada uno de los compartimentos, y ocurre una acción concertada de las distintas clases de hemocitos (Honti y cols., 2013).

1.3.3 Hemocitos en pupa y adultos

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, donde la transformación juvenil (larva) a adulto (imago) ocurre dentro de la cutícula pupal durante la metamorfosis. Las estructuras adultas de un insecto, como la mandíbula, las antenas, los ojos, las patas, los halterios, las alas y los genitales

se originan a partir de tejidos epiteliales indiferenciados, llamados discos imaginales, mientras que el resto de los tejidos larvarios se desintegran durante la pupación, incluyendo los compartimentos hematopoyéticos (Gilbert S., 2010). Esto provoca que tanto los plasmaticos como células cristal estén libres en la circulación de la mosca adulta, no así los lamelocitos, los cuales desaparecen en el proceso de pupación. Esto puede deberse a un cambio en la expresión génica de los hemocitos, en la cual se pierde la capacidad de diferenciarse a lamelocitos (Honti y cols., 2013).

1.3.4 Mecanismos involucrados en la Migración de Hemocitos

Como mencionamos antes, los hemocitos presentan un patrón de migración ampliamente descrito, en el cual, diversas vías de señalización cooperan en el proceso de migración (Figura 3).

El receptor tirosina kinasa *Pvr*, homólogo de los receptores PDGF y VEGF de mamíferos, desempeña un papel clave en la migración y supervivencia de los hemocitos durante la embriogénesis. La sobreexpresión tanto de *Pvr* como uno de sus ligandos, *Pvf2*, provoca un incremento en el número de hemocitos circulantes y un aumento de tamaño de la GL. Por otro lado, la expresión de la forma dominante negativa de *Pvr* es suficiente para disminuir el número de hemocitos circulantes. Los ligandos de *Pvr* (*Pvf1*, *Pvf2*, *Pvf3*) poseen un rol redundante en la migración, sin embargo, *Pvf2* y *Pvf3* dirigen la migración a lo

largo del Cordón Nervioso Ventral (CNV) (Figura 3, flecha naranja), mientras que Pvf2 permite la migración dorsal (Wood y cols., 2006). Los hemocitos no sólo migran durante la embriogénesis, sino también migran en respuesta a daño en los tejidos. En este contexto, los hemocitos no requieren de la señalización de Pvr, pero sí requieren señalización por PI3K (Figura 3, flecha celeste) (Wood y cols., 2006).

La formación y estabilización del citoesqueleto de actina es fundamental para la correcta migración de los hemocitos, donde participa la familia de las Rho GTPasas. En mamíferos se ha visto que tanto Rac1 como Rac2 son necesarias para la morfología de los macrófagos, pero son dispensables en respuesta a heridas (Wheeler y cols., 2006). En el caso de *Drosophila* Rac1 y 2 son necesarias para el reclutamiento a la zona dañada (Stramer y cols., 2005).

Se ha visto que los hemocitos de embriones mutantes para Rho1 son incapaces de migrar en respuesta a una herida inducida por láser (Stramer y cols., 2005), similar a lo observado en monocitos humanos (Worthylake y cols., 2001). También se ha visto que cdc42 es necesario para que los macrófagos respondan a gradientes de Factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), pero no es esencial para la migración celular, como sí lo es Rho1 y Rac (Allen y cols., 1998). Al igual que en levadura y mamíferos, cdc42 es necesario para la polaridad de celular (Stramer y cols., 2005).

En los últimos años se ha demostrado que el desarrollo del CNV está íntimamente relacionado con la migración de los hemocitos a lo largo del eje antero posterior durante la embriogénesis. Esto se debe principalmente a que el CNV se separa de la epidermis, creando un canal que permite el paso de los hemocitos. Slit y sus receptores Robo y Robo2 son necesarios para la migración de los hemocitos, pero de forma no-autónoma celular. Hemocitos de embriones mutantes para *slit* son incapaces de migrar, debido a un des-anclaje entre el CNV y el epitelio, lo que genera una barrera física que impide la migración de los hemocitos (Evans y cols., 2010).

Estos autores además demuestran que SCAR es requerido de manera autónoma celular para el correcto procesamiento de los cuerpos apoptóticos fagocitados por los hemocitos durante la migración en el embrión. Esto pone en evidencia la importancia del procesamiento de fagosomas y posiblemente el flujo de membranas en la correcta migración de los hemocitos (Evans y cols., 2013).

También se ha visto que la subunidad β PS de la integrina, *mysospheroid*, posee un rol dual en la migración de hemocitos embrionarios. En primer lugar es capaz de moldear el espacio tridimensional en el cual migran los hemocitos y en segundo lugar, es requerido de manera autónoma celular en la migración de los hemocitos. Esto último debido a que la ausencia de estas integrinas produce fallas en la coordinación entre la dinámica de microtúbulos y actina, impidiendo

la migración en respuesta a heridas y evitando la repulsión por contacto (Combery cols., 2013).

También se ha visto que los hemocitos poseen la habilidad de migrar atravesando epitelios. Este tipo de migración ocurre entre los estadios embrionarios 11 y 12, donde los hemocitos migran desde la cabeza hacia la cola del embrión, penetran el epitelio y luego son capaces de migrar entre el intestino medio y las células circulantes (Figura 3, flecha verde). Se ha demostrado que RhoL cumple un rol fundamental en este tipo de migración, promoviendo la localización de Rap1-GTP en el frente de migración, donde Rap1 aumenta la afinidad de la subunidad α integrina.

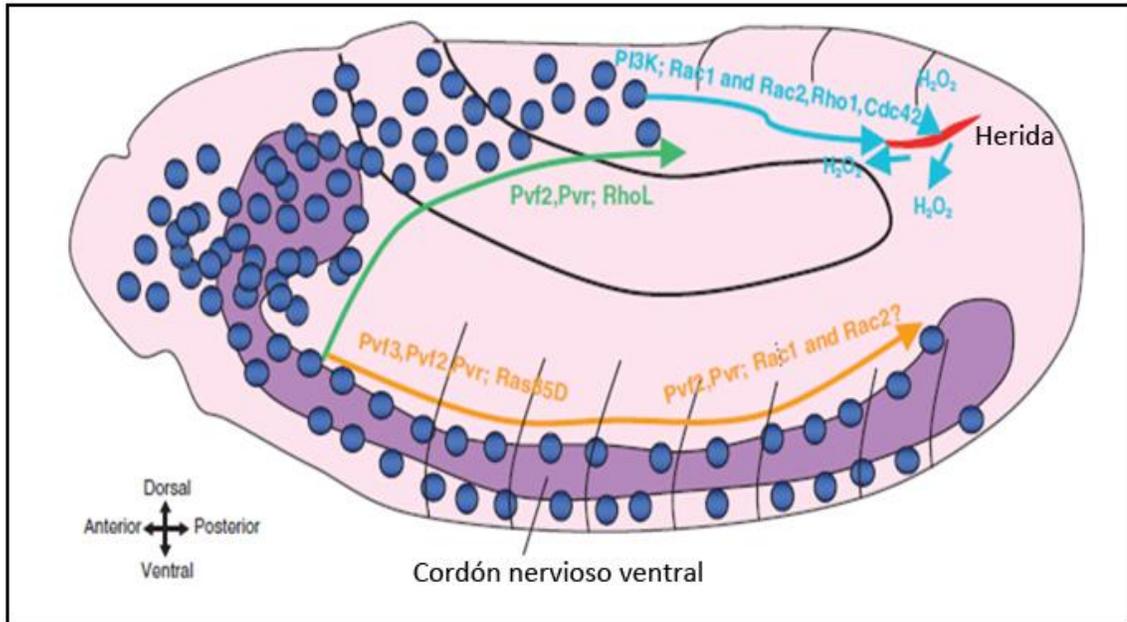


Figura 3. Esquema con las principales vías de señalización que dirigen la migración de plasmotocitos embrionarios durante el desarrollo normal y en respuesta a daño. La imagen representa un embrión de *Drosophila* en etapas finales de la embriogénesis. Pvf3 y Pvr señalizan a través de la GTPasa pequeña Ras85D para iniciar la migración de los plasmotocitos (círculos azules) a lo largo de la porción anterior del CNV. Luego Pvf2 señaliza a través de Pvr y posiblemente a través de Rac1 y Rac2 para completar la migración en la porción posterior del CNV (Flecha naranja). La migración desde la cabeza hacia la cola del embrión requiere de RhoL (Flecha verde). En respuesta a una herida (Línea roja), las células cercanas a la herida liberan H_2O_2 , el cual es sentido por los plasmotocitos e inician su migración hacia la herida (Flecha celeste). La migración en respuesta a heridas es independiente de la señalización de Pvr, pero depende de la activación de PI3K y las GTPasas pequeñas (Modificado Fauvarque y Williams, 2011).

1.4 p53-related protein kinase (PRPK)

Esta proteína fue descrita por primera vez por el grupo de Stocchetto (Stocchetto y cols., 1997) en *Saccharomyces cerevisiae* y denominada Bud32. Es una Serina/Treonina kinasa atípica, pequeña (261 aminoácidos) y acidofílica que cumple un rol fundamental en el crecimiento normal de la levadura.

Esta kinasa es conservada desde arqueas hasta humanos (Facchin y cols., 2003), incluido *Drosophila melanogaster*. La proteína homóloga a Bud32 en humanos, denominada *p53-related protein kinase* (PRPK), fue descrita por primera vez en células T citotóxicas activadas por Interleuquina-2 y se estableció que fosforila a p53 en la Serina 15 aumentando su estabilidad y actividad transcripcional (Abe y cols., 2001; Abe y cols., 2006).

Existe además conservación funcional entre Bud32 y PRPK. En estudios de complementación, PRPK revirtió de manera parcial el retardo en el crecimiento de levaduras deficientes en Bud32 y además Bud32 fosforila a p53 *in vitro* (Facchin y cols., 2003).

El grupo de Lopreiato y cols. comprobó que la actividad kinasa de Bud32 no cumple un rol fundamental, ya que la versión “kinasa muerta” (mutación en el sitio catalítico) de Bud32, denominada Bud32^{D16A}, fue capaz de revertir el fenotipo de crecimiento causado por la ausencia de este gen, sugiriendo que PRPK posee un rol estructural (Lopreiato y cols., 2004), entre otras funciones.

1.4.1 PRPK en el Complejo KEOPS

Estudios en levadura han descrito que Bud32 forma parte del complejo KEOPS (acrónimo de “*Kinase, putative endopetidase and other proteins of small size*”) junto a Kae1, Cgi-121, Pcc1 y Pcc2. Se ha descrito que este complejo está encargado del mantenimiento y homeostasis de los telómeros (Downey y cols., 2006). Un complejo similar, pero que contiene además la subunidad Gon7, ha sido descrito asociado a la cromatina y es un regulador de la transcripción (Kisseleva-Romanova y cols., 2006). Posteriormente, también en levaduras, se observó que al mutar los distintos componentes del complejo KEOPS se obtenían cepas defectuosas para la modificación N6-treonil carbamoil de adenosina (t6A) en ARN de transferencias (ARNt) que leen codones ANN. Esta modificación modula la estabilidad del ARNt y la afinidad de este con los ribosomas durante el reconocimiento del anticodón (Srinivasan y cols., 2011; Yacoubi y cols., 2011), afectando entre otros la selección del codón de inicio ATG (Daungeron y cols., 2011). En conjunto los errores traduccionales derivados de las fallas de reconocimiento de codones ANN se traduce en problemas en la síntesis de proteínas, lo que ha sido utilizado para explicar en gran medida las alteraciones observadas en la mantención de los telómeros, en la transcripción y del crecimiento celular.

Estudios recientes en levadura han determinado que la unidad mínima para realizar la modificación t6A es Pcc1-Kae1-Bud32 (Perrochia y cols., 2013),

donde PRPK tendría actividad ATPasa dentro del complejo KEOPS y kinasa fuera de él.

1.4.2 PRPK en *Drosophila melanogaster*

Mediante análisis de BLAST se identificó a CG10673-PA como el ortólogo de PRPK en *Drosophila*. Estudios realizados en el Laboratorio del Dr. Glavic demostraron que esta kinasa está involucrada en el control del tamaño del organismo, siendo necesaria para sostener la proliferación y el crecimiento celular. Mediante el sistema Gal4/UAS se silenció PRPK en diversos tejidos, observando una reducción del tamaño celular. Este fenotipo se asemeja al encontrado en mutantes para reguladores positivos de la vía PI3K/TOR. Se intentó rescatar el fenotipo de crecimiento expresando distintos reguladores positivos de la vía de PI3K/TOR (PI3K, Akt1, Rheb y S6K). Solo se rescató el fenotipo al co-expresar una forma constitutivamente activa de S6K, S6K^{SKETE}. Por otro lado, se examinó si era posible revertir el fenotipo de crecimiento co-expresando distintas versiones de PRPK: PRPK-FLAG y la forma kinasa muerta, PRPK^{D132A}-V5. Ambas versiones revertieron el fenotipo, sin embargo la kinasa muerta lo hizo sólo parcialmente. Estos resultados sugieren que, y al igual que en levadura, PRPK posee principalmente una función estructural. En este trabajo se concluye que PRPK -a través de un mecanismo desconocido- modula la actividad de TOR y el crecimiento celular y de los tejidos (Ibar y cols., 2013).

1.4.3 PRPK y la determinación de la forma celular

El grupo del Dr. Glavic también ha estudiado el rol de PRPK en la determinación de la forma celular en *Drosophila*. Estos estudios se realizaron en cultivos primarios de hemocitos.

Existe una serie de antecedentes que permitieron relacionar a PRPK con elementos que regulan la generación de protrusiones de membrana. Ensayos de *pulldown* acoplados a espectrometría de masas en *Drosophila* mostraron una interacción física entre PRPK y dos proteínas asociadas a la dinámica de los filamentos de actina: alfa-espectrina, y la subunidad del complejo Arp2/3, Arpc4 (Guruharsha y cols., 2011).

Por otra parte, en células humanas se ha descrito que PRPK interactúa físicamente con Rab35. En *Drosophila* esta GTPasa es esencial en la citoquinesis terminal, mediando el reciclaje rápido de vesículas desde endosomas tempranos hacia la membrana plasmática (Kouranti y cols., 2006). Además se ha descrito que es fundamental para el desarrollo de los pelos sensoriales y es un potente inductor de filopodios en células S2 (línea derivada de hemocitos embrionarios); ambas funciones son dependientes de su capacidad para interactuar y reclutar a Fascin a la membrana plasmática (Zhang y cols., 2009). Otros estudios indican que Rab35 puede reclutar a Rac1 y Cdc42 a los sitios de formación de protrusiones, por lo tanto participaría tanto en la formación de lamelipodios como filopodios (Shim y cols., 2010).

Estos antecedentes motivaron el estudio de la función de PRPK en la regulación de la morfología celular. El silenciamiento de PRPK en hemocitos produjo un fenotipo sumamente alterado, caracterizado por un gran número de protrusiones, similar a lo observado en condiciones de pérdida de función del complejo Arp2/3. Las protrusiones generadas por el silenciamiento de PRPK no mostraron el patrón de marcaje característico para filopodios, caracterizado por filamentos de actina paralelos estabilizados por fascina y ausencia de β -tubulina en la protrusión.

Por otro lado se observó que el silenciamiento de PRPK modifica la distribución de Rab5 (marcador de endosomas tempranos), principalmente hacia la periferia y en la base de las protrusiones, sin alterar la distribución de otros marcadores del sistema de endomembranas. Complementariamente se observó co-distribución de PRPK con Rab5 mediante la construcción PRPK-FLAG.

Otro resultado relevante es que los hemocitos deficientes en PRPK no presentan una distribución normal para los marcadores WASp, Arp2 y Arpc1 (estos dos últimos son subunidades del complejo Arp2/3). Esto indicaría que el fenotipo observado se debe a una falla principalmente en la formación de lamelas y lamelipodios. Finalmente, análisis de epistasis reveló que la sobre-expresión de Rac1 y Rab35-YPF fueron capaces de revertir el fenotipo de forma celular (Cataldo V., Tesis de Pregrado 2013).

Los antecedentes indican que la pérdida de PRPK altera la configuración normal de la lamela y la formación de lamelipodios, ambas estructuras fundamentales en la migración celular. Por lo tanto me propuse la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS:

“PRPK participa en la dinámica de protrusiones de membrana y el patrón de migración de hemocitos durante el desarrollo debido a su interacción con Rab35 e independiente de su participación en el complejo KEOPS”

2.1 Objetivo General Determinar si PRPK participa en la dinámica del citoesqueleto de actina y el patrón de migración de hemocitos, de forma independiente del complejo KEOPS.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Analizar la interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35.
2. Analizar la interacción física entre PRPK y la subunidad del complejo KEOPS, Kae1.
3. Evaluar los efectos morfológicos de condiciones de pérdida de función de Kae1 en hemocitos.
4. Evaluar el efecto del silenciamiento de PRPK sobre la dinámica de protrusiones de membrana.
5. Evaluar el efecto *in-vivo* del silenciamiento de PRPK en el patrón de migración de los hemocitos embrionarios, en respuesta a daño tisular en larvas y en contexto de migración aleatoria (pupa).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 *Drosophila melanogaster* como modelo experimental.

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un insecto del orden de los dípteros, que ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental durante más de un siglo. Posee diversas ventajas por sobre otros modelos, tales como: su corto ciclo de vida (aproximadamente 10 días a 25°C. Figura 4), su bajo costo de mantención, posee solo 4 cromosomas los cuales se encuentran secuenciados y es altamente manipulable genéticamente, gracias a herramientas como los cromosomas balanceadores y marcadores de selección dominantes (Revisado en Greenspan, 2004).

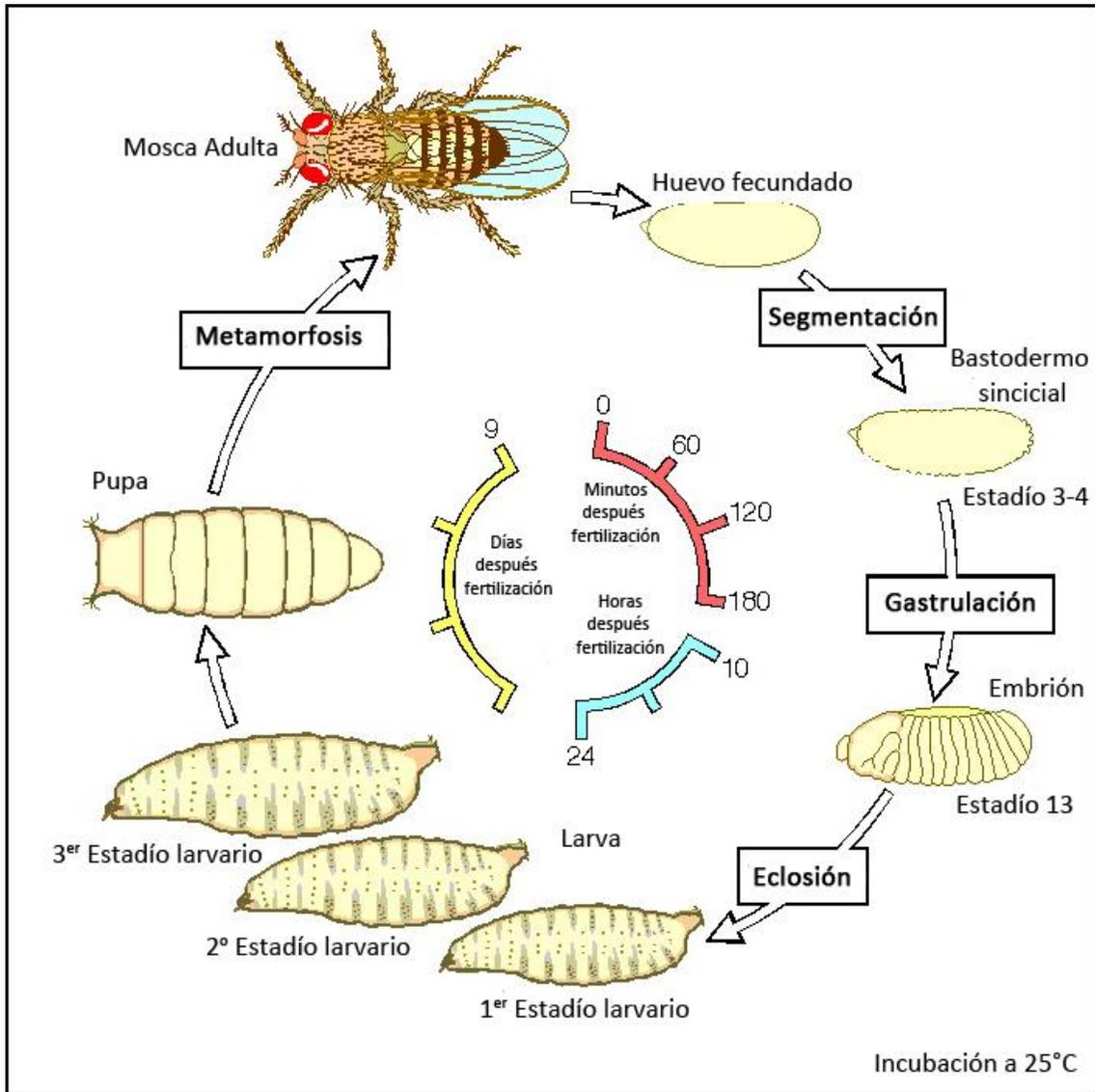


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Su ciclo de vida se puede dividir en 4 etapas o fases: embrionaria, larvaria, pupal y adulto. La embriogénesis tarda 1 día, los estadios larvales 4 días, y la fase de pupa 5 días, aproximadamente (Modificado de invitero.tumblr.com).

Para abordar los distintos objetivos propuestos en esta tesis, se realizaron ensayos tanto de pérdida como ganancia de función, mediante el sistema Gal4/UAS (Figura 5). Este sistema se basa en el factor de transcripción de levadura Gal4, el cual es capaz de inducir la expresión de genes que se encuentran río abajo de una secuencia UAS (*upstream activating sequence*). En *Drosophila melanogaster* se utiliza como sistema bipartito, donde una cepa posee el transgen de interés río abajo de la secuencia UAS y la otra cepa expresa Gal4 bajo el control de un *driver*, que puede ser un *enhancer* tejido y tiempo específico o promotor ubicuo. Por lo tanto, al cruzar ambas cepas, el transgen de interés se expresa en el mismo patrón espacial y temporal que Gal4 (Figura 5) (Brand y Perrimon, 1993).

En esta tesis se utilizaron diversos *drivers* para generar tanto ganancia como pérdida de función en estadíos de embrión, larva y pupa. En cada uno de estos estadíos, se analizó un contexto fisiológico distinto para el mismo tipo celular (plasmátocitos) y para ello se utilizaron distintas técnicas (Figura 6).

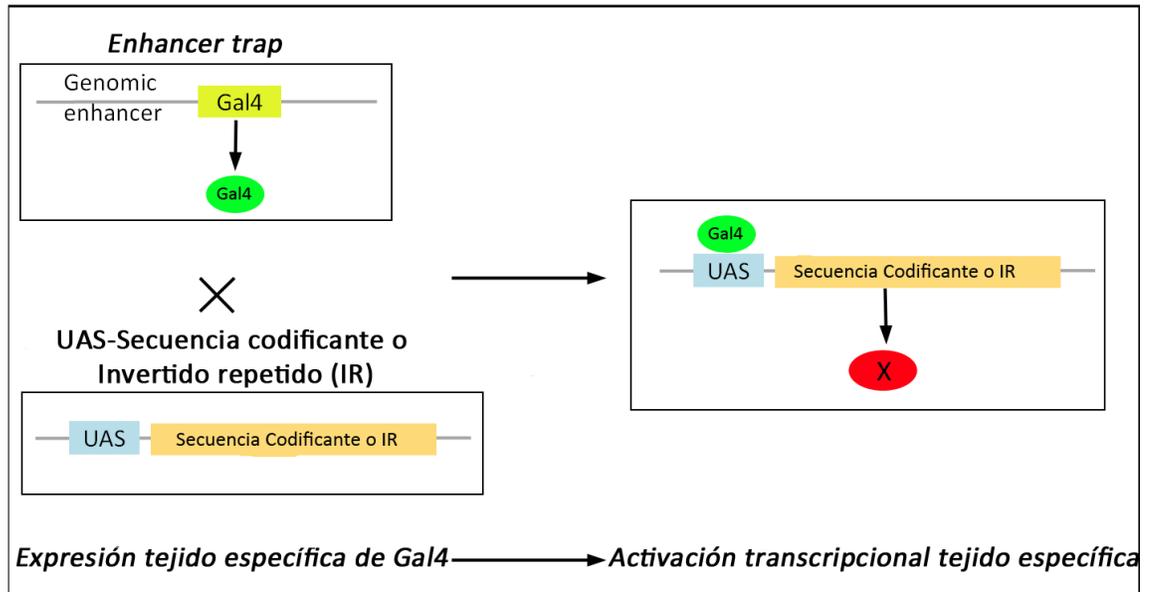


Figura 5. Esquema del Sistema Gal4/UAS. Se esquematiza el diseño de una mosca que expresa el transgen de interés (círculo rojo) de manera tejido específica, mediante el cruce de dos moscas. Una posee el transgen de interés río abajo de una secuencia UAS y la otra posee un promotor débil Gal4 inserto de manera azarosa en el genoma de *Drosophila*. Así, la expresión de Gal4 depende de los *enhancers* que se encuentren cerca del sitio de inserción. Gracias a esta estrategia, denominada *enhancer trap*, se han generado numerosas cepas con distintos patrones de expresión de Gal4, bien caracterizados. Algunos promotores bien caracterizados son utilizados como *drivers*.

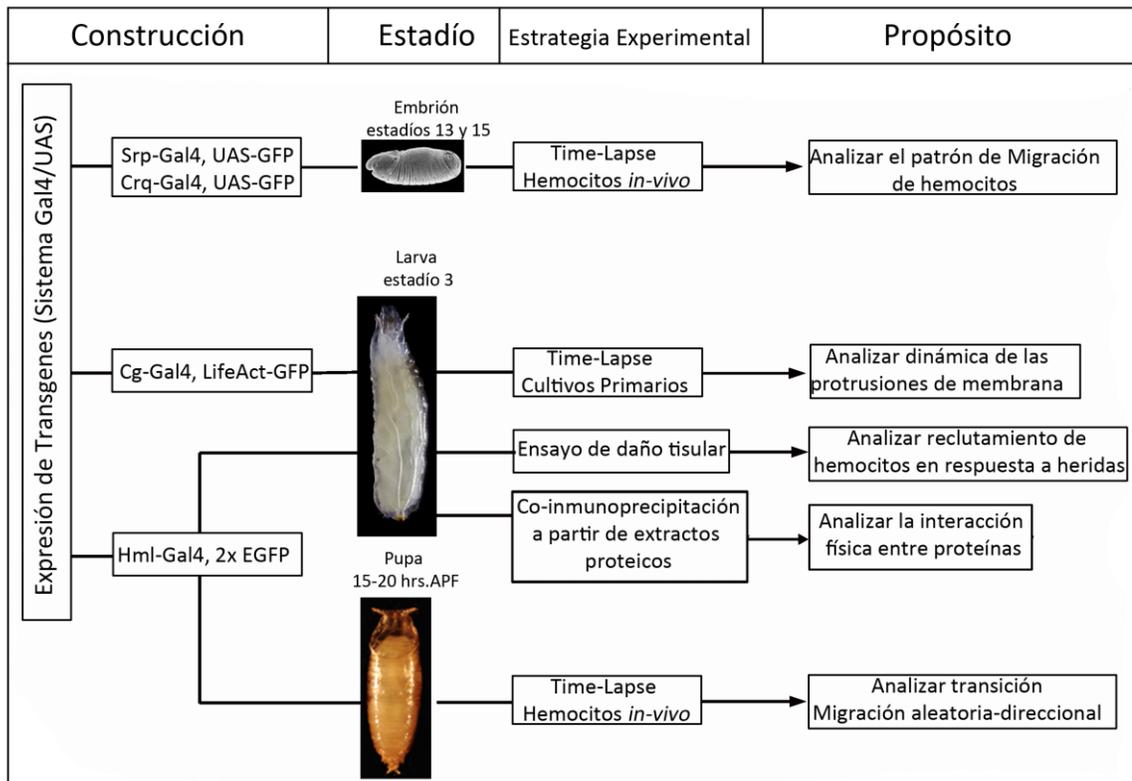


Figura 6. Diseño experimental. De izquierda a derecha se indican los *drivers* utilizados (serpent (srp), croquemort (crq), collagen (cg) y hemolectin (hml)), el estadio del desarrollo (embrión, larva y pupa), la técnica experimental utilizada y el objetivo de cada ensayo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales y su mantención

El ciclo de vida de la mosca del vinagre (*D.melanogaster*) tarda aproximadamente 10 días a 25°C. La embriogénesis y los dos primeros estadíos larvarios tardan un día cada uno, el tercer estadío larvario tarda 2 días y los estadíos pupales entre 4 y 5 días. Luego de dos días post-eclosión, las hembras comienzan a poner huevos fertilizados.

Los *stocks* fueron mantenidos a 17°C en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con 50 g/L harina, 100 g/L levadura fresca, 11 g/L agar, 80 g/L glucosa, 6 mL/L ácido propiónico y 1,56 g/L de propil parabeno. Los cruces necesarios para los diferentes experimentos se realizaron a 25°C.

4.2 Stocks transgénicos

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron *stocks* de origen comercial (Bloomington y Viena), *stocks* proporcionados gentilmente por Iwan Evans (*crq-Gal4* y *srp-Gal4*) y el resto fue generado previo a esta tesis en el laboratorio (Tabla 1). En la mayoría de los experimentos, las moscas se obtuvieron mediante cruces genéticos estándar. En el caso de las moscas mutantes para *Kae1*, se realizó recombinación meiótica para obtener las moscas experimentales.

Nombre (cromosoma)	Descripción
yw (X)	
Cg-Gal4 (II)	Expresión de Gal4 en hemocitos y cuerpo graso.
Hml-Gal4 (II)	Expresión de Gal4 en hemocitos durante estadio larvario y pupal.
Hml-Gal4, 2x EGFP (II)	Expresión de GFP en hemocitos durante estadio larvario y pupal.
Crq-Gal4, UAS-GFP (III)	Expresión de GFP en hemocitos durante estadio embrionario.
Srp-Gal4, UAS-GFP (II)	Expresión de GFP en hemocitos durante estadio embrionario.
Tub-Gal4, UAS-GFP/ TM6b (III)	Expresión de GFP en todo el animal.
Tub-Gal80 ^{TS} (II)	Expresión de Gal80 termosensible en todo el animal.
UAS-Arpc4 IR (III)	ARN interferente contra
UAS-Cdc42 ^{V12} (II)	Cdc42 constitutivamente activo (mutación que elimina actividad GTPasa).
UAS-Cdc42 ^{N17} (II)	Cdc42 dominante negativo (mutación que impide unión a GTP).
UAS-Rac1 (II)	Rac1 silvestre
UAS-Rho ^{DN} (X)	Rho dominante negativo
UAS-Rho1-GFP (II)	Rho1 fusionado a GFP
UAS-Rab35-YFP (II)	Rab35 fusionado a YFP
UAS-Rab35 ^{Q67L} -YFP (II)	Rab35 constitutivamente activo fusionado a YFP
UAS-Rab35 ^{S22N} -YFP (II)	Rab35 dominante negativo fusionado a YFP
UAS-TOR-Flag (III)	TOR fusionado a epítipo Flag.
UAS-PRPK IR (III)	ARN interferente contra PRPK.
UAS-PRPK-Flag (III)	PRPK fusionado a epítipo Flag.
UAS-PRPK-HA (II)	
UAS-PRPK ^{AC} -Flag (X)	
UAS-PRPK ^{T221A} -Flag (II)	PRPK no fosforilable fusionado a epítipo Flag.
UAS-PRPK ^{T221D} -Flag (II)	PRPK fosfo-mimético fusionado a epítipo Flag.
UAS-PRPK ^{D132R} -V5 (III)	PRPK kinasa muerta fusionada a epítipo V5.
UAS-PRPK ^{RATÓN} (III)	PRPK de ratón
UAS-Kae1 IR (II)	ARN interferente contra Kae1
UAS-Kae1-HA (II)	Kae1 fusionado a epítipo HA.

Tabla 1. Stocks transgénicos utilizados. En negro se muestran los stocks comerciales, en azul los proporcionados por Iwan Evans y en verde los generados en el laboratorio.

4.3 Extracción de proteínas e Inmunoblot.

Para cada condición experimental se seleccionaron 20 larvas en tercer estadio larvario provenientes de la comida (se excluyen aquellas que ascienden por las paredes del vial) y se lavaron en PBS en hielo. Luego fueron homogeneizadas mecánicamente en 200 μ l de tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris-Cl pH 8) con 10 μ l de mezcla de inhibidores de proteasas (LifeTechnologies) y 10 μ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Se incubó a 4°C durante 10 minutos y se centrifugó a 16.000g durante 15 minutos a 4°C, luego se rescató el sobrenadante evitando arrastrar grasa y se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 4°C. Se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. Se prepararon muestras entre 5-10 μ g/ μ l de proteínas en tampón de carga (SDS 8%, glicerol 40% v/v, Tris 0,24 M, pH 6,8, Azul de bromofenol 0,04%, beta-mercaptoetanol 10%) y se calentaron a 65°C durante 30 minutos.

Las muestras fueron resueltas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Todas las proteínas se resolvieron en geles concentradores y separadores al 12% utilizando acrilamida: bis-acrilamida 30% p/v.

4. 4 Inmunoprecipitación

Para la probar la interacción física entre PRPK y Kae1 se realizó una inmunoprecipitación en suspensión (Abcam). Se extrajeron 30 pares de cuerpo graso de larvas en estadio 3 de genotipos: *Cg-Gal4; Kae1-HA y Cg-Gal4; PRPK-Flag, Kae1-HA*. Para la extracción se utilizó el protocolo descrito anteriormente pero se reemplazó el tampón de RIPA por un tampón de extracción de cuerpo graso (HEPES 40 mM, pH 7,5; NaCl 120 mM; Pirofosfato 10 mM; Glicerofosfato 10 mM; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 1,5 mM; EDTA 1 mM; CHAPS al 0,3% y un cocktail de inhibidores de proteasas) (Kim y cols., 2002). Se incubaron 300 µg de extracto con 5 µl de anticuerpo ANTI-FLAG® de conejo marca Sigma durante toda la noche a 4°C con agitación. Se lavaron 50 µL de Proteína A Agarosa con 1 mL de tampón IP (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; NaCl 50 mM; glicerol 10% p/v; Nonidet P-40 0,1% e inhibidores de proteasas) (Arquier y cols., 2008) 5 veces, centrifugando a 2700g a 4°C cada vez. Luego se mezclaron los 50 µL de Proteína A Agarosa con el extracto de proteínas más anticuerpo y se incubó durante 4 hrs a 4°C con agitación. Luego se lavó 3 veces con 500 µL de tampón IP (retirando el sobrenadante cada vez), se añadió tampón de carga 2X, se incubó a 65°C por 30 min, se centrifugó y se resolvió el sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida-bisacrilamida (30%).

Para probar la interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35, se utilizó el *kit* comercial GFP-Trap_A® de Chromotek. Se realizaron

extractos proteicos de larvas con genotipo: Cg-Gal4, Rab35-YFP/+ y Cg-Gal4, Rab35-YFP/PRPK-HA para las distintas versiones de Rab35. Se lavaron 25 μ L de beads GFP-Trap_A® con 1 mL de tampón de dilución (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM y 1X de mezcla de inhibidores de proteasas) por 3 veces, centrifugando a 2700g durante 2 min a 4°C cada vez. Luego se mezcló con 250 μ g de extracto de proteínas y se incubó durante 2 hrs a 4°C con agitación. Se lavó 2 veces con 500 μ L de tampón de dilución, descartando el sobrenadante. Se re-suspendió con 100 μ L de tampón de carga 2X, se incubó a 65°C durante 30 min, se centrifugó y se resolvió el sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida-bisacrilamida (30%).

4.5 Cultivos Primarios de Hemocitos e Inmunocitoquímica

Se tomaron larvas de *Drosophila* en estadio 3 y se lavaron en PBS para retirar restos de alimento, luego se sumergieron en etanol al 70% por 3 segundos para desinfectar la cutícula y luego se colocaron en PBS (4 larvas por cubre objeto). Paralelamente se colocaron cubre objetos de 12mm de diámetro (previamente flameados con etanol 95%) sobre un portaobjetos cubierto en parafilm. Se depositaron 120 μ L de medio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich) sobre los cubre objetos y las larvas limpias se transfirieron a ellos. Inmediatamente, bajo lupa y con pinzas de disección se realizó un pequeño corte en la parte posterior de la cutícula de cada larva sin dañar el tejido graso, se esperó 1 minuto a que la hemolinfa pasara al medio de cultivo, y se retiraron

las larvas. Para que los hemocitos sedimenten y se adhirieran, se cultivaron durante 1 hora y 15 minutos a 25°C en una cámara húmeda, pasado este tiempo los cubre objetos se cambiaron a placas de 12 pocillos.

Para inmunocitoquímicas las células se fijaron con PFA 4% en PBS durante 10 minutos, se lavaron durante 5 minutos con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS (PBT) 10 minutos y se lavaron nuevamente con PBS 10 minutos. Luego se bloqueó con BSA 1% en PBS por 1 hora y en seguida se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. A continuación se lavó 3 veces por 5 minutos cada uno con PBT y se incubó 2 horas a 25°C con los anticuerpos secundarios y según el caso, con faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich), diluido en solución de bloqueo. En caso de tinciones con TO-PRO-3 (Invitrogen), este se añadió en los últimos 20 minutos de la incubación del anticuerpo secundario. Finalmente las células se lavaron 3 veces 15 minutos con PBS, y se montaron en medio para fluorescencia Vectashield (Vector Labs). Las preparaciones se sellaron con esmalte de uñas transparente y se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis. Para tinciones con faloidina-TRITC/DAPI o faloidina-TRITC/TO-PRO-3 se siguió el mismo protocolo, a excepción de que no se incluyó la etapa de bloqueo y la incubación de las sondas se realizó por 1 hora. La visualización y obtención de imágenes de las muestras se llevó a cabo en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta, a un aumento de 100x y un zoom digital de 2.5x

o bien en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M a un aumento de 100x.

4.6 Time-Lapse Imaging

Para evaluar la capacidad contráctil y la dinámica del citoesqueleto de actina en hemocitos, se realizaron películas de cultivos primarios de hemocitos que expresan la proteína de fusión LifeAct-GFP. Para esto se recombinó el *driver* Cg-Gal4 con LifeAct-GFP generando la mosca Cg-Gal4, LifeAct-GFP. Se cruzaron moscas vírgenes de las distintas condiciones a analizar (yw (Control), PRPK IR (Experimental), *cdc42*^{V12} (Control positivo) y Arpc4 IR (Control negativo)) con machos Cg-Gal4, LifeAct-GFP a 25°C durante 5 días. Luego se recolectaron larvas en estadio 3 para cada condición. Se colocaron 3 larvas sobre una placa de Petri pequeña adaptada para microscopía (MatTek) con 120 µL de medio Schneider y se dañaron mediante pinzas de disección como se mencionó anteriormente. Luego se retiraron las larvas y se incubó a 25°C en una cámara húmeda durante 1 hora y 15 minutos, se cambió el medio de cultivo y se observó mediante microscopio confocal (LSM 510) con un objetivo 100x. Los videos fueron capturados cada 8,75 segundos por 80 ciclos. Los videos fueron procesados mediante el programa Image J, escogiendo 3 regiones al azar en cada célula, donde la única condición fue que tuviesen señal de fluorescencia a lo largo del video. Luego, los videos fueron convertidos a mapas pseudocoloreados (con niveles entre 0 y 255) y se graficó la intensidad de fluorescencia *versus* el tiempo.

4.7 Ensayo de migración de hemocitos embrionarios.

Para realizar videos de embriones, se colectaron embriones en estadio 13 (10 ± 2 hrs a 25°C) para las distintas condiciones. Para esto, se incubaron moscas en un cilindro con base desmontable, que consiste en una placa Petri con agar, jugo de manzana y complementada con levadura, para promover la puesta de huevos. Luego de 2 horas se recolectaron los embriones arrastrándolos a una malla utilizando agua de la llave y un pincel. Luego se decorionaron agregando una solución de cloro al 50% durante 3 min y se lavaron con agua de la llave. Para el montaje se cubrió un portaobjetos con un trozo de cinta adhesiva de doble faz y se alinearon los embriones con su cara ventral hacia afuera. Luego se cubrieron con una gota de Halocarbón (permite el intercambio gaseoso) y se montaron 2 cubre objetos (cuadrados de 0,17 mm de espesor) a ambos lados de la muestra para evitar que fuese aplastada y se montó un cubreobjetos rectangular sobre estos para crear una cámara entre el vidrio los embriones, permitiendo el desarrollo normal de estos. Los videos corresponden a una proyección en el eje Z de 15 cortes. Las imágenes fueron capturadas cada 2 minutos durante 1 hora mediante microscopio confocal. Las trayectorias de los hemocitos fueron marcadas utilizando la aplicación Manual Tracking, mientras que el cálculo de la velocidad y la trayectoria mediante la aplicación Chemotaxis Tool. Ambas aplicaciones fueron ejecutadas mediante el software Image J.

4.8 Ensayo de Reclutamiento de hemocitos en larva, en respuesta a daño tisular.

Para evaluar el reclutamiento de hemocitos en respuesta a daño tisular, se realizó el ensayo descrito por Babcock y cols. (2008). Se utilizó el driver Hml-Gal4, 2x EGFP, el cual dirige la expresión de EGFP en hemocitos larvarios. Para inmovilizar las larvas en estadio 3, se montaron sobre un portaobjetos con cinta adhesiva de doble faz, con su cara ventral hacia abajo y anterior hacia arriba. No se utilizaron anestésicos, ya que inhiben la contracción muscular de las larvas, lo que altera la circulación normal de hemocitos a través de la larva e incide en el reclutamiento de estos. Bajo una lupa de fluorescencia se dañaron larvas en el segmento A6 utilizando un filamento de tungsteno afilado. La herida se realizó en una zona ausente de hemocitos sésiles, para luego evaluar el número de hemocitos reclutados. Se desmontaron de la cinta adhesiva utilizando una gota de agua y se transfirieron a una placa con agar-pulpa de fruta donde se incubaron a 25°C durante 6 horas. Se montaron de la misma forma descrita anteriormente y se capturaron imágenes de la zona dañada. Finalmente se cuantificó el número de hemocitos reclutados a la zona de daño en un área del doble del tamaño que el sitio de herida, según lo descrito por Kadandale y cols. (2010).

4.9 Ensayo de migración de hemocitos en pupa

Para evaluar los efectos de PRPK sobre la migración direccional de hemocitos, se realizó una modificación al ensayo descrito por Moreira y cols. (2011), el cual consiste en dañar mediante un láser de ablación el tórax de una pupa y observar los cambios en la velocidad y dirección de migración.

Para visualizar los hemocitos se utilizó el driver Hml-Gal4, 2x EGFP, al igual que en el ensayo en larvas. Se colectaron pupas entre 15-20 hrs. APF (Acrónimo de *After Pupa^{ri}um F^ormation*), se retiró el *operculum* y se montan con su cara ventral hacia abajo sobre un portaobjetos con cinta adhesiva de doble faz y 5 cubreobjetos cuadrados de 0,17 mm de espesor a ambos lados de la muestra, para evitar que fuese aplastada. Luego se agregó una pequeña cantidad de halocarbon, se cubrió con un cubreobjetos rectangular y se observó mediante microscopio confocal Zeiss LSM 510 utilizando un objetivo 40x. Se realizaron videos de 15 minutos en intervalos de 1 minuto, tomando un Z-stack de 15 cortes de 1 μ m. Los videos se realizaron en zonas que no estuviesen hacinadas de hemocitos. Se marcaron las trayectorias de los hemocitos utilizando la aplicación Manual Tracking, mientras que el cálculo de la velocidad y la trayectoria se realizó mediante la aplicación Chemotaxis Tool. Se ejecutaron ambas aplicaciones mediante el software Image J.

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo 1: “Análisis de la interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35”.

Se ha descrito que Rab35 es capaz de interactuar físicamente con PRPK en células humanas (Abe y cols. 2006). En *Drosophila*, existe una interacción funcional entre Rab35 y PRPK, ya que es capaz de rescatar el fenotipo de pérdida de función de PRPK en hemocitos. Por otro lado se ha visto que al co-expresar las distintas versiones etiquetadas de Rab35 junto con PRPK-Flag, se observa una mayor co-distribución de PRPK-Flag con la versión dominante negativa de Rab35 (Rab35^{S22N}-YFP), no así con las versiones *wild type* (Rab35^{WT}-YFP) y constitutivamente activa (Rab35^{Q67L}-YFP) (Cataldo V., Tesis de Pregrado, 2013). Finalmente, como mencionamos en los antecedentes, se ha demostrado la importancia estructural de PRPK por sobre su actividad como kinasa (Lopreiato y cols., 2004; Ibar y col., 2013), lo cual sugiere que PRPK posee otra función fisiológica fuera del complejo KEOPS, en este caso sugerimos que el rol de PRPK en la dinámica del citoesqueleto, se debe a su interacción con Rab35.

Con todos estos antecedentes me propuse demostrar que existe una interacción física entre PRPK y Rab35 mediante co-inmunoprecipitación. Para esto, se co-expresó PRPK-HA y las distintas versiones de Rab35 fusionadas a YFP, utilizando el *driver* Cg-Gal4. Luego se realizaron extractos proteicos de larva completa y se inmunoprecipitó utilizando el kit GFP-TRAP®.

Los resultados obtenidos indican que PRPK interactúa físicamente con las distintas versiones de Rab35 (Figura 7), donde se obtuvo una banda más intensa al inmunoprecipitar con la versión Rab35^{S22N}-YFP. Sin embargo, en los controles no inmunoprecipitados se aprecia que los niveles de expresión para las distintas versiones de Rab35 no son iguales, donde se aprecia una mayor expresión para Rab35^{S22N}-YFP, luego Rab35^{Q67L}-YFP y finalmente Rab35^{WT}-YFP, lo cual podría explicar la preferencia por la versión Rab35^{S22N}-YFP. Falta confirmar si los niveles de expresión de las distintas versiones de Rab35 varían en condiciones de ganancia o pérdida de función de PRPK, lo que estaría indicando si PRPK promueve o estabiliza selectivamente alguna de las formas de Rab35.

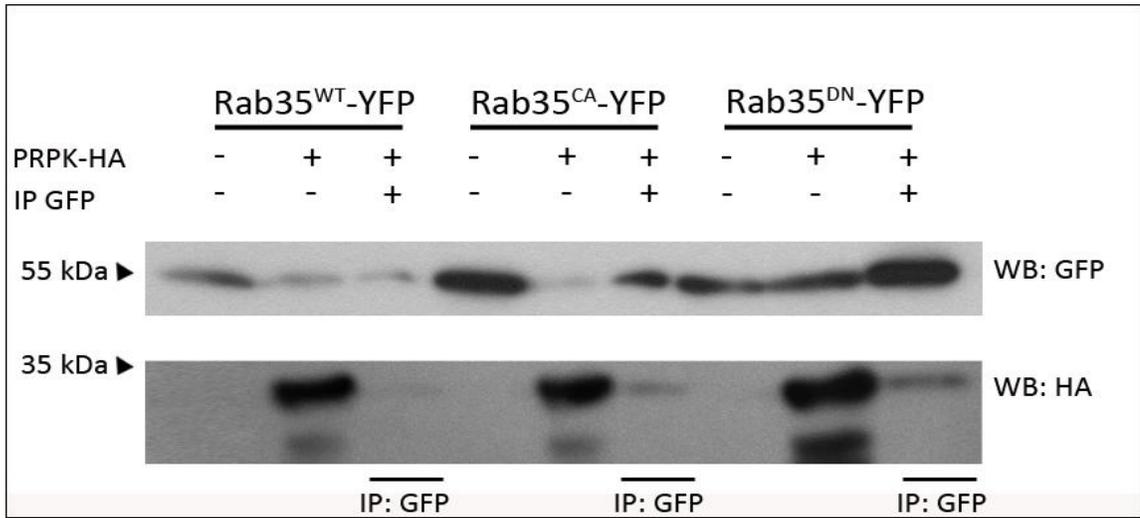


Figura 7. Co-inmunoprecipitación de PRPK y las distintas versiones de Rab35. Inmunoblots de larvas que expresan PRPK-HA y las distintas versiones de Rab35-YFP, *wild type* (WT), constitutivamente activa (Q67L) y dominante negativo (S22N). Se puede apreciar una banda bajo los 35 kDa correspondiente a PRPK-HA (~26 kDa) al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-GFP. Se indica mediante barras los carriles correspondientes a las co-inmunoprecipitaciones, los carriles restantes corresponden a *inputs*. En el costado izquierdo se indican los pesos moleculares. En el costado derecho de cada imagen se indica contra el anticuerpo utilizado para revelar la co-inmunoprecipitación.

5.2 Objetivo 2: “Análisis de la interacción física entre PRPK y la subunidad del complejo KEOPS, Kae1”.

Se ha caracterizado la estructura atómica del complejo KEOPS en arqueas y se ha visto que PRPK es capaz de interactuar con la sub-unidad Kae1 mediante su extremo C-terminal (Mao y cols., 2008). También se han purificado las distintas subunidades del complejo KEOPS en levaduras y se ha probado que Pcc1 interactúa con Kae1 y este a su vez con Bud32, constituyendo estas tres proteínas, la unidad mínima capaz de producir la modificación t⁶A, mientras que Cgi121 sería un factor alostérico (Perrochia y cols., 2013). Sin embargo, no se ha comprobado la formación del complejo en *Drosophila melanogaster*. Es por eso que es importante comprobar la interacción física entre PRPK y Kae1 en este modelo.

Con el fin de determinar esto, se co-expresó PRPK-Flag y Kae1-HA en el cuerpo graso de larvas de *Drosophila*, utilizando el *driver* Cg-Gal4. Luego se prepararon extractos proteicos a partir de larvas en estadio 3 y se inmunoprecipitó PRPK utilizando un anticuerpo anti Flag.

Se observó que PRPK es capaz de interactuar físicamente con Kae1 (Figura 8), lo que sugiere la existencia del complejo KEOPS en *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, es de interés evaluar si el fenotipo observado en condiciones de pérdidas de PRPK se relaciona con su actividad en el complejo KEOPS.

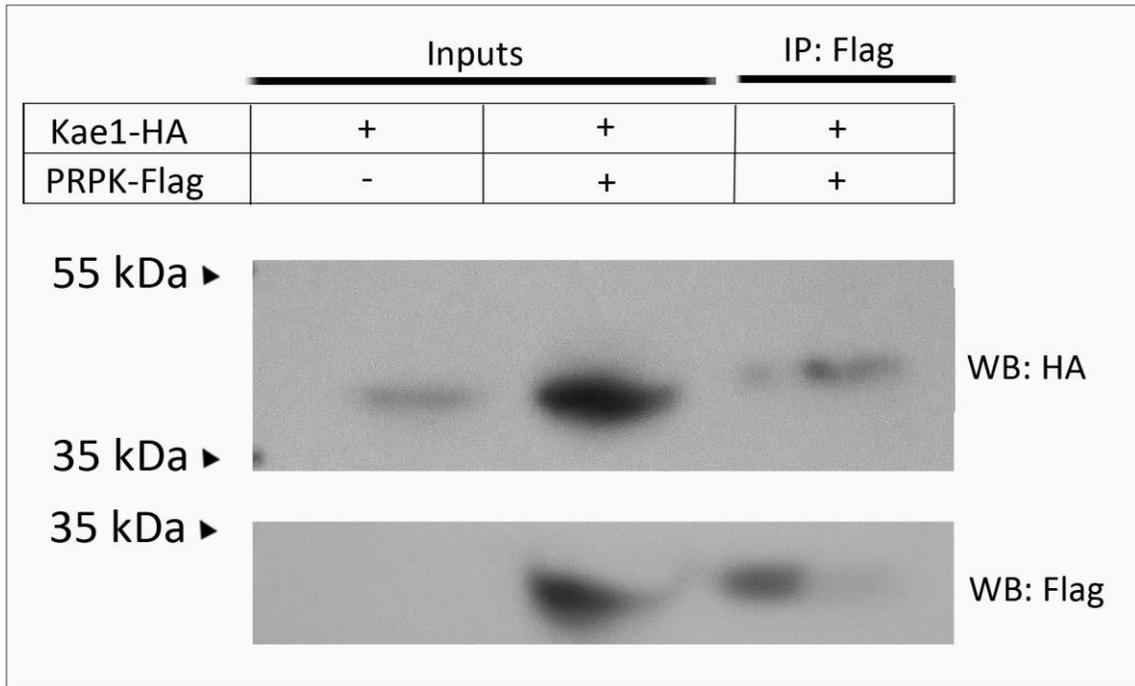


Figura 8. Co-inmunoprecipitación de PRPK y Kae1 en extractos proteicos de cuerpo graso de larvas en *Drosophila melanogaster*. Inmunoblots de larvas que expresan PRPK-Flag y Kae1-HA. Se puede apreciar una banda por sobre los 35 kDa correspondiente a Kae1-HA (~39 kDa) al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-Flag. Se indica mediante una barra el carril correspondiente a la co-inmunoprecipitación. Los dos primeros carriles corresponden a los *inputs*. En el costado izquierdo se indican los pesos moleculares. En el costado derecho de cada imagen se indica el anticuerpo utilizado. Este experimento se realizó 3 veces, obteniendo el mismo resultado.

5.3 Objetivo 3 “Evaluación de los efectos morfológicos de condiciones de pérdidas de función de Kae1 en hemocitos”.

Resultados previos obtenidos en este laboratorio, demuestran que la pérdida de función de PRPK en cultivos primarios de hemocitos, genera un fenotipo estrellado, el cual se asemeja al fenotipo observado en pérdidas de función del complejo Arp2/3. Este fenotipo se caracteriza por una gran cantidad de procesos de membrana “tipo filopodios”-los cuales salen del límite regular de la célula-, pérdida del límite cuerpo celular-lamela y ausencia de un marcador típico de filopodios (Fascin).

Se ha descubierto en levaduras, que PRPK posee un comportamiento dual dependiendo si se encuentra asociada al complejo KEOPS o bien independiente, donde Kae1 en el complejo KEOPS es capaz de cambiar la actividad de PRPK de kinasa a ATPasa (Perrochia y cols., 2013). En vista de estos antecedentes se evaluó si la pérdida de función de Kae1 era capaz de provocar un fenotipo similar al observado por las pérdidas de PRPK. Para esto, se expresó un ARN interferente para Kae1 (Kae1 IR) mediante el sistema Gal4-UAS, utilizando el *driver* Cg-Gal4 y se observó un fenotipo similar al observado en hemocitos PRPK IR (Figura 9). En una primera instancia, estos resultados sugerían que el fenotipo observado se debía a una pérdida de función del complejo KEOPS, ya que tanto la pérdida de PRPK como Kae1 provocaban un fenotipo similar.

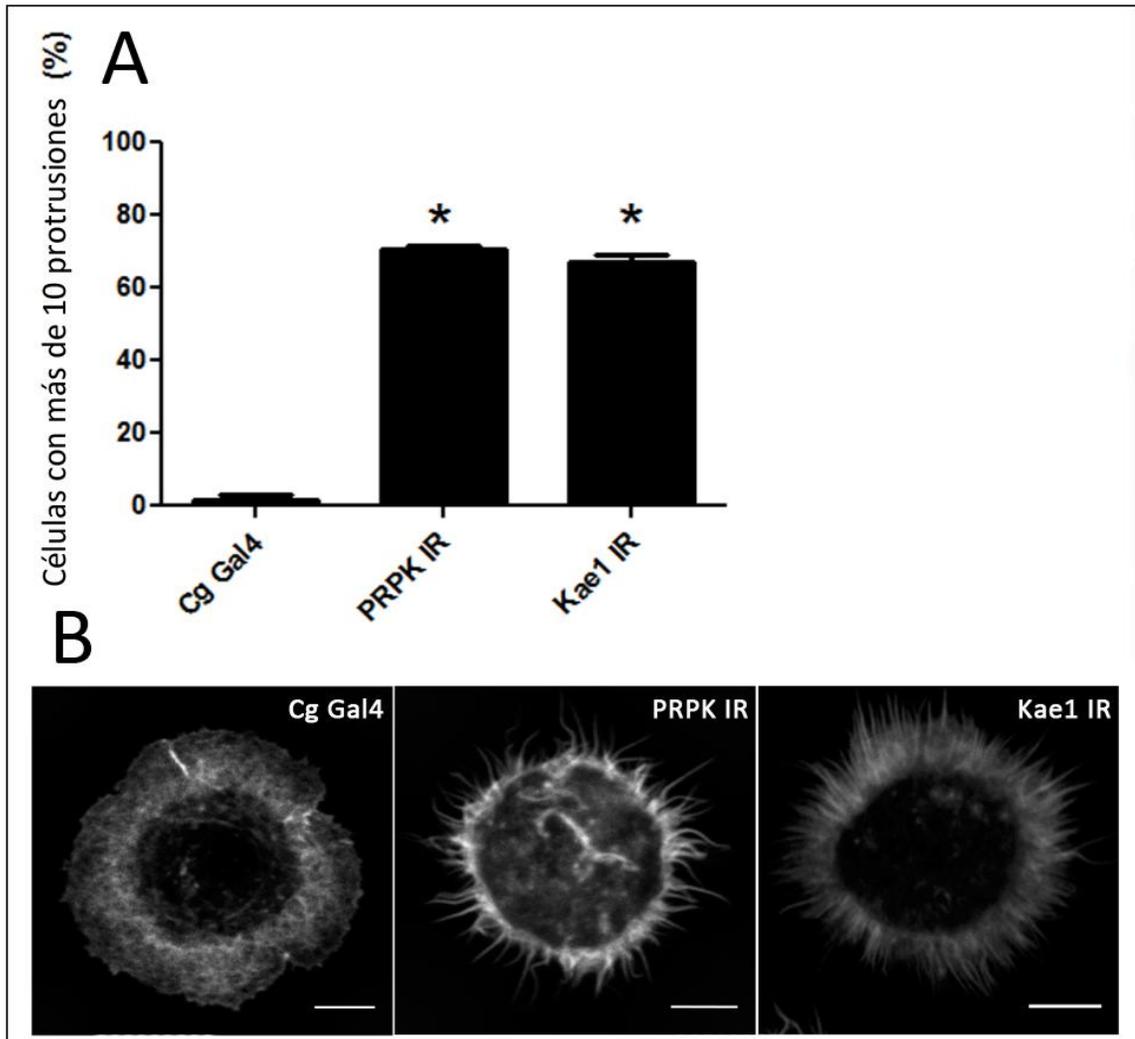


Figura 9. Cuantificación del fenotipo estrellado en cultivos primarios de hemocitos. Para la cuantificación del fenotipo de pérdida de función de Kae1 y PRPK, se escogió como parámetro el porcentaje de hemocitos con más de 10 protrusiones (A). Inmunocitoquímicas para faloidina-TRITC para hemocito control, PRPK IR y Kae1 IR (B). Barra 5 μ m.

El paso siguiente fue caracterizar los procesos de membrana que se observan en hemocitos Kae1 IR mediante inmunofluorescencias contra Fascin y β -Tubulina. Fascin corresponde a una proteína encargada de estabilizar los filamentos paralelos de actina, por lo tanto es un marcador de filopodios (Kureishy y cols., 2002). Se ha visto que cdc42 induce la formación de filopodios (Mattila y cols., 2008) y al expresar la versión constitutivamente activa de cdc42 (cdc42^{V12}) se aprecia la formación de protrusiones que marcan para Fascin, lo que confirma su identidad de filopodios (Figura 10). Sin embargo, hemocitos Kae1 IR presentan múltiples protrusiones que carecen de marca para Fascin, lo que indica que no corresponden a filopodios, similar a lo descrito anteriormente en este laboratorio en hemocitos PRPK IR (Cataldo V., Tesis de Pregrado, 2013) (Figura 10). β -Tubulina corresponde a una de las subunidades de los microtúbulos, cuya red se distribuye exclusivamente por el córtex del cuerpo celular. Se ha descrito que Rac1 es capaz de inducir el crecimiento de microtúbulos en la lamela a través de la regulación de las kinasas Pak (Wittmann y cols., 2003). Al realizar una ganancia de función de la proteína Rac1 en hemocitos, se observó la presencia de β -Tubulina fuera del córtex celular y al expresar cdc42^{V12} también se observó presencia de β -Tubulina en la lamela, pero ausente en los filopodios. Sin embargo, en hemocitos Kae1 IR se observó que algunos de los procesos de membrana poseen marca para β -Tubulina (Figura 11), similar a lo descrito anteriormente en este laboratorio en hemocitos PRPK IR (Cataldo V., Tesis de Pregrado, 2013).

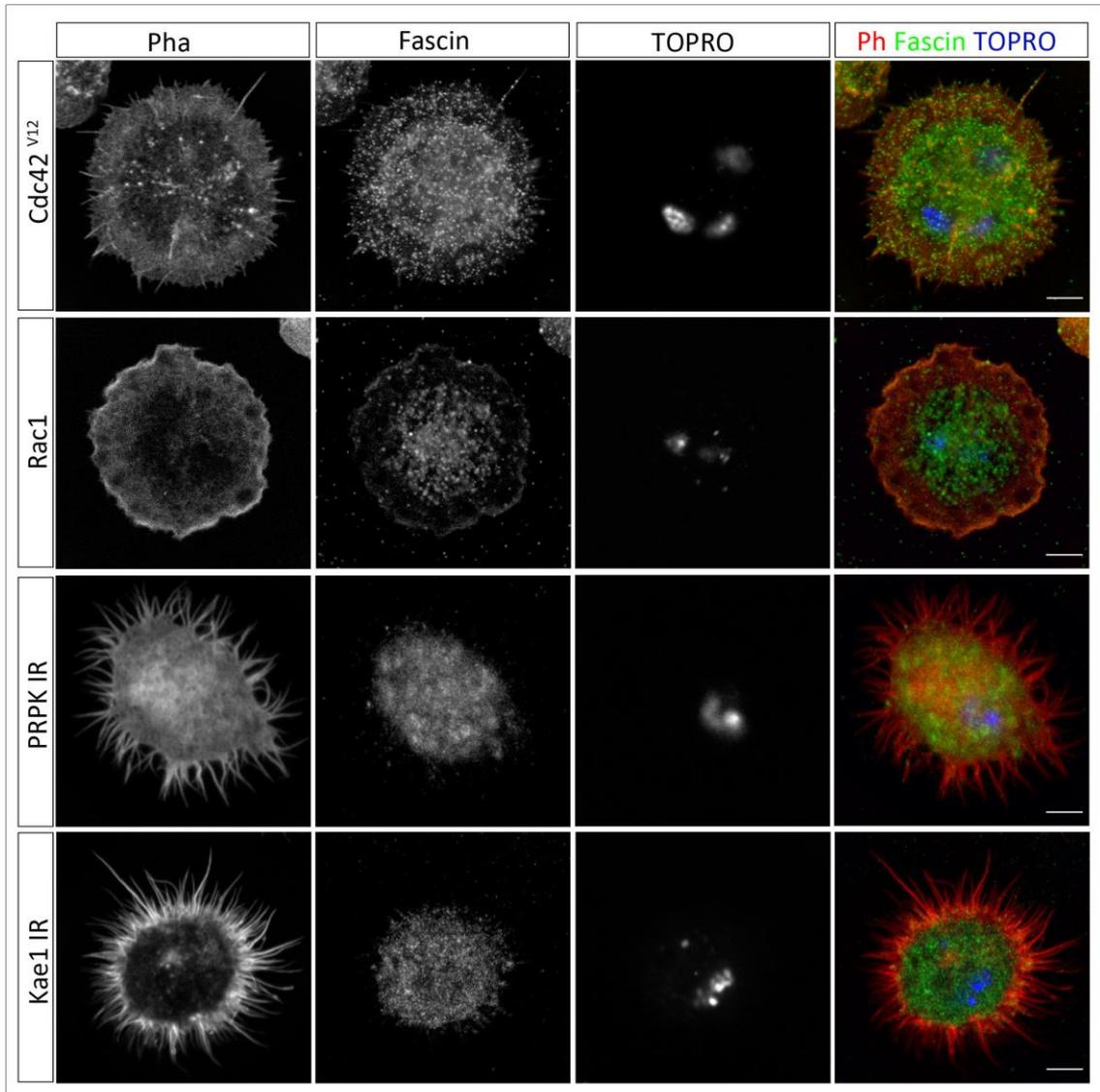


Figura 10. Distribución de Fascin en hemocitos Rac1, Cdc42^{V12}, PRPK IR y Kae1 IR. Inmunofluorescencia contra Fascin (canal verde) y tinciones de actina filamentosa con faloidina-TRITC (canal rojo). Barra 5 μ m.

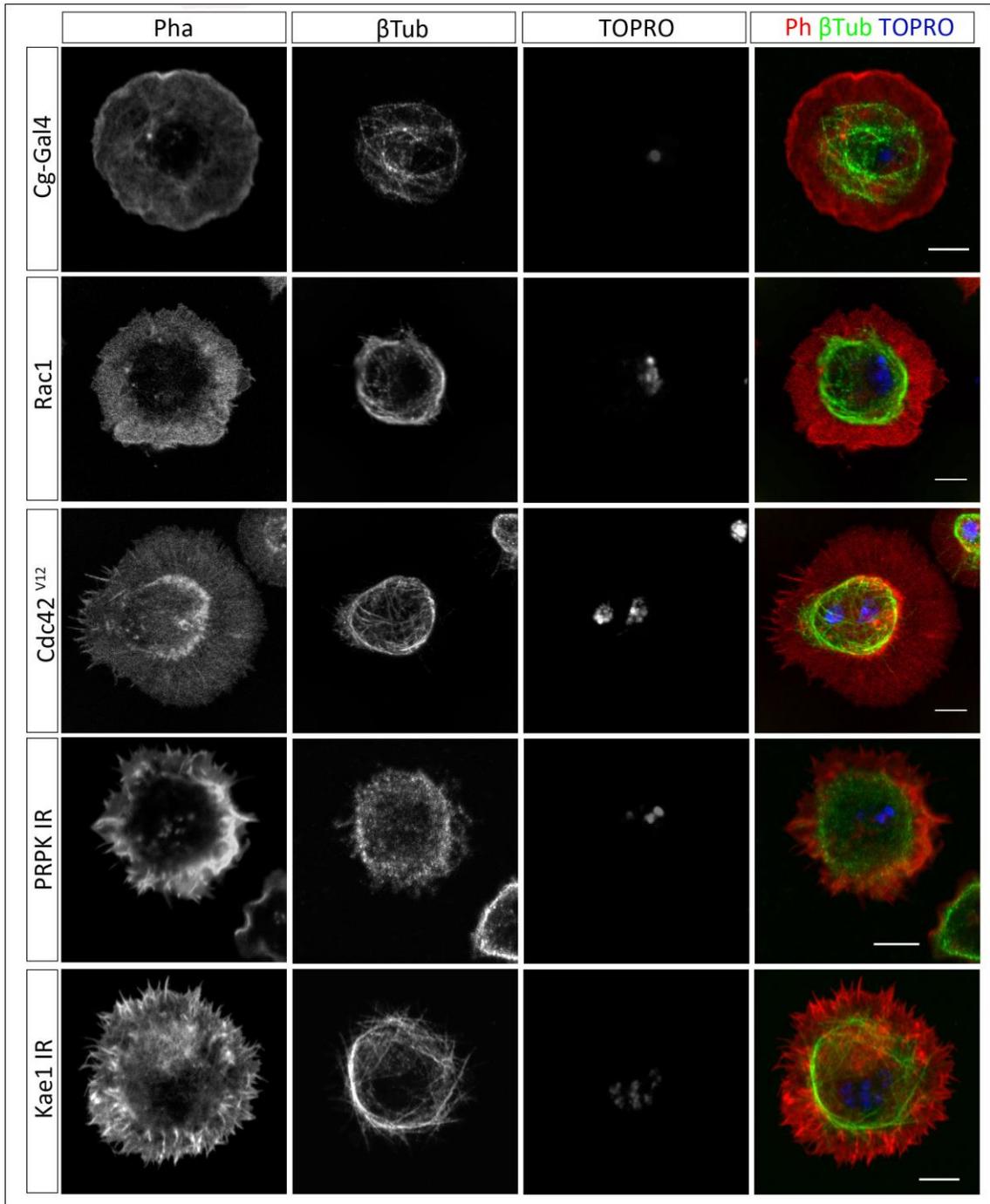


Figura 11. Distribución de β -Tubulina en hemocitos Rac1, *cdc42^{v12}*, PRPK IR y Kae1 IR. Inmunofluorescencia contra β -Tubulina (canal verde) y tinciones de actina filamentosa con faloidina-TRITC (canal rojo). Barra 5 μ m.

Para corroborar lo obtenido con el ARN interferente para Kae1 contamos con una mosca mutante nula para este gen ($kae1^{-/-}$). Se observó que son inviables en homocigosis, viven solo hasta el tercer estadio larvario y poseen un tamaño significativamente menor. Se analizaron cultivos primarios de hemocitos para $kae1^{-/-}$ y se observó un fenotipo totalmente distinto al observado en moscas PRPK IR, con una gran heterogeneidad, donde se pueden encontrar hemocitos con morfología aberrante, pero sin la proporción de hemocitos estrellados que se observa en hemocitos PRPK IR (Figura 12).

Se analizó la distribución de β -Tubulina en hemocitos $kae1^{-/-}$, donde encontramos células que presentan un gran número de protrusiones pero solo algunas de ellas marcan para β -Tubulina (Figura 12.1), también se observaron células irregulares sin presencia de protrusiones, pero con marca de β -Tubulina fuera del córtex celular (Figura 12.2) e incluso algunas células con marca para β -Tubulina en la totalidad de la célula (Figura 12.3), lo que sugiere una desestructuración de la lamela.

Ya que los experimentos realizados con el interferente de Kae1 corresponden a pérdidas parciales de Kae1, mientras que el mutante $kae1^{-/-}$ corresponde a un mutante nulo para Kae1, quisimos emular una condición intermedia entre la pérdida total y la pérdida parcial de Kae1 realizando una ganancia de Kae1 en un *background* mutante para *kae1*.

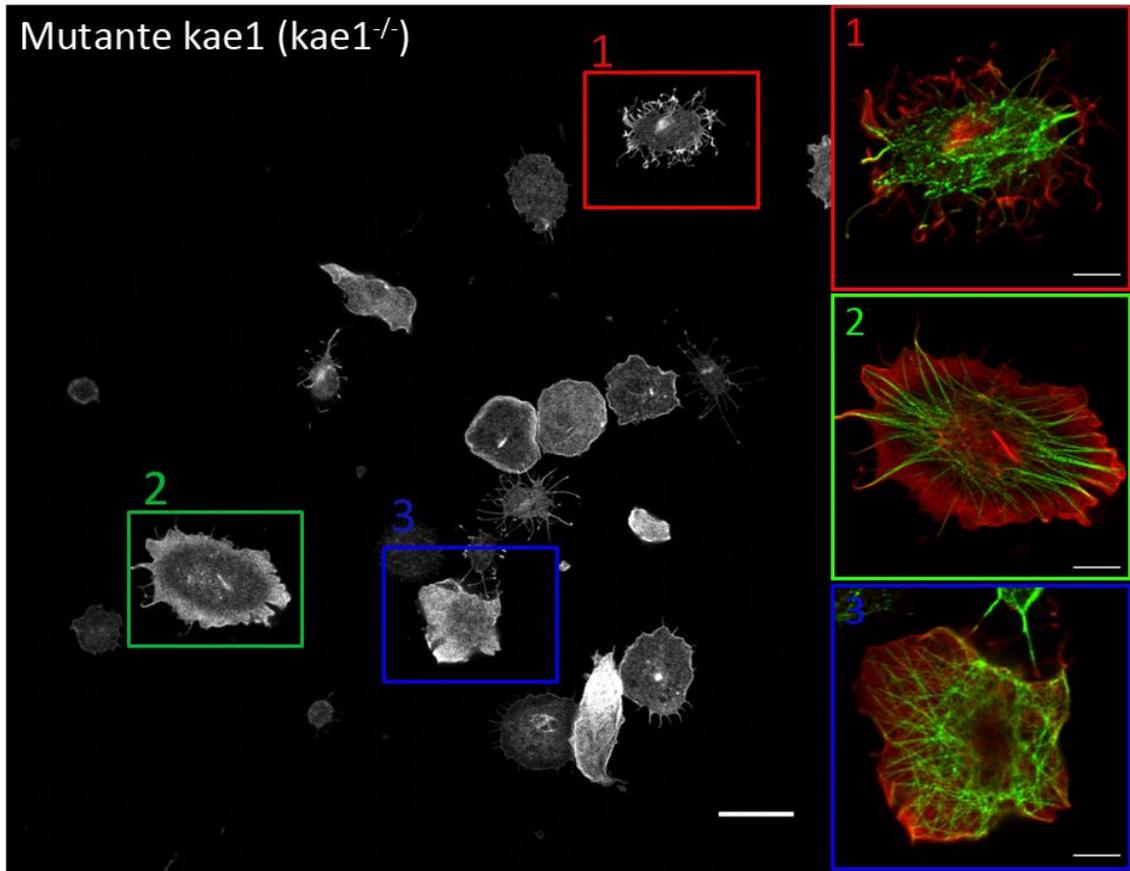


Figura 12. Fenotipo mutante para *kae1* (*kae1*^{-/-}) en hemocitos. Inmunocitoquímicas para faloidina-TRITC de hemocitos *kae1*^{-/-} en campo completo (A). Inmunofluorescencia contra β -Tubulina (canal verde) y tinciones de actina filamentosa con faloidina-TRITC (canal rojo) (B). Barra 10 μ m en imágenes de campo completo y 5 μ m para células individuales.

Para esto, se realizaron ganancias de función de Kae1 utilizando el *driver* Hs-Gal4 en un *background* homocigoto mutante para kae1 (Hs-Gal4/UAS-Kae1; *kae1*^{-/-}). De esta forma se pueden realizar ganancias graduales de Kae1, al aumentar la temperatura. Este experimento se realizó a 17 y 25°C, donde en ambos casos se observó un rescate del fenotipo mutante siendo más evidente a 25°C. En ambas temperaturas no se observó un aumento en la proporción de hemocitos estrellados, lo que sugiere que el fenotipo observado en el mutante *kae1*^{-/-} no corresponde a una exacerbación del fenotipo estrellado (Figura 13A).

En la misma dirección, se expresó el ARNi de Kae1 de manera ubicua mediante el *driver* Tub-Gal4 y se observó un fenotipo similar al mutante *kae1*^{-/-}, lo que confirma la especificidad del ARNi para Kae1, mientras que la expresión del ARNi de PRPK con este *driver* conservó el fenotipo estrellado (Figura 13B).

Estos resultados indican que el fenotipo observado en el mutante de *kae1* no se asemeja al observado en condiciones de pérdida de función de PRPK. Esto sugiere que el rol de PRPK en la determinación de la forma celular es independiente del complejo KEOPS.

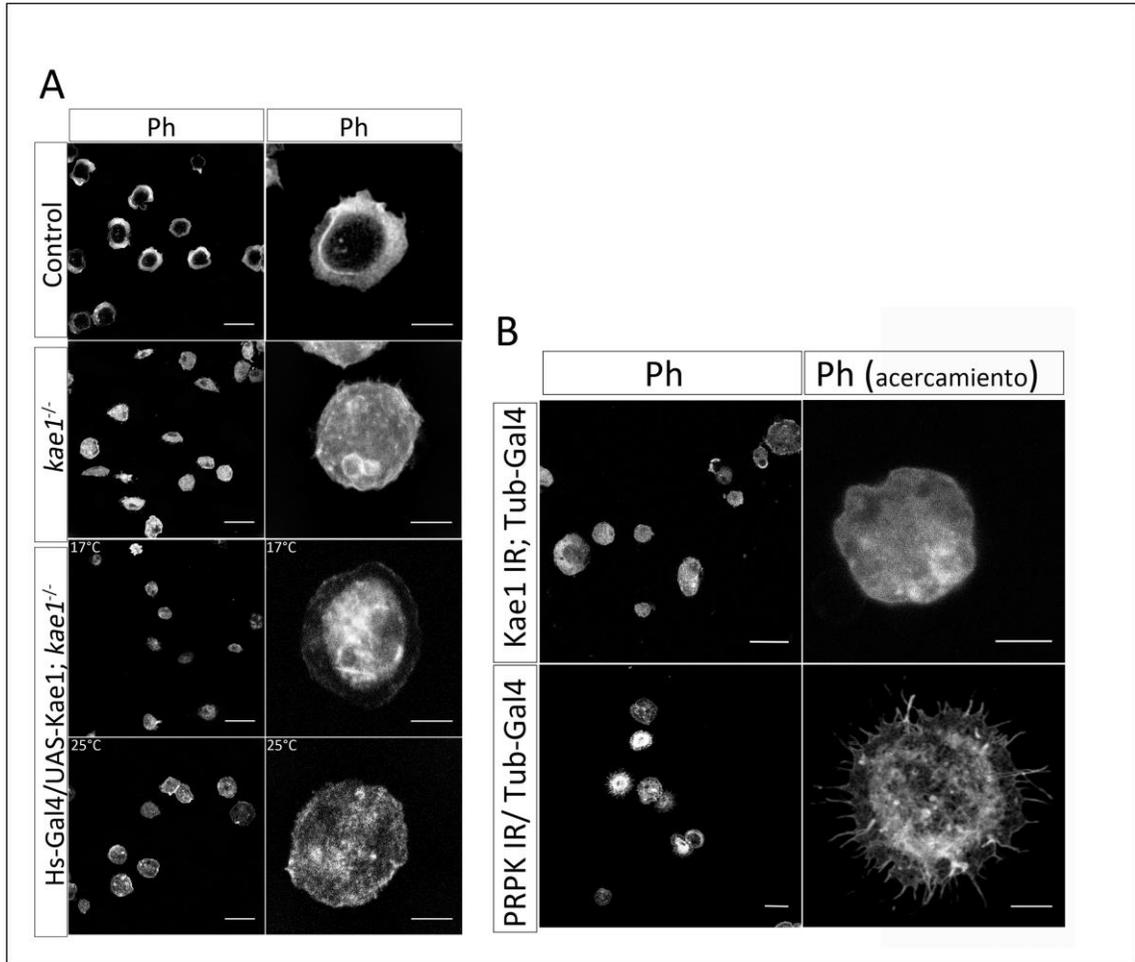


Figura 13. Morfología de hemocitos mutantes para *kae1*, Kae1 IR en mosca *competa* y ganancia de Kae1 en *background* mutante para *kae1*. Inmunocitoquímicas para faloidina-TRITC (A) y (B). Ganancia de Kae1 en *background* mutante para *kae1*, mediante el *driver* sensible a temperatura Hs-Gal4. El experimento se realizó tanto a 17°C como a 25°C (A). Expresión de RNAi para Kae1 y PRPK mediante el *driver* ubicuo Tub-Gal4 (B). Barra 20 μ m para imágenes de campo completo y 5 μ m para células individuales.

Con estos resultados, nos propusimos establecer si el fenotipo observado es producto de una pérdida en la capacidad de PRPK de ser fosforilada por Akt, si se debe a una pérdida en su actividad kinasa *per-sé*, o si el rol de PRPK en la determinación de la forma celular recae en su extremo C-terminal. Para esto, contamos con diversas versiones mutantes de PRPK: la versión fosfomimética (T221D), el mutante para el sitio de fosforilación por Akt (T221A), un mutante del sitio catalítico (D132R) y un mutante que carece de los 9 últimos aminoácidos del extremo C terminal (ΔC) (Figura 14^a). Evaluamos las distintas versiones en tanto a su capacidad de rescatar el fenotipo PRPK IR. Encontramos que todas las versiones revirtieron el fenotipo estrellado a excepción de la versión PRPK ΔC (Figura 14B, C y Figura Suplementaria 1).

Este resultado pone en evidencia la importancia estructural de PRPK, particularmente en la región carboxilo terminal, por sobre su actividad kinasa, lo que sugiere estudiar su asociación con otras proteínas que regulan el citoesqueleto y la forma en la cual estaría regulando la actividad de estas.

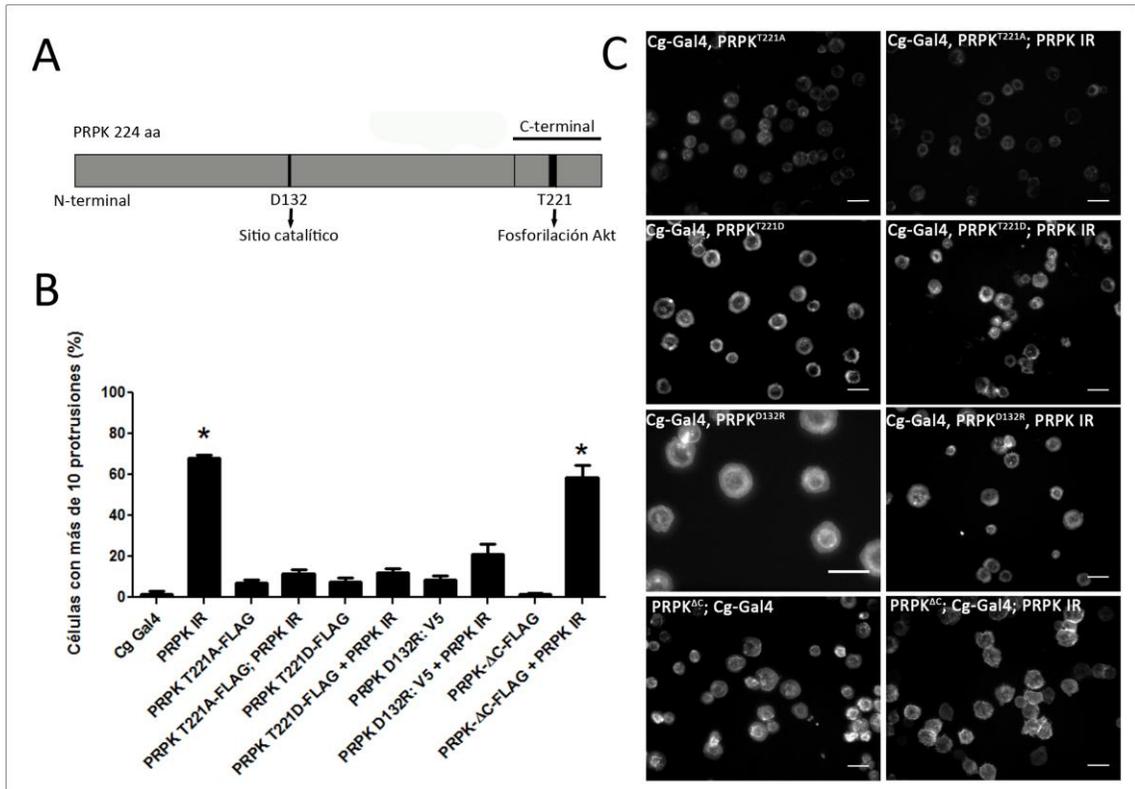


Figura 14. Cuantificación del fenotipo estrellado en cultivos primarios de hemocitos. Esquema de la secuencia proteica de PRPK donde indica el sitio catalítico en el residuo D132, el sitio de fosforilación por Akt en el residuo T221 y el extremo C-terminal (A). Cuantificación del porcentaje de hemocitos con más de 10 protrusiones para las distintas versiones de PRPK-fosfomimética (T221D), no fosforilable por Akt (T221A), mutante del sitio catalítico (D132R) y carente del extremo C-terminal (Δ C)-sobre el fenotipo PRPK IR. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis con un $n=4$ para cada condición (B). Imágenes de campo completo para las distintas versiones de PRPK como también la co-expresión de estas junto con el ARN interferente de PRPK (C). Barra 20 μ m.

5.4 Objetivo 4: “Evaluación del efecto del silenciamiento de PRPK sobre la dinámica de protrusiones de membrana”.

Para evaluar la capacidad contráctil de los hemocitos y la dinámica del citoesqueleto de actina, se realizaron películas de cultivos primarios de hemocitos que expresan la proteína de fusión LifeAct-GFP. La proteína LifeAct está formada por 17 aminoácidos y posee la capacidad de unirse a filamentos de F-actina sin alterar la dinámica de estos (Riedl y cols., 2008). De esta forma se puede evaluar la dinámica del citoesqueleto de actina.

Los resultados indican que en condiciones normales existe un flujo constante de actina que se propaga de forma concéntrica desde el cuerpo celular hacia la membrana plasmática. Esta observación se aprecia con mayor facilidad en un mapa colorimétrico de intensidad de fluorescencia (Figura 15 A', B' y C'). En condiciones de pérdida de función de PRPK se observa una alteración en la dinámica normal del citoesqueleto de actina, ya que las protrusiones “tipo filopodios” solo presentan una actividad protrusiva residual, al igual que en condiciones de pérdida del complejo Arp2/3 (Arpc4 IR). Al observar el mapa colorimétrico para PRPK IR y Arpc4 IR, se puede concluir que a pesar de que posee regiones con elevada intensidad de fluorescencia, estas regiones son poco dinámicas ya que casi no varían sus niveles de fluorescencia a través del tiempo (Figura 15 C' y D'). Esto se contrapone a lo observado en condiciones de ganancia de Cdc42^{V12}, donde se ven filopodios que se estiran y

contraen a lo largo del tiempo de filmación. Además, el mapa colorimétrico denota una dinámica similar o incluso mayor a la observada en el control (Figura 15 B”, Videos Suplementarios 1 y 2).

A pesar de que en todas las condiciones analizadas se aprecia una disminución del área celular -lo que puede atribuirse al estrés provocado por la excitación del láser- , se observan diferencias claras en la dinámica de las protrusiones de membrana (Videos Suplementarios 1-4).

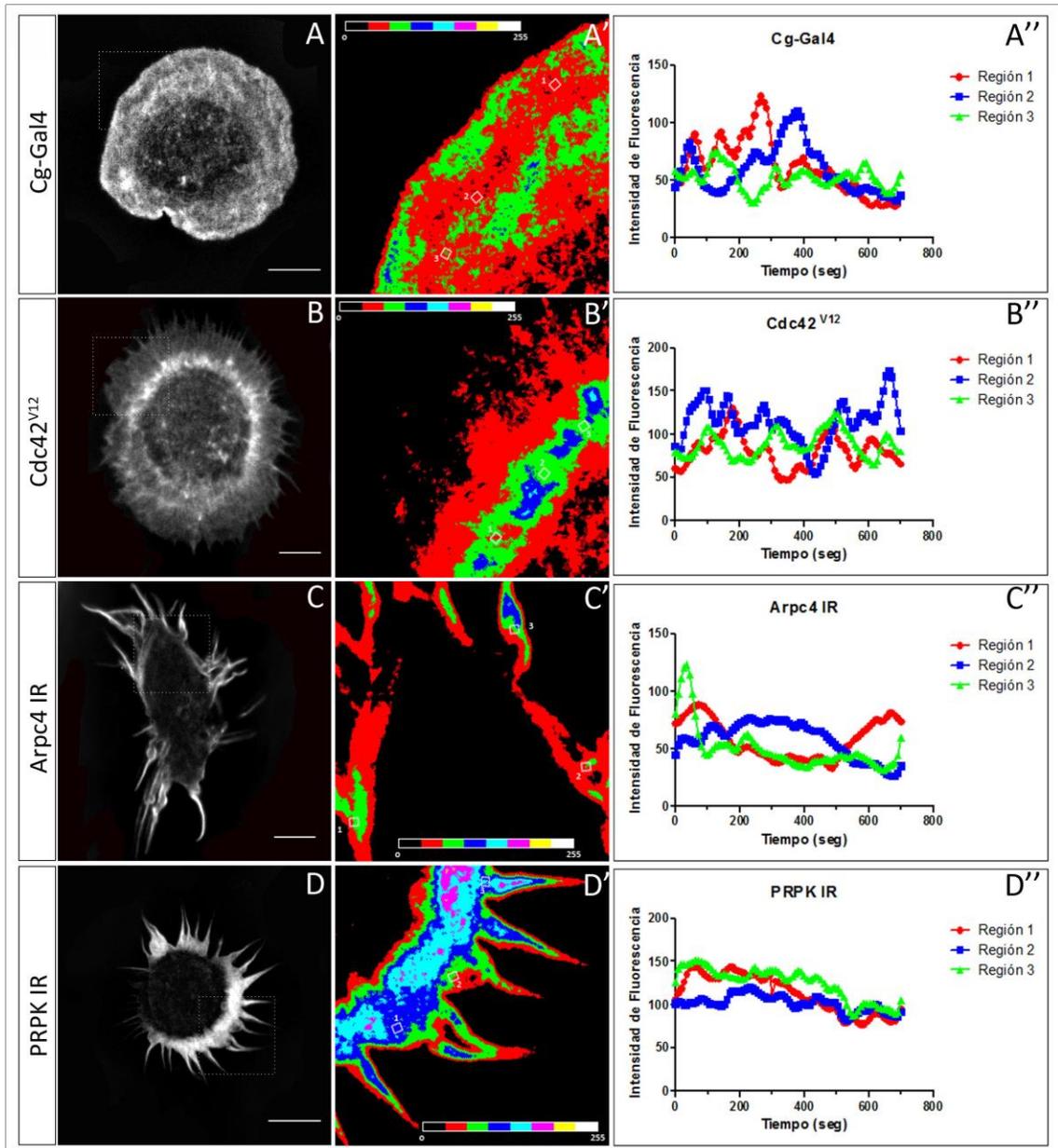


Figura 15. Histogramas para la proteína LifeAct-GFP en hemocitos control, *cdc42^{V12}*, *Arpc4 IR* y *PRPK IR*. Imágenes de microscopía confocal para las distintas condiciones (A-D). Mapa pseudocoloreado con intensidades entre 0 y 255, siendo el negro el valor más bajo y el blanco el más alto, pasando por rojo, verde, azul, cian, magenta y amarillo. Las regiones cuantificadas corresponden a los recuadros (A'-D'). Histogramas de intensidad de fluorescencia (A''-D''). Las imágenes fueron capturadas cada 8,75 segundos durante ~12 minutos mediante microscopía confocal. Barra: 10 μm . Se anexan Videos Suplementarios 1-4.

5.5 Objetivo 5: “Evaluación del efecto *in vivo* del silenciamiento de PRPK en el patrón de migración de los hemocitos embrionarios, en respuesta a daño tisular en larva y en contexto de migración aleatoria (pupa)”.

Este objetivo fue abordado en distintos estadios del desarrollo de *Drosophila* (embrión, larva y pupa) y en distintos contextos (fisiológico y en respuesta a daño).

5.5.1 Estadío Embrionario

El patrón de migración de hemocitos durante el estadio embrionario constituye un modelo ideal para el estudio de factores que alteran tanto la dinámica del citoesqueleto de actina, como la capacidad de migración de estos.

Para estudiar el rol de PRPK en la dinámica de migración de hemocitos, expresamos el ARN interferente contra PRPK en hemocitos embrionarios mediante el uso de los *drivers* crq-Gal4 y srp-Gal4, los que a su vez están recombinados con una secuencia UAS que codifica para la proteína GFP.

Para observar el efecto de la pérdida de función de PRPK se consideraron dos estadios claves en la migración de hemocitos embrionarios. El primero es el estadio 12-13, en el cual los hemocitos se distribuyen a lo largo del CNV y migran de forma lateral formando 3 líneas paralelas a lo largo del eje antero-posterior, donde cualquier alteración se traduciría en un desplazamiento aberrante o un retraso en la migración respecto al control. El segundo

corresponde al estadio 15, donde los hemocitos están distribuidos a lo largo del embrión y es posible observar alteraciones como la ausencia de repulsiones por contacto, como observó Comber y cols. (2013) en mutantes para *myspheroid*.

Los resultados indican que en condiciones normales, los hemocitos en estadio 13 se distribuyen desde el centro del CNV formando 3 líneas paralelas al cabo de 1 hora (Figura 16 y Video Suplementario 5). En cambio, la pérdida de función de PRPK produce un retraso en el movimiento lateral de los hemocitos desde el centro del CNV (Figura 16). En el estadio 15 se observa que el movimiento es bastante reducido para todas las condiciones, ya que los hemocitos han culminado con el proceso de migración y se encuentran distribuidos por todo el embrión. También se observan cúmulos de hemocitos, con ausencia de repulsiones por contacto en embriones PRPK IR (Figura 16 y Video Suplementario 7).

Estos resultados indican que al recolectar embriones de 12 ± 1 horas post fertilización -que corresponde al estadio 15 embrionario- existe un retraso en la migración de hemocitos para la condición PRPK IR. Sin embargo, logran completar el patrón de migración al igual que la condición control (Figura Suplementaria 2).

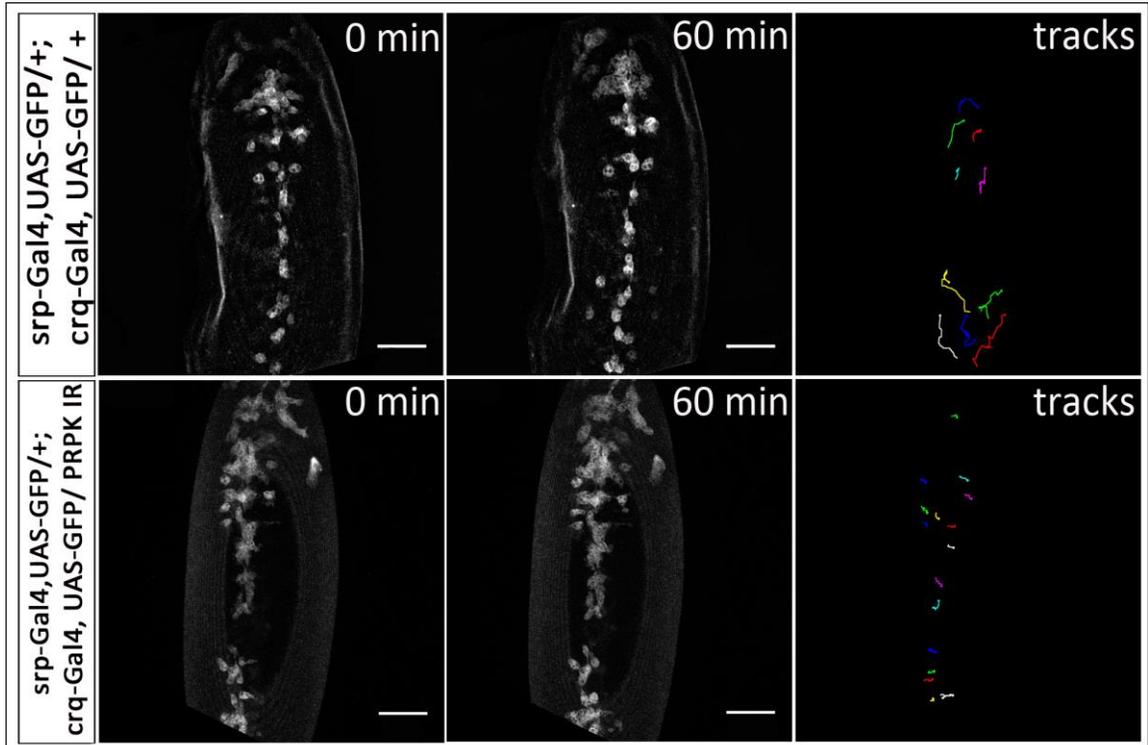


Figura 16. Patrón de migración de hemocitos en embriones control y PRPK. “Time-lapse” de hemocitos que expresan GFP en embriones en estadio 13. Se muestra mediante líneas de colores la trayectoria de los hemocitos en ambas condiciones. Los videos corresponden a una proyección en el eje Z de 15 cortes. Las imágenes fueron capturadas cada 2 minutos durante 1 hora mediante microscopio confocal. Barra: 50 μ m. Se anexan videos suplementarios (5 al 7) para cada condición.

5.5.2 Estadio larvario

Al final del estadio embrionario y poco antes de pasar al estadio larvario, el corazón (vaso dorsal) comienza a bombear y se inicia la circulación de las células libres. Esto constituye el comienzo del funcionamiento del sistema circulatorio abierto. Se ha descrito que al cabo del tercer estadio larvario existen 2 poblaciones de hemocitos, una sésil y una libre en la circulación de la larva, siendo esta última la que responde en caso de daño tisular.

Como los resultados anteriores sugieren que la pérdida de PRPK involucra una pérdida de la dinámica del citoesqueleto y de la capacidad contráctil de los hemocitos, nos propusimos evaluar el rol de PRPK en un contexto de daño tisular en larvas en tercer estadio. Para ello se seleccionaron larvas en estadio 3 para cada condición. Estas se dañaron mediante un filamento de tungsteno en el segmento A6 por la cara dorsal (detalles en la metodología). Luego se evaluó el número de hemocitos reclutados en el sitio de la herida al cabo de 6 horas, según protocolo descrito por Kadandale y cols. (2009).

Los resultados indican que la pérdida de función de PRPK disminuye el número de hemocitos reclutados al sitio de la herida al cabo de 6 horas. Esto sugiere que la pérdida de función de PRPK altera la dinámica del citoesqueleto y en un contexto de daño tisular se traduce en una disminución de la capacidad de adhesión de los hemocitos a tejidos dañados (Figura 17).

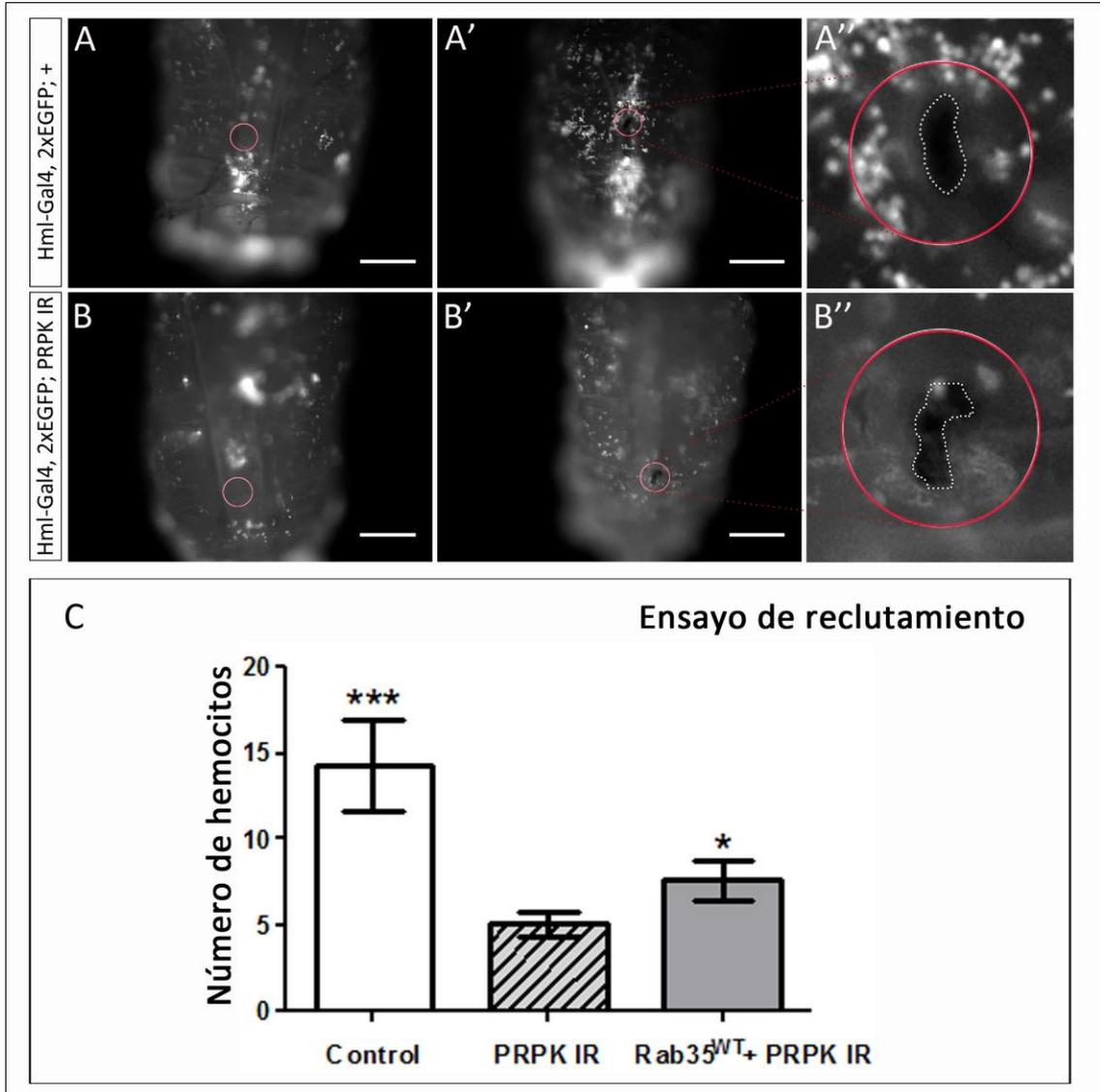


Figura 17. Reclutamiento de hemocitos en respuesta a daño tisular. Se montaron larvas de tercer estadio larvario con su cara ventral hacia abajo y se dañaron con un filamento de tungsteno entre los segmentos A5 y A7, en una zona sin hemocitos sésiles. Larva control (A) y PRPK IR (B) antes del daño. Larva control (A') y PRPK IR (B') 6 horas post-daño. Las imágenes A'' y B'' corresponden a un acercamiento de las imágenes A' y B'. El círculo rojo indica la zona que fue dañada, posee un diámetro del doble del tamaño de la herida y corresponde al área de cuantificación de los hemocitos. Barra: 150 μ m. Gráfico que muestra el número de hemocitos reclutados al sitio de herida al cabo de 6 horas (C). Los datos están promediados \pm SEM. Control (n=23), PRPK IR (n=26) y PRPK IR + Rab35^{WT} (n=13). Test de Mann Whitney comparando la condición Control y PRPK IR + Rab35^{WT} contra PRPK IR * P < 0.05.

5.5.3 Ensayo de Migración de hemocitos en Pupas

El ensayo de migración celular en pupas en respuesta a daño es uno de los más atractivos, ya que en él confluyen las herramientas genéticas disponibles en *Drosophila*, sumado a las ventajas que ofrece la translucidez del tórax de la pupa. En estadio de pupa, los hemocitos migran de forma aleatoria y mediante este ensayo podemos observar si existe una alteración en la migración, en ausencia de un gradiente de quimioattractantes.

Una de las primeras aproximaciones que hemos realizado en relación a este ensayo, consiste en la cuantificación de la velocidad promedio ($\mu\text{m}/\text{min}$) y la distancia acumulada (μm) tanto para la condición control (Hml-Gal4, 2X EGFP; +) como experimental (Hml-Gal4, 2X EGFP; PRPK IR). El experimento se realizó según el protocolo descrito por Moreira y cols. (2011).

Observamos una disminución de ambos parámetros en condiciones de pérdida de función de PRPK, lo que refuerza la hipótesis de la participación de PRPK en la dinámica del citoesqueleto de actina. Además se observan hemocitos de forma aberrante (muy pequeños y de apariencia disgregada) (Figura 18, panel inferior. Video Suplementario 10).

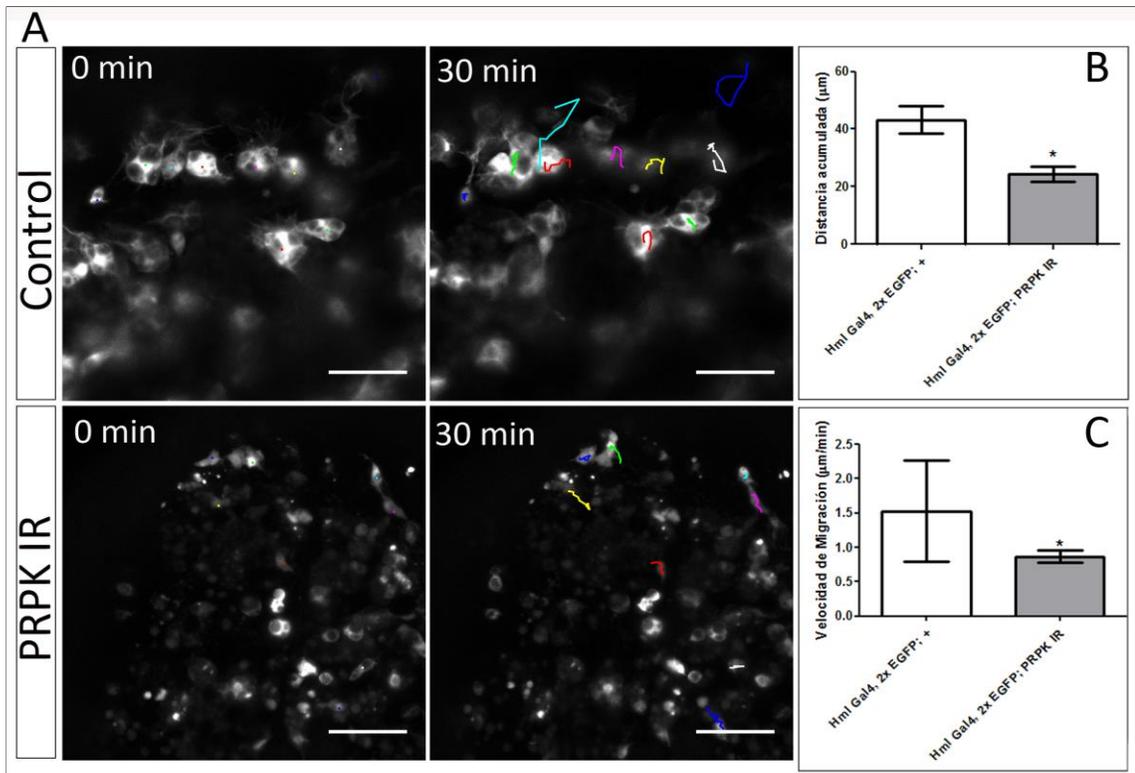


Figura 18. Ensayo de migración *in-vivo*. “Time-lapse” de hemocitos pupales que expresan GFP. Hemocitos pupales en tiempo=0 (A) y tiempo=30 min. Las líneas de colores indican la trayectoria de los hemocitos en ambas condiciones. Gráficos para la distancia acumulada (B) y la velocidad de migración (C). Los videos corresponden a una proyección en el eje Z de 15 cortes de 1 µm, cada 2 minutos y durante 30 minutos. Los datos están promediados ± s.d. Control (n=3) and PRPK IR (n=3). Se aplicó la prueba t de Student *P< 0,05. Barra: 50 µm. Se anexan videos suplementarios (8 al 11) para cada condición.

Existiendo fallas en la capacidad migratoria de los hemocitos en condiciones PRPK IR, cabe preguntarse si la maquinaria necesaria para la migración celular está alterada. Un primer acercamiento consiste en evaluar la fosforilación de la cadena liviana de la miosina-2 (p-MLC2), ya que el complejo de la miosina-2 es responsable de las fuerzas contráctiles necesarias para la migración, tanto en el extremo delantero como trasero de la célula. Resultados previos obtenidos en el laboratorio, indican una disminución en los niveles de p-MLC2 en hemocitos PRPK IR. Sin embargo no se pudieron evaluar los niveles totales de miosina-2. Durante la realización de esta tesis se confirmó que los niveles de p-MLC2 disminuyen tanto en hemocitos PRPK IR como Kae1 IR (Figura 19B), mientras que los niveles de miosina total no varían (Figura 19A). Esto indica una disminución en la actividad contráctil mediada por el complejo de la miosina-2.

No existen antecedentes que vinculen a Arp2/3 con la fosforilación o la activación de MLC2. Sin embargo, se ha visto que Rac1 y Cdc42 son responsables de la activación de las kinasas MRCK y PAK, las cuales se encargan de fosforilar a MLC2 (Brzeska y cols, 2004; Wilkinson y cols, 2005). Es posible que la alteración de la lamela y el lamelipodio a causa de la pérdida de PRPK, afecte la distribución normal de estas GTPasas en estas estructuras, impidiendo la activación de las kinasas MRCK y PAK.

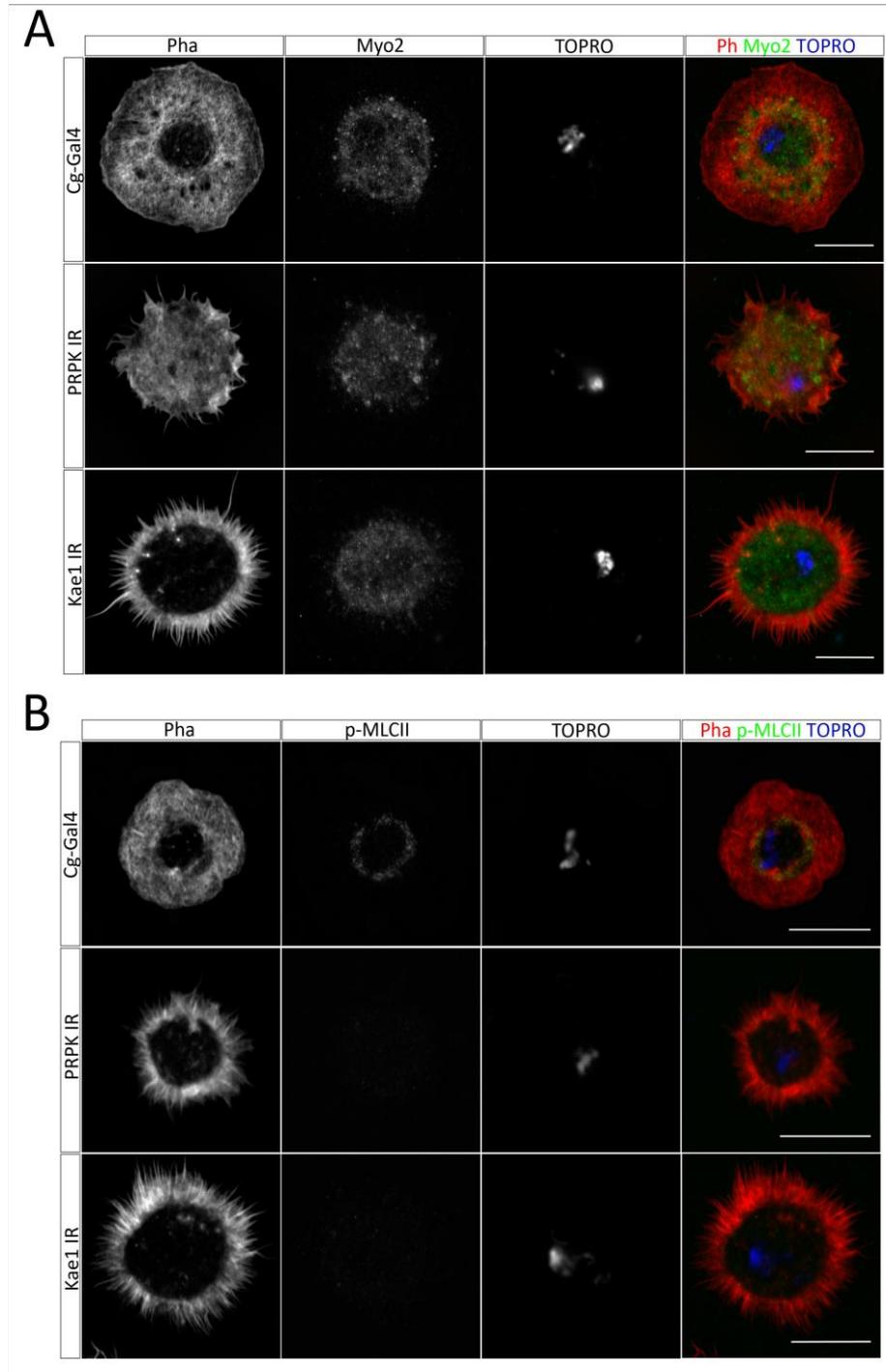


Figura 19. Distribución de Miosina total (Myo2) y la cadena liviana de la miosina 2 fosforilada (p-MLCII) en hemocitos control, PRPK IR y Kae1 IR. Inmunofluorescencia contra p-MLC2 total (A) y p-MLC2 total (B) (canal verde). Actina filamentososa (canal rojo). Núcleo (canal azul). Escala 10 μ m.

6. DISCUSIÓN

6.1 Interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35.

En células humanas se ha descrito que Rab35 interactúa con PRPK, tanto en su forma nativa como constitutivamente activa, no así la versión dominante negativa Rab35^{N120I}. Además se ha visto que modula los efectos de PRPK sobre la actividad transcripcional de p53 (Abe y cols., 2006).

Estudios en *Drosophila* indican que Rab35 recluta a la proteína Fascin a la membrana plasmática (Zhang y cols., 2009). Otros estudios indican que también recluta a Cdc42 y Rac1 (Shim y cols., 2010). Estudios en nuestro laboratorio han determinado que Rab35 cambia su localización tanto en disco imaginal de ala como en las glándulas salivales al silenciar la expresión de PRPK (Vasquéz-Doorman C., Tesis de Pregrado, 2010). Por otro lado Rab35 rescata el fenotipo PRPK IR en hemocitos, lo que sugiere una interacción funcional entre PRPK y Rab35. Finalmente, al co-expresar PRPK y distintas formas de Rab35 en hemocitos, se observa mayor co-distribución de PRPK con la versión dominante negativa de Rab35. (Cataldo V, Tesis de Pregrado, 2013).

En vista de los antecedentes mencionados, decidimos evaluar la interacción física entre PRPK y las distintas versiones de Rab35 en *Drosophila*. Los resultados obtenidos indican que PRPK es capaz de interactuar con las distintas versiones de Rab35. Sin embargo, no es posible asegurar si PRPK

interactúa con mayor afinidad con alguna versión en particular. En este sentido, queda por evaluar el efecto de la pérdida y ganancia de función de PRPK sobre los niveles de las distintas versiones de Rab35, lo que daría cuenta de una posible regulación de la estabilidad de las distintas formas de Rab35.

En vista de los antecedentes y los resultados obtenidos durante esta tesis respecto a la importancia del extremo C-terminal de PRPK, sería interesante evaluar si la interacción física entre PRPK y Rab35 depende del extremo C-terminal.

Existen antecedentes respecto de la función de Rab35 en migración que sugieren un antagonismo entre Rab35 y Arf6. Donde Rab35 activo (Rab35-GTP) inhibe a Arf6, lo cual promueve la interacción célula-célula manteniendo las cadherinas en la superficie celular. Rab35-GTP recluta a su efector ACAP2, el cual es una proteína activadora de GTPasa (GAP) de Arf6, de esta forma inactiva a Arf6. A su vez, Arf6 activo (Arf6-GTP) promueve el reciclaje de integrinas y la activación de su vía de señalización de integrinas, lo que finalmente se traduce en una activación de la migración celular. De forma recíproca, Arf6-GTP interactúa físicamente con EPI64B, el cual es GAP de Rab35 (Figura 20) (Allaire y cols., 2013; Shi y Grant, 2012). Estos antecedentes sugieren que el estado GTP/GDP de Rab35 es determinante en la transición entre un contexto de adhesión celular y un contexto de migración.

Sería interesante investigar si PRPK está involucrado en la regulación del estado GTP-GDP de Rab35, ya sea interactuando directamente con Rab35, con su GAP o su proteína intercambiadora de guanina (GEF). Sin embargo, nuestros resultados son contradictorios, ya que Rab35-YFP rescata el fenotipo de pérdida de función de PRPK en contextos de migración.

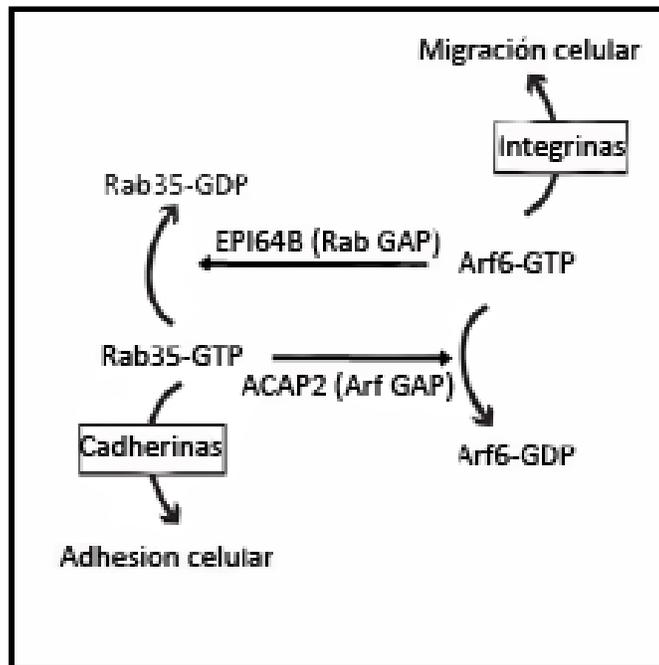


Figura 20. Antagonismo entre Rab35 y Arf6. Rab35-GTP promueve el reciclaje de cadherinas y por lo tanto la adhesión celular. También interactúa con ACAP2, desactivando a Arf6. Arf6-GTP promueve el reciclaje de integrinas a la superficie celular, lo que promueve la migración celular. También interactúa con EPI64B, desactivando a Rab35 (Modificado de Allaire y cols., 2013).

6.2 Interacción física entre PRPK y Kae1.

Como mencionamos anteriormente, se ha descrito que el extremo C-terminal de PRPK de arqueas y levaduras interactúa físicamente con Kae1. Sin embargo, esto no se había comprobado en *Drosophila*. Los resultados indican que PRPK de *Drosophila* también interactúa físicamente con Kae1, aunque no se ha demostrado si esta interacción depende finalmente del extremo C-terminal de PRPK. Otro aspecto importante a estudiar es la participación de las otras subunidades del complejo KEOPS, Pcc1 y Cg1-121 en *Drosophila melanogaster*.

6.3 PRPK posee un rol independiente de KEOPS en la regulación del citoesqueleto de actina.

A pesar de que observamos una interacción física entre PRPK y Kae1, concluimos que el fenotipo observado en hemocitos PRPK IR no está vinculado directamente a la actividad del complejo KEOPS, ya que el fenotipo del mutante *kae1* difiere del fenotipo PRPK IR. No creemos que ésta diferencia se deba a una exacerbación del fenotipo, ya que al generar ganancias de función de Kae1 en un *background* mutante para *kae1*, no observamos un fenotipo similar al PRPK IR. Es posible que el fenotipo observado en los hemocitos mutantes para *kae1*, sea producto de una alteración generalizada en la síntesis de proteínas, debido a la importancia de Kae1 en la actividad del complejo KEOPS (Rojas-

Benítez D.,2015) o corresponda a un efecto no autónomo celular, ya que existe una ausencia de Kae1 en el animal completo.

6.4 PRPK y su rol estructural en la dinámica del citoesqueleto.

Antes de este trabajo se sabía que PRPK posee actividad kinasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Facchin y cols., 2003). Sin embargo, su actividad catalítica no parece tener relevancia en el fenotipo causado por la ausencia de este gen en levaduras, ya que la versión “kinasa muerta” de Bud32 fue capaz de revertir el fenotipo, sugiriendo que PRPK posee un rol estructural (Lopreiato y cols., 2004). En *Drosophila* también se ha comprobado que el fenotipo provocado en el ala de la mosca por la pérdida de función de PRPK es revertido por las versiones: fosfomimética (T221D) y la mutante para el sitio de fosforilación por Akt (T221A), es rescatado parcialmente por la versión mutante del sitio catalítico (D132A) y no es rescatada por la versión que carece de los 9 últimos aminoácidos del extremo C terminal (ΔC) (Ibar y cols., 2013).

En relación al fenotipo observado en hemocitos sucedió algo similar, ya que tanto el mutante para el sitio de fosforilación por Akt, como el fosfomimético, fueron capaces de revertir el fenotipo PRPK IR. Al utilizar un mutante del sitio catalítico distinto, en el cual se reemplazó un residuo de ácido aspártico por una arginina (D132R) en el sitio catalítico, también se observó rescate del fenotipo PRPK IR. La versión PRPK ΔC fue la única que no rescató

el fenotipo, lo que apoya la idea de que PRPK cumple una función estructural en la formación de lamelipodios vía Arp2/3.

Si bien el extremo C-terminal se ha asociado a su capacidad para interactuar con Kae1 (Mao y cols., 2008), no podemos descartar que este sitio sea importante para interactuar físicamente con otras proteínas como es Rab35.

6.5 PRPK y su rol en el reclutamiento de hemocitos en respuesta a daño tisular.

Los resultados obtenidos sugieren que la pérdida de función de PRPK no solo altera la dinámica del citoesqueleto de actina, sino que también altera los mecanismos de adhesión celular, ya que se ha descrito que al menos la población sésil de hemocitos no migra en respuesta a daño tisular, mientras que la población libre en la hemolinfa es reclutada en el sitio de daño y su tránsito a través de la hemolinfa es dependiente de los movimientos peristálticos de la larva y contracción de la vena dorsal. Nosotros observamos que en condición PRPK IR el número de hemocitos reclutados al sitio de daño es significativamente menor que en la condición control. Otros resultados obtenidos en este laboratorio muestran la menor sobrevivencia de larvas PRPK IR dañadas con un filamento de tungsteno, previamente sumergido en bacterias (Resultados no publicados), y un menor número de bacterias fagocitadas por los hemocitos PRPK IR en cultivos primarios (Cataldo V, Tesis de Pregrado,

2013). Estos resultados sugieren que la pérdida de función de PRPK disminuye la sobrevivencia de larvas infectadas por bacterias, ya sea por la incapacidad de los plasmotocitos de adherirse al sitio de herida, como por su reducida capacidad de fagocitar bacterias.

Sin embargo, otros estudios sugieren que existe una acción sumamente coordinada entre los distintos compartimentos celulares donde, tanto hemocitos sésiles como circulantes participan en la respuesta ante patógenos (André y cols., 2010).

En la región posterior de la GL de larvas en estadio 3 se encuentra un pequeño cúmulo de células llamado centro de señalización posterior (PSC). El PSC emite largas proyecciones hacia la zona medular, llamadas citonemas, las cuales se encargan de mantener a los precursores en un estado pluripotente (mediante Hedgehog y Serrate). Los citonemas son estructuras tipo filopodio que se encargan de distribuir proteínas señalizadoras como Hedgehog (Hh) o Decapentaplegic (Dpp) entre células colindantes (Gradilla y Guerrero, 2013; Kornberg y Roy, 2014). En el ensayo de daño realizado en larva, pudimos observar que el *driver* Hml-Gal4 no solo marca las poblaciones sésiles y libres de hemocitos, sino que también se expresa en la GL. Esto nos sugiere que la expresión del ARN interferente contra PRPK también se expresa en la GL y altera la formación de citonemas en el PSC y por lo tanto afecta la diferenciación hacia células cristal y lamelocitos. Sería interesante evaluar si

existe una alteración morfológica en el PSC de GL en condiciones de pérdida de PRPK. Sería interesante estudiar si la pérdida de función de PRPK altera de la segunda ola hematopoyética, lo cual reduciría el número de células especialistas como lamelocitos y células cristal. En este estudio solo abordamos el análisis de plasmátocitos y en contextos de daño tisular lamelocitos y células cristal cobran importancia.

6.6 PRPK y su rol en la migración de hemocitos *in-vivo*.

Los resultados obtenidos en embrión indican que los hemocitos PRPK IR migran según el patrón descrito por el grupo de Jacinto (Wood y Jacinto, 2007). Sin embargo, cuando se registran videos de hemocitos a partir del momento en que se localizan a lo largo del CNV (estadio 13), se aprecia un retraso en la migración lateral para la condición PRPK IR. Es decir, los hemocitos completan su patrón de migración pasado el estadio 15.

En el caso de los ensayos de migración en pupa, se observó que los hemocitos migran menos y más lento en condiciones PRPK IR comparado con los hemocitos control. Si comparamos este resultado con los obtenidos en embrión, podemos sugerir que en el contexto embrionario, en presencia de ligandos que comandan el proceso de migración, la pérdida de función de PRPK no sería gravitante para definir la dirección de la migración. Sin embargo, en un contexto de migración aleatoria, sin presencia de quimioattractantes, PRPK parece jugar un rol preponderante.

7. CONCLUSIONES

- 1. PRPK es necesario para la dinámica normal del citoesqueleto de actina de hemocitos *ex-vivo*.**
- 2. La pérdida de función de PRPK disminuye la velocidad pero no la dirección de la migración de hemocitos *in-vivo*.**
- 3. PRPK forma parte del complejo KEOPS al interactuar con Kae1.**
- 4. PRPK cumple un rol estructural en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y es independiente del complejo KEOPS.**
- 5. PRPK interactúa con Rab35, independiente de su estado GTP/GDP.**

8. BIBLIOGRAFÍA

Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Miyoshi, A., Kito, K., Ueda, N., et al. Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47): 44003–11, 2001.

Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Kamei, Y., Fujibuchi, T., Matsumoto, S., et al. A Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 377–385, 2006.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. 2002.

Allaire, P., Seyed, M., Chaineau, M., Seyed, E., Konefal, S., Fotouhi, M., et al. Interplay between Rab35 and Arf6 controls cargo recycling to coordinate cell adhesion and migration. *Journal of Cell Science*, 126: 722-31, 2013.

Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J., & Jones, G. E. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *The Journal of cell biology*, 141(5), 1147-1157, 1998.

Babcock, D.T.; Brock, A.R., Fish, G.S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M.A., et al. Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *PNAS*, 105 (29): 10017-22, 2008.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1), 235-263, 2014.

Brand, a H., & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2): 401–15, 1993.

Cataldo V., Tesis de Pregrado para optar al título de Bioquímico. “P-53 related protein kinase (PRPK) es necesaria para la formación de lamelipodios y la correcta mantención de la forma celular en hemocitos de *Drosophila*”. Universidad Católica de Valparaíso, 2012.

Comber, K., Huelsmann, S., Evans, I., Besaid J. Sánchez-Sánchez, B.J., Chalmers, A., et al. A dual role for the bPS integrin myospheroid in mediating *Drosophila* embryonic macrophage migration. *Journal of Cell Science*, 126: 3475-84, 2013.

Cramer, L. P., Siebert, M., & Mitchison, T. J. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *The Journal of cell biology*, 136(6): 1287–305, 1997.

Daugeron, M.-C., Lenstra, T. L., Frizzarin, M., El Yacoubi, B., Liu, X., Baudin-Baillieu, A., Lijnzaad, P., et al. Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t6A modification of tRNAs. *Nucleic acids research*, 39(14): 6148–60, 2011.

Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., et al. A Genome-Wide Screen Identifies the Evolutionarily Conserved KEOPS Complex as a Telomere Regulator. *Cell*, 124(6): 1155–1168, 2006.

Evans, I.R., Hu, N., Skaer, H., & Wood, W. Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in *Drosophila* embryos, 137(10): 1625-33, 2010.

Evans, I.R., Ghai, P.A., Urbančič, V., Tan, K.L., & Wood, W. SCAR/WAVE-mediated processing of engulfed apoptotic corpses is essential for effective macrophage migration in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 20 (5): 709-20, 2013.

Fauvarque, M.O., & Williams, M.J. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and Adhesion. *Journal of Cell Science*, 124: 1373-82, 2011.

Facchin, S., Ruzzene, M., Marin, O., Sartori, G., Montenarh, M., Carignani, G., Pinna, L. A., et al. Functional homology between yeast piD261 / Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261 / Bud32 deficiency. *FEBS Letters*, 549: 63–66, 2003.

Gilbert, S. *Developmental Biology*. Novena edición. Sinauer Associates. Cap. 15: 551-555, 2010.

Gradilla, A.C & Guerrero, I. Cytoneme-mediated cell-to-cell signaling during development. *Cell Tissue Res*, 352: 59-66, 2013.

Greenspan, R.J. *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004.

Guruharsha, K. G., Rual, J.-F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., et al. A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 147(3): 690–703, 2011.

Honti, V., Csordás, G., Kurucz, E., Márkus, R., Andó, I. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1):47-56, 2013.

Ibar, C., Cataldo, V. F., Vásquez-Doorman, C., Olgúin, P., & Glavic, A. *Drosophila* p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. *Development*, 140(6): 1282–91, 2013.

Kadandale, P., Stender, J. D., Glass, C. K., & Kiger, A. A. Conserved role for autophagy in Rho1-mediated cortical remodeling and blood cell recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10502-10507, 2010.

Kisseleva-romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Rousselle, J.C., Ilan, L., Hofmann, K., et al. Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO Journal*, 25: 3576-3585, 2006.

Kornberg, T.B., & Roy, S. Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development*, 141: 729-36, 2014.

Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., & Echard, A. Report Rab35 Regulates an Endocytic Recycling Pathway Essential for the Terminal Steps of Cytokinesis. *Current Biology*, 16: 1719–1725, 2006.

Krause, M. & Gautreau, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature Reviews*, 15: 577-90, 2014.

Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., & Crozatier, M. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature*, 446 (7133):325-8, 2007.

Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., & Vincent, A. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental Biology*, 346(2):310-9, 2010.

Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N., & Adams, J. C. Fascins, and their roles in cell structure and function. *BioEssays: News and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(4): 350–61, 2002.

Lemaitre, B., & Hoffmann, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697–743, 2007.

Lopreiato, R., Facchin, S., Sartori, G., Arrigoni, G., Casonato, S., Ruzzene, M., Pinna, L. A., et al. Analysis of the interaction between piD261 / Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *Biochemical Journal*, 377: 395–405, 2004.

Mao, D. Y. L., Neculai, D., Downey, M., Orlicky, S., Haffani, Y. Z., Ceccarelli, D. F., Ho, J. S. L., et al. Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Molecular Cell*, 32(2): 259–75, 2008.

Mattila, P. K., & Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular Cell biology*, 9(6): 446–54, 2008.

Moreira, C., Regan, J., Zaidman-Rémy, A., Jacinto, A., & Prag, S. *Drosophila* hemocyte migration: An in vivo assay for directional cell migration. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 769 (17): 249-60, 2011.

Narita, R., Yamashita, H., Goto, A., Imai, H., Ichihara, S., Mori, H., & Kitagawa, Y. Syndecan-dependent binding of *Drosophila* hemocytes to laminin alpha3/5 chain LG4-5 modules: potential role in sessile hemocyte islets formation. *FEBS Letters*, 576 (1-2):127-32, 2004.

Parsons, B., Foley, E. The *Drosophila* platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor-receptor related (Pvr) protein ligands Pvf2 and Pvf3 control hemocyte viability and invasive migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (28):20173-83, 2013.

Petrie, R. J., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 10(8): 538–49, 2009.

Perrochia, L., Guetta, D., Hecker, A., Forterre, P., & Basta, T. Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t6A tRNA modification. *Nucleic Acids Research*, 41(20): 9484-99, 2013.

Ridley, A. J. Life at the leading edge. *Cell*, 145(7): 1012–22, 2011.

Riedl, J., Crevenna, A., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Badke, F., et al. LifeAct: A versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods*, 5(7): 605, 2008.

Rojas-Benitez, D., Thiaville, P. C., de Crecy-Lagard, V., & Glavic, A. The Levels of a Universally Conserved tRNA Modification Regulate Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M115, 2015.

Shi, A., & Grant, B. D. Interactions between Rab and Arf GTPases regulate endosomal phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate during endocytic recycling. *Small GTPases*, 4(2), 106-109, 2013.

Shim, J., Lee, S., Lee, M. S., Yoon, J., Kweon, H., & Kim, Y. Rab35 Mediates Transport of Cdc42 and Rac1 to the Plasma Membrane during Phagocytosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6): 1421–1433, 2010.

Srinivasan, M., Mehta, P., Yu, Y., Prugar, E., Koonin, E. V, Karzai, a W., & Sternglanz, R. The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *The EMBO journal*, 30(5): 873–81, 2011.

Stocchetto, S., Marin, O., Carignani, G., & Pinna, L. a. Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Letters*, 414(1): 171–175, 1997.

Stramer, B., Wood, W., Galko, M.J., , Jacinto, A., Parkhurst, S.M., & Martin, P. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 168 (4):567-73, 2005.

Terriente-Felix, A., Li, J., Collins, S., Mulligan, A., Reekie, I., Bernard, F., et al. Notch cooperates with Lozenge/RunX to lock haemocytes into differentiation programme. *Development*, 140 (4): 926-37, 2013.

Vasquez-Doorman, C. Tesis de pregrado para optar al título de Bioquímico. *Drosophila* p53-related protein kinase (Dprpk) esta asociada a endomembranas y es requerida para la endocitosis y el crecimiento celular dependiente de la ruta PI3K/TOR. Universidad de Chile, 2010.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (11): 778–790, 2009.

Wang, L., Ilias Kounatidis, I.,& Ligoxygakis, P. *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3 (113): 1-17, 2014.

Wheeler, A.P., Wells, C.M., Smith, S.D., Vega, F.M., Henderson, R.B., Tybulewicz, V.L., Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *Journal of Cell Science*, 119 (13):2749-57, 2006.

Wittmann, T., Bokoch, G. M., & Waterman-Storer, C. M. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *The Journal of cell biology*, 161(5), 845-851, 2003.

Wood, W., Faria, C., & Jacinto, A. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell Biology*, 173 (3): 405-16, 2006.

Wood, W., & Jacinto, A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nature Reviews*, 8 (7): 542-51, 2007.

Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M. and Burridge, K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *Journal of Cell Biology*, 154 (1): 147-60, 2001.

Yacoubi, B.E., Hatin, I., Deutsch, C., Kahveci, T., Rousset, J.P., Iwata-Reuyl, D., Murzin, A. G., et al. A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *The EMBO Journal*, 30(5): 882–93, 2011.

Yang, C., & Svitkina, T. Filopodia initiation: Focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adhesion & Migration*, 5 (5): 402-8, 2011.

Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogoy, M., & Scott, M.P. Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science*, 325(5945): 1250-4, 2009.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

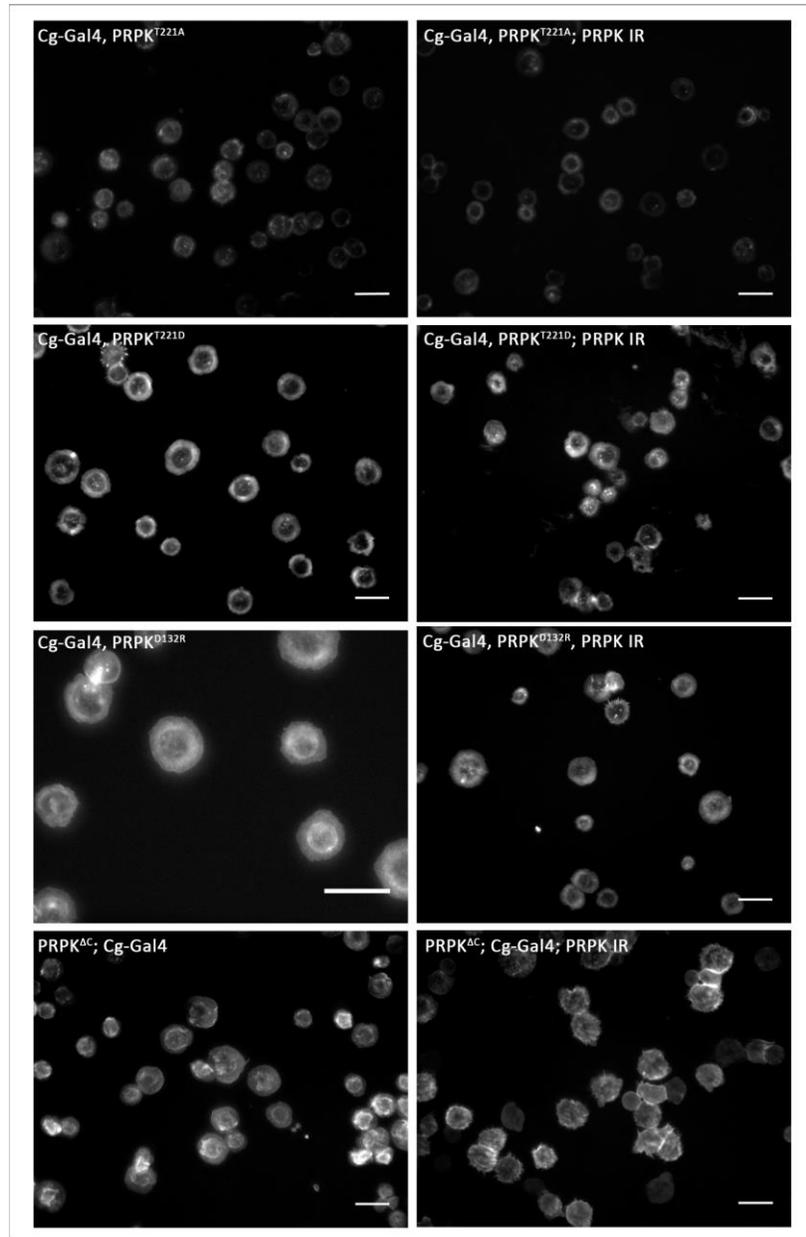


Figura Suplementaria 1. Imágenes de campo completo de cultivos primarios de hemocitos que expresan las distintas versiones de PRPK (fosfomimética (T221D), no fosforilable por Akt (T221A), dominante negativo (D132R) y carente del extremo C-terminal (Δ C) y la co-expresión de estas junto a PRPK IR. Tinción con Faloidina-TRITC 1:200. Barra 20 μ m.

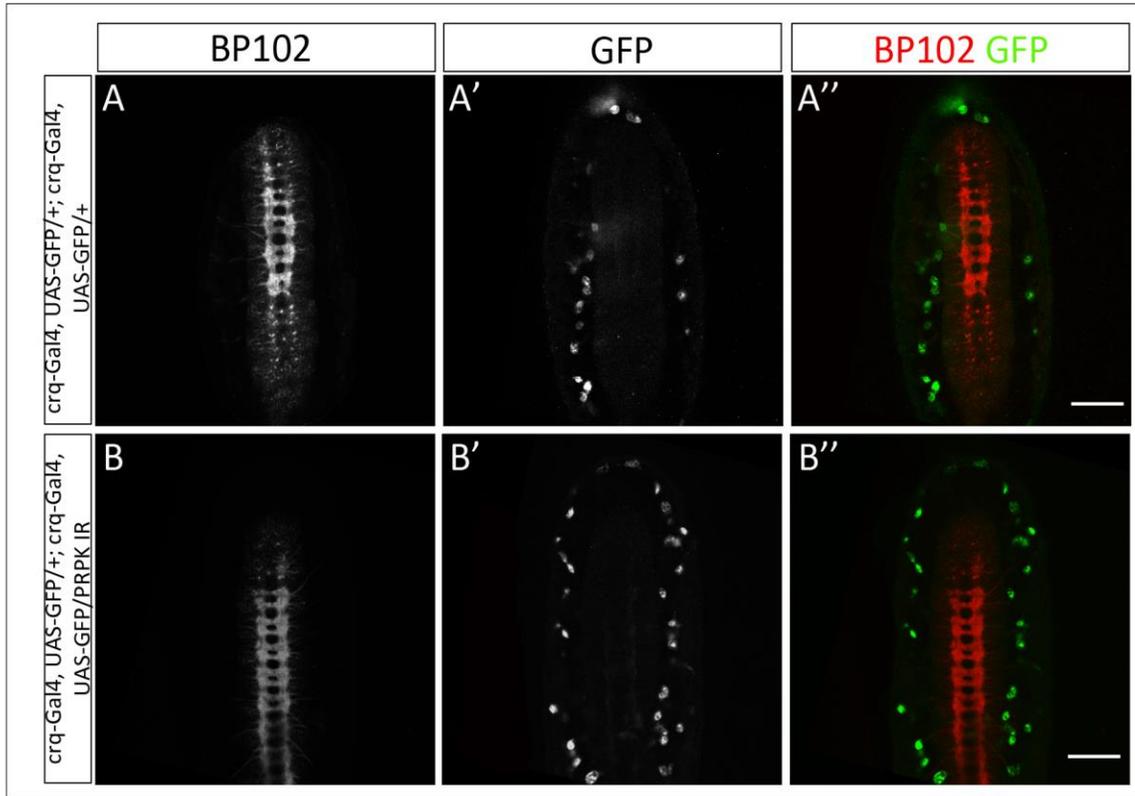


Figura Suplementaria 2. Migración de hemocitos a lo largo del CNV. Imágenes ventrales de Inmunofluorescencia de embriones de 15 ± 2 horas post fertilización, donde se aprecia la distribución de hemocitos al término de su migración a lo largo del CNV. En A y B se observa el patrón característico de los axones presentes en el CNV. En A' y B' se puede apreciar que los hemocitos logran su patrón de distribución, a lo largo de todo el embrión. En A'' y B'' se observan ambos canales. α GFP 1:200 (verde) y BP102 1:100 (rojo). Barra: $250 \mu\text{m}$.