

## INTRODUCCIÓN

### ***1. La apoptosis.***

#### *1.1 Apoptosis, una forma de muerte celular.*

Todas las células poseen en sí mismas, la habilidad de auto destruirse, de programar su muerte; capacidad que pondrán en práctica dependiendo de las condiciones externas a que estén sometidas. Esta forma de altruismo celular se denomina apoptosis y está caracterizada por una serie de cambios morfológicos que en última instancia, llevarán a la fagocitosis de los restos. Son rasgos característicos el encogimiento y separación de la célula moribunda de sus vecinas, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y del citoplasma (con preservación de la integridad de las organelas) y la fragmentación en cuerpos discretos. Un conjunto de características completamente distintas son observadas bajo condiciones de injuria o necrosis: hinchazón generalizada, pérdida de integridad de las membranas, ruptura de los lisosomas y desintegración final de las organelas; con el consiguiente daño en el tejido circundante (Guimaraes Assuncao y Linden, 2004). Estas diferencias nos inducen a pensar en la apoptosis como un proceso activo, altamente regulado y tan necesario como la diferenciación o cualquier otra fase biogénica. Por eso comúnmente se la describe como un mecanismo de “muerte programada”.

Los seres vivos deben ser capaces de regular la proliferación y la muerte celular para mantener las condiciones fisiológicas y desarrollarse satisfactoriamente. Así, las células deben poder defenderse frente a una gran variedad de estímulos estresantes como hipoxia, privación de nutrientes, shock térmico, radiación ionizante, activación oncogénica entre otros. En estas situaciones, la apoptosis es un mecanismo eficaz (Wyllie, 2010).

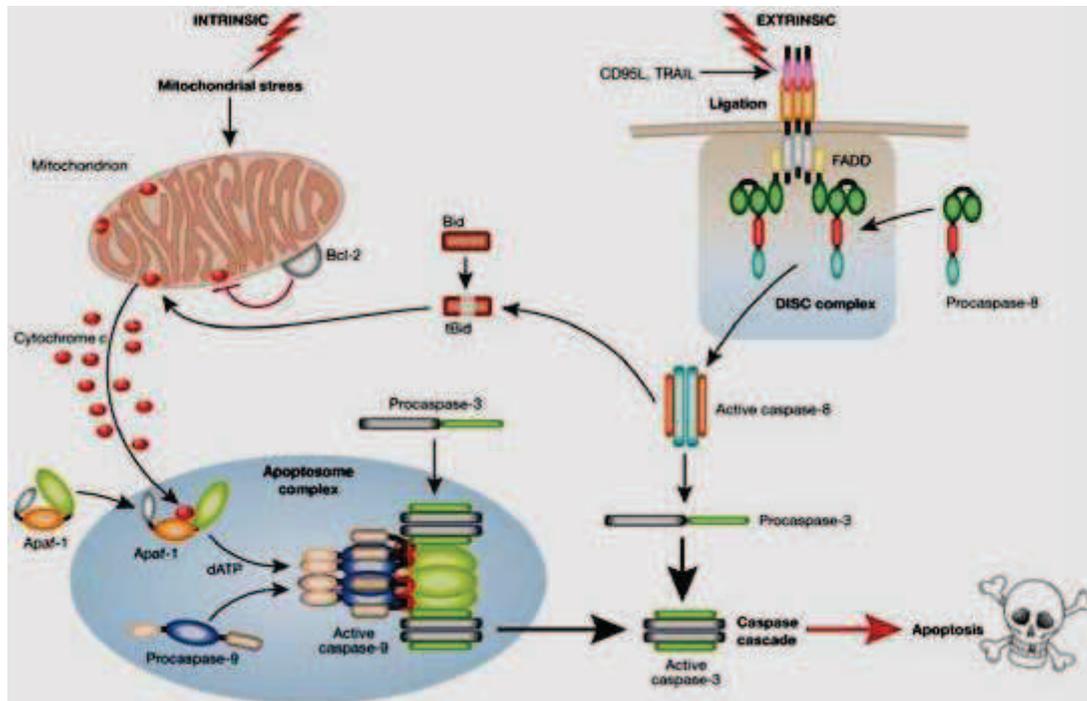
Las investigaciones en el área comenzaron hace más de 40 años, a partir de estudios llevados a cabo en modelos biológicos tan diversos como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* o en mamíferos. Hoy en día se sabe que la apoptosis implica una serie de eventos altamente conservados. A continuación haremos una breve introducción a estos y otros aspectos del proceso apoptótico.

### *1.2 Vías moleculares en mamíferos.*

A nivel molecular, el inicio de la apoptosis requiere de la maduración y activación de caspasas, proteasas específicas de aspartato dependientes de cisteína, que se sintetizan como proenzimas. Las caspasas “iniciadoras” se auto activan y clivan a las caspasas “efectoras”. Estas últimas degradan los distintos componentes celulares como citoesqueleto, ADN, ARNs, factores de transcripción y traducción, quinasas y fosfatasa, concretando así la muerte celular (Alenzi y col, 2010).

Las vías de señalización que desencadenan la respuesta apoptótica se denominan extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca se caracteriza por la unión de un ligando (por ejemplo FasL) a un receptor de muerte celular (FAS, CED 95 y Apo1). La unión receptor/ligando induce un cambio conformacional en la zona citoplasmática del receptor, que se acopla entonces a adaptadores proteicos. Éstos últimos reclutan a las procaspasas iniciadoras específicas de la vía extrínseca y propician su autoactivación. Uno de los blancos de las primeras caspasas funcionales es la proteína BID (BH3-only), la cual contribuye a la formación del apoptosoma (Kaufmann y col, 2011). El apoptosoma se constituye como una plataforma para la autoactivación de las procaspasas propias de la vía intrínseca. Está compuesto por una proteína adaptadora denominada APAF1 en mamíferos. Su ensamblaje depende de la liberación de citocromo c desde el espacio intermembrana de

la mitocondria, a través de poros formados por proteínas BAX /BAK (Ola y col, 2011). Un esquema de ambas vías se puede observar en la figura 1.



**Figura 1. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.** Se muestran los intermediarios más comunes y efectores correspondientes. Ver detalles en el texto. Extraído de MacFarlane y Williams, 2004.

Como reguladores de estas vías, participan los miembros de la superfamilia BCL2, que se agrupan en tres subfamilias: a) las proteínas antiapoptóticas BCL2-like, b) las proapoptóticas BAX-like, y c) las proapoptóticas BH3-only (BID). En condiciones fisiológicas, la función de BAX y BAK está inhibida por los miembros antiapoptóticos BCL. En respuesta a señales específicas, la proteína BID es capaz de conectar ambas vías (Youle y Strasser, 2008).

### 1.3 Conservación evolutiva de las vías apoptóticas.

En otros organismos muchas instancias de estas vías son llevadas a cabo por intermediarios homólogos con funciones conservadas.

Estudios en *Caenorhabditis elegans* mostraron que tres genes, ced3, ced4 y ced9, forman el corazón de la maquinaria apoptótica (Lettre y Hengartner, 2006). El clonado del gen ced3 condujo a identificarlo como una caspasa (Yuan y col, 1993). Similarmente, se halló a la proteína ced4 como la plataforma responsable de modular su actividad (Seshagiri y Miller, 1997). El tercer gen descubierto fue ced9, con funciones similares a las de los miembros de la familia bcl-2 (Hengartner y Horvitz, 1994).

En *Drosophila melanogaster* también encontramos homólogos de la mayoría de las proteínas antes mencionadas: caspasas, Apaf1, citocromo c, y reguladores cuyas funciones son similares a las de mamíferos y nematodos (Conradt, 2009). Los principales reguladores negativos de la vía son los miembros de la familia IAP, Diap1 y Diap2, cuya función es ubiquitinar procaspasas para llevarlas a degradación mediada por el proteasoma. Por el contrario, en respuesta a estímulos de muerte, se activan los genes *Reaper*, *Hid* y *Grim* (RHG), y sus productos proteicos degradan a las IAPs. Dark es un activador de caspasas iniciadoras (Figura. 2).

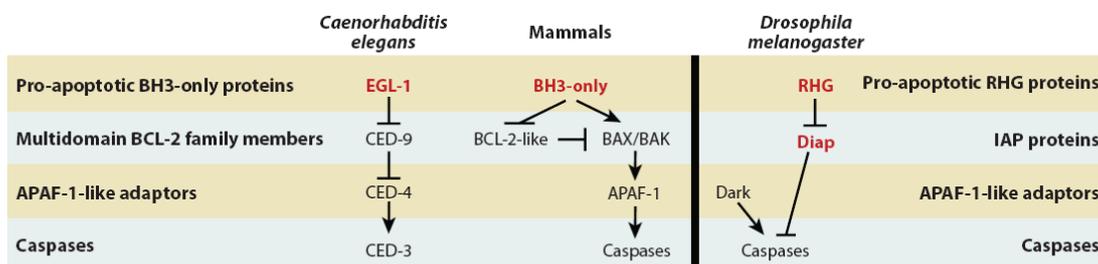


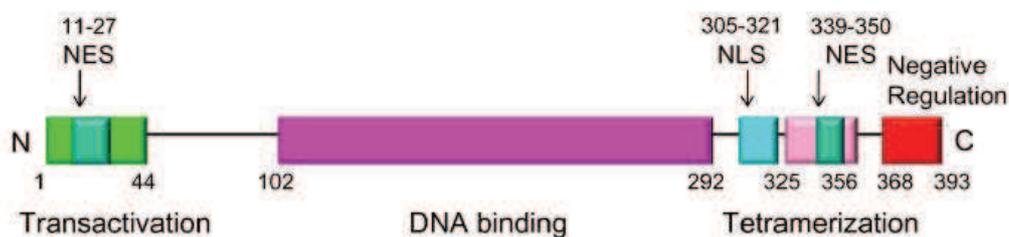
Figura 2. Vías apoptóticas en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y mamíferos. Lo que se muestra es un esquema simplificado. En rojo se ven los reguladores principales de las vías. Extraído de Conradt, 2009.

## 2. El factor de transcripción p53.

Los mecanismos apoptóticos descritos cuentan con un intermediario importante: la proteína supresora de tumores p53. Se trata de un factor de transcripción, presente mayormente en el núcleo de células eucariotas, pero con una fracción citoplasmática que participa en procesos vinculados a la mitocondria (Kruse y Gu, 2010). El grupo de trabajo ha focalizado su estudio en esta proteína y la presente tesina se encuadra dentro de ese proyecto mayor. A continuación describiremos sus características.

### 2.1 Estructura.

La proteína p53 de mamíferos contiene 393 aminoácidos y consta de tres dominios bien definidos (Joerger y Fersht, 2010). En la figura 3 podemos apreciar cómo se disponen el dominio de transactivación, el dominio de unión al ADN y el de tetramerización. Los mismos se encuentran flanqueados por regiones ligadoras. Una región rica en prolinas liga el dominio de transactivación con el de unión al ADN; una segunda región rica en prolinas une este último con el dominio de tetramerización; y una tercera región básica forma el extremo C-terminal de la proteína.



**Figura 3. Dominios funcionales de la proteína p53.** Los números arriba y abajo del esquema corresponden a la posición de los aminoácidos pertenecientes a cada dominio. Abreviaturas: NES, señal de exportación nuclear; NLS, señal de localización nuclear. Extraído de Jiang y col, 2010.

El dominio de transactivación abarca los residuos 1 al 70 (Fields y Jang, 1990). Además de activar la transcripción, este extremo regula la estabilidad de la proteína. La fosforilación sobre esta región debilita la unión de p53 con moléculas específicas que la llevan a degradación, como veremos más adelante (Waning y *col*, 2010).

A continuación, en la secuencia aminoacídica nos encontramos con la primera región ligadora (residuos 71-93), a la cual se le atribuyen dos funciones principales. Primero, zonas poliprolinas son a menudo ligandos de proteínas que poseen dominios SH3 (Yu y *col*, 1994), como ocurre con aquellas que participan del mecanismo apoptótico. Segundo, es probable que acúmulos de estos aminoácidos sean necesarios para facilitar el plegado del factor de transcripción, aunque todavía no ha sido demostrado experimentalmente (Kusano y *col*, 2001).

Probablemente el dominio más interesante de p53 sea el de unión al ADN (residuos 94-293), que es el blanco de la gran mayoría de mutaciones asociadas al cáncer (Joerger y Fersht, 2007). Esta zona puede describirse como un  $\beta$ -sandwich formado por dos láminas  $\beta$  antiparalelas que se apilan una contra la otra (Zhao y *col*, 2001).

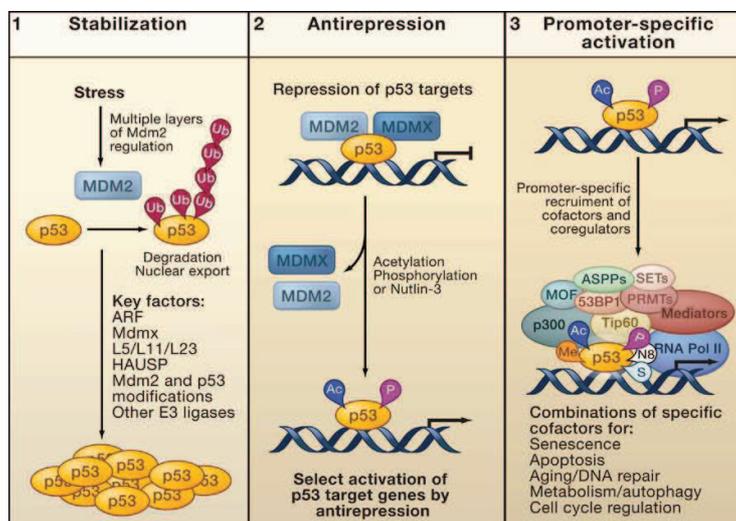
La segunda región rica en prolinas, próxima al extremo C-terminal, abarca los residuos 294 al 323. Una de las funciones de esta región sería facilitar el plegado del dominio anteriormente descrito.

El extremo C-terminal (residuos 324-355) es necesario para la oligomerización y formación de tetrámeros. Estos no sólo constituyen la versión transcripcionalmente activa sino que además ocultan la señal de exportación nuclear, para que la proteína quede retenida en el núcleo y pueda ejercer sus funciones (Jeffrey y *col*, 1995; Stommel y *col*, 1999).

Finalmente existe una región básica (residuos 356–393) que se asemeja a las colas de histona y recluta coactivadores como acetil transferasas. Estas pueden modificar tanto a p53 como a las histonas circundantes, llevando a la apertura de la cromatina, paso requerido para la eficiente transcripción génica (Mehta *y col*, 2011).

## 2.2 Activación y regulación.

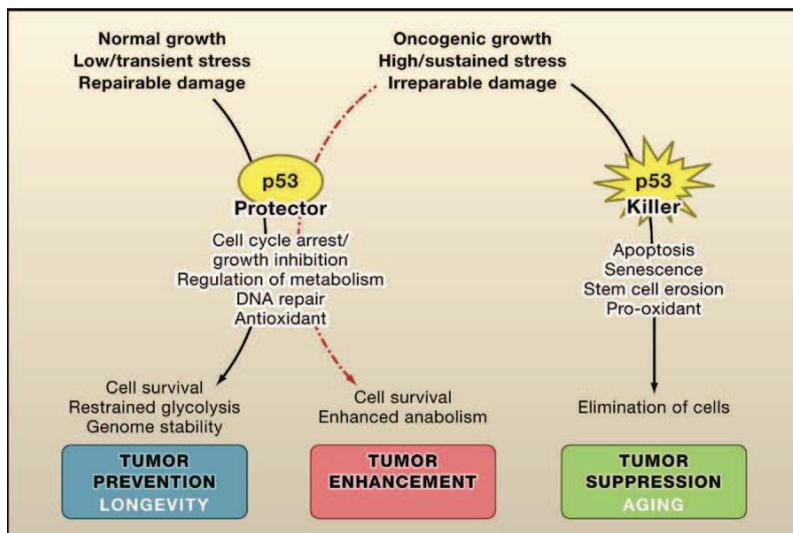
Como factor de transcripción, p53 se une a promotores de genes específicos para promover su transcripción y desencadenar distintas respuestas celulares. La activación *in vivo* de promotores específicos por p53 se caracteriza por tres eventos: 1) estabilización, 2) antirrepresión y 3) activación específica de promotor. 1) La estabilización está mediada principalmente por Mdm2, que es una proteína capaz de unirse a p53 y de impedir que p53 se dirija al promotor específico. Así, la marca o ubiquitina para que p53 sea degradada por el proteasoma. En este paso, otros factores afectan la habilidad de Mdm2 de actuar sobre p53. 2) La antirrepresión describe el escape de p53 de la represión ejercida por Mdm2 y MdmX, estando p53 ya ubicada sobre el promotor. 3) Para la activación de promotores específicos, p53 interactúa aquí con otros numerosos cofactores (Kruse y Gu, 2010) (Figura 4).



**Figura 4. Modelo actual para la activación de p53.** Abreviaturas: Ac (acetilación), P (fosforilación), Me (metilación), N8 (nedilación) y S (sumorilación). Modificado de Kruse y Gu, 2010.

### 2.3 Una proteína, varias respuestas celulares.

El factor de transcripción p53 es capaz de mediar una amplia variedad de procesos antiproliferativos. La decisión entre la vida y la muerte estaría determinada fundamentalmente por la cantidad y duración del daño, más que por la naturaleza del mismo o la identidad de la célula receptora. Niveles transitorios o bajos de estrés mantienen la capacidad de supervivencia. En estos casos p53 actúa como un protector ya que se ha visto que el factor de transcripción activa genes que contribuyen directamente a la reparación del ADN. Por otro lado, altos niveles de estrés sostenido llevan a la muerte celular o a la senescencia, que es la detención irreversible del ciclo celular (Figura 5) (Vousden y Prives, 2009).

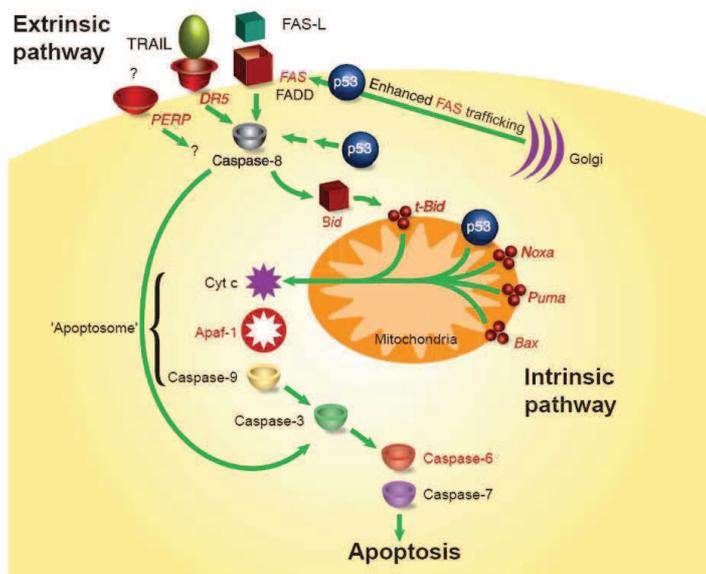


**Figura 5. Diferentes respuestas mediadas por p53.** p53 puede ayudar a promover la reparación y supervivencia de células dañadas o su remoción a través de muerte o la senescencia. El resultado final depende de varios aspectos, como el nivel de estrés o daño. Si las funciones protectoras de p53 no están apropiadamente reguladas, se puede promover el desarrollo de un tumor, como lo muestra la flecha roja de puntos. Extraído de Vousden y Prives, 2009.

La apoptosis es una de las respuestas mediadas por p53 más extensamente estudiada. A continuación, describiremos cómo participa dentro de la maquinaria apoptótica en mamíferos.

## 2.4 Apoptosis mediada por p53 en mamíferos.

Dentro del contexto de la muerte celular programada, la proteína p53 participa tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca (Figura 6). Una de sus funciones es regular la transcripción de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Algunos trabajos sugieren que la apoptosis mediada por p53 procede principalmente a través de la vía intrínseca (Soengas *y col*, 1999; Schuler *y col*, 2000). Además activa la transcripción de varios genes de la maquinaria efectora (Kannan *y col*, 2001). También estimula la expresión de la caspasa 6, usualmente considerada una caspasa efectora (Nahle *y col*, 2002). Por otra parte, su acumulación en la mitocondria (Mihara *y col*, 2003) precede a la liberación de citocromo c y al clivaje de las caspasas.



**Figura 6. Participación de p53 en la apoptosis.** El esquema representa la participación de p53 en las vías intrínseca y extrínseca. Los blancos de p53 se indican en rojo. Se muestra además la convergencia de las dos rutas a través de la proteína Bid. Extraído de Haupt *y col*, 2003.

Algunos autores sugieren que la inducción de p53 puede estar implicada en cambios en el metabolismo redox, llevando a un incremento de especies reactivas del oxígeno en las primeras etapas de la apoptosis (Hwang *y col*, 2001). El aumento de radicales libres podría interferir con la función y/o integridad de la mitocondria, contribuyendo a la muerte celular.

Por otro lado, p53 es capaz de reprimir la expresión génica (Mack y col, 1993). Una de las primeras indicaciones de que tenía otras funciones dentro del contexto de la apoptosis más allá de promover la transcripción de ciertos genes, proviene de observaciones que indican que la muerte celular mediada por el factor prosigue incluso cuando la síntesis de nuevas proteínas se encuentra inhibida (Caelles y col, 1994). Al menos en ciertas circunstancias como la hipoxia, la habilidad represora cobraría mayor importancia con respecto a las funciones activadoras (Koumenis y col, 2001).

### 2.5 Conservación evolutiva de p53.

La proteína p53 de *Drosophila melanogaster* (dmp53) es una proteína de 385 aminoácidos y consta de tres dominios bien definidos al igual que su homóloga en mamíferos (Jin y col, 2000, Sutcliffe y Brehm, 2004). La región de mayor homología con la proteína p53 de mamíferos está localizada dentro del dominio central de unión al ADN (25% identidad, 43% similitud). Lo sorprendente de dmp53 radica en su capacidad de unirse a los elementos de respuesta de los genes blanco de mamífero (Jin y col, 2000). Los otros dos dominios funcionales, no muestran mucha similitud de secuencia con su homóloga, sin embargo desempeñan actividades similares, es decir la transactivación y la oligomerización (Brodsky y col, 2000).

Al igual que su contraparte, dmp53 puede inducir la apoptosis en respuesta a injuria celular. Al contrario, no puede promover la detención del ciclo celular (Sutcliffe y Brehm, 2004). A pesar de estas diferencias ambas proteínas promueven la reparación del ADN. La función general de p53 de detener el ciclo para reparar los daños podría haber evolucionado más recientemente.

Con respecto a los mecanismos de regulación, mucho se sabe acerca de la p53 en los mamíferos. Sin embargo, poco se conoce con respecto a las modificaciones que puede sufrir p53, y como ellas regulan su función.

Recientemente, se ha visto que es fosforilada bajo situaciones de estrés, paso requerido para la transactivación de los genes involucrados en la apoptosis y reparación del ADN (Brodsky *y col*, 2004). El sitio fosforilado todavía no ha sido identificado, y tampoco se sabe si sufre acetilaciones o sumorilaciones como modificaciones postraduccionales en algún punto de la cadena aminoacídica.

En el genoma de *Drosophila* no se han identificado homólogos de Mdm2, uno de sus principales reguladores en mamíferos (Fortini *y col*, 2000; Bernards y Hariharan, 2001). Además, el sitio de unión para esta proteína no está conservado en p53, lo cual nos indica que en este sistema biológico, las funciones de degradación estarían siendo llevadas a cabo por otros componentes.

Finalmente, es posible que el sistema de cofactores para la transactivación también esté conservado en la mosca de la fruta.

### **3. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio.**

#### *3.1 Ciclo de vida.*

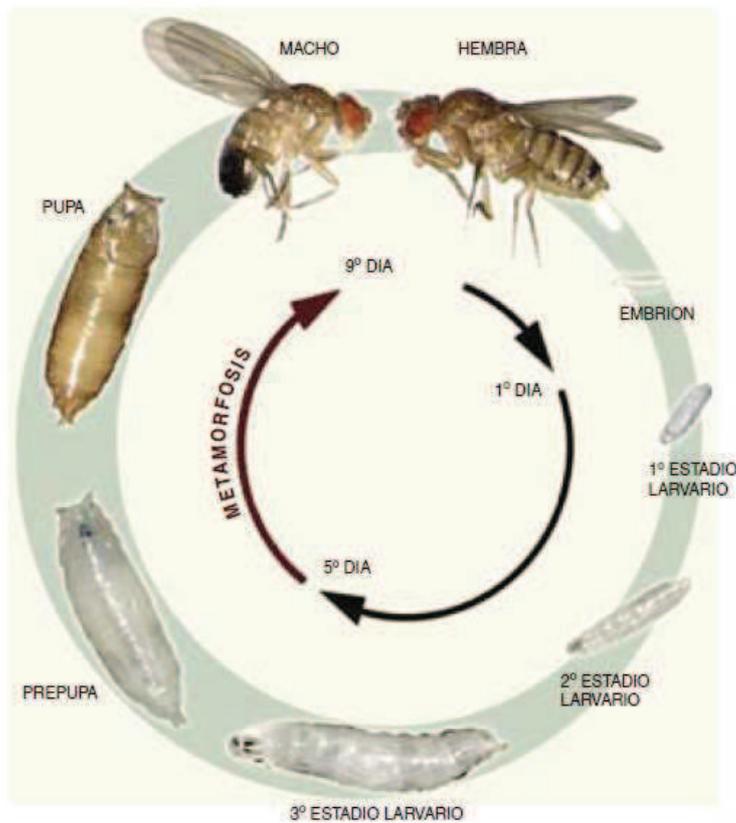
*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, perteneciente al orden *Diptera* y a la familia *Drosophilidae*. De hábitat cosmopolita, se caracteriza por consumir alimentos con alto contenido de ácido acético, como frutas en descomposición. Su ciclo de vida es relativamente corto (alrededor de 10 días a 25°C y 60 % humedad) e incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa e imago o adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura

de cultivo. Las hembras adultas pueden poner huevos durante toda su vida, alcanzando un promedio de 50 a 75 diarios los primeros días.

Es un organismo de metamorfosis completa. El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo, el cual es depositado sobre la superficie del alimento. Es ovoide y posee dos pequeñas proyecciones aplanadas que emergen de un extremo y le sirven para no hundirse en el medio de cultivo. El desarrollo embrionario dura aproximadamente 1 día a 25°C.

La larva es blanca, segmentada y vermiforme. Tiene partes bucales de coloración negra (ganchos mandibulares), en una región cefálica estrecha, que penetra en el alimento comiendo vorazmente. No tiene ojos ni tampoco apéndices y deben empujarse comiendo para desplazarse por su ambiente. Respiran por tráqueas y poseen un par de espiráculos visibles (poros aéreos) en los extremos anteriores y posteriores del cuerpo. Esta fase de desarrollo se subdivide en tres estadios. El primero y segundo de ellos terminan en mudas. Cada muda implica la eliminación completa de la piel y partes orales, y es el mecanismo por medio del cual la larva crece. Inmediatamente antes de la pupación deja de comer, se arrastra hacia una superficie relativamente seca y revierten sus espiráculos anteriores. La fase larvaria dura alrededor de 3 días a 25°C.

La pupa es considerada la fase reorganizativa del ciclo de la mosca, durante la cual la mayoría de las estructuras larvarias son destruidas. Las estructuras adultas se desarrollan a partir de los tejidos larvales conocidos como discos imaginales. El insecto empupa dentro de la última piel larvaria, que en un principio es suave y blanca pero que gradualmente se endurece y adquiere un color más oscuro. Esta fase dura alrededor de 4 a 5 días a 25°C (Figura 7)



**Figura 7. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** El huevo fecundado tarda 24 horas en desarrollarse y convertirse en larva de primer estadio. El segundo y tercer estadio larval concluyen con la formación de la pupa, lugar donde ocurrirá la metamorfosis. Concluida esta etapa, el imago emerge dos a tres días después. Extraído de Pastor Pareja y col, 2006.

La mosca adulta emerge o eclosiona del pupario forzando su salida por el extremo anterior del mismo. En un principio las alas están plegadas y los individuos son de un color relativamente claro, pero a medida que pasan las horas se despliegan, el cuerpo se oscurece y obtienen una forma más definitiva. Los adultos de *Drosophila melanogaster* pueden aparearse a las 8 horas de emergidos. El esperma es almacenado en las espermatecas en los receptáculos ventrales de la hembra, y es liberado gradualmente al oviducto a medida que se producen los huevos.

El promedio de supervivencia de una mosca adulta es de 37 días a 25°C.

Un ciclo de vida de tales características, es particularmente ventajoso a la hora de trabajar con organismos vivos. Es por ello que *Drosophila melanogaster* ha sido

considerada un modelo de estudio apto para diversos tipos de investigaciones (Ramos Morales *y col*, 1994).

### 3.2 Importancia como organismo modelo.

La mosca de la fruta presenta un ciclo de vida relativamente corto y alta tasa de reproducción. Estas características contribuyen a su cultivo y crianza en el laboratorio, con muy bajo costo de mantenimiento. Además de conocerse el genoma completo, muchos de los genes de *Drosophila melanogaster* presentan una importante homología con los correspondientes de mamíferos. Por eso, la consideramos un excelente modelo de estudio para análisis *in vivo* de todo tipo y en particular para aquellos concernientes a la apoptosis. En los últimos años, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y genéticas han comenzado a ser estudiadas en *Drosophila melanogaster* por la posibilidad de establecer correlaciones con los humanos (Wolf y Rockman, 2011; Read, 2011; Whitworth, 2011).

Por otro lado, en la actualidad existen bancos de libre acceso, con gran variedad de líneas transgénicas disponibles para investigadores de todo el mundo. Por ejemplo, líneas que expresan proteínas fluorescentes, como es el caso del presente trabajo.

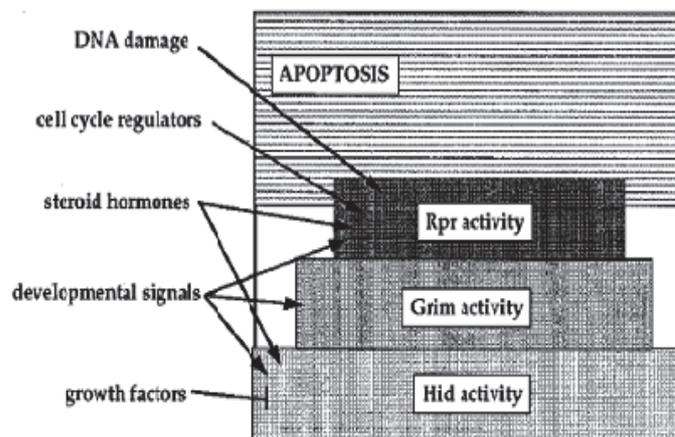
### 3.3 La apoptosis en *Drosophila melanogaster*

Los mecanismos que desencadenan el programa de muerte celular en *Drosophila melanogaster* son de nuestro particular interés. En la mosca de la fruta hay 7 caspasas caracterizadas (Kumar, 2007). Los principales reguladores son los miembros de la familia IAP, o Inhibitors of Apoptosis Proteins, como dIAP1, dIAP2 y deterin (Hay *y col*, 1995). Su función es ubiquitinar pro caspasas y llevarlas a degradación y han sido encontrados en casi todos los organismos multicelulares examinados a la fecha (Verhagen *y col*, 2001)

Por otro lado, en respuesta a estímulos apoptóticos se activa un grupo de genes que actúan de manera cooperativa: *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim* (RHG) (Steller, 2008). Dos más, *sickle* y *jafrac2*, de similares características fueron recientemente identificados (Christich y col, 2002; Tenev y col, 2002).

Los mecanismos a través de los cuales *rpr*, *grim* y *hid* activan caspasas no son completamente entendidos, sin embargo, experimentos *in vitro* sugieren que al menos parte de su actividad proapoptótica es el resultado de la habilidad para unirse e inactivar a las proteínas IAPs.

Dependiendo del tipo de señales recibidas, ya sean de desarrollo o aquellas resultantes del censado interno, la actividad de cada uno de estos genes es regulada de diferente manera. Las señales de respuesta a daño cromosómico llevan a la expresión de *reaper* y la subsecuente muerte celular (Bangs y col, 2000) (Figura 8).



**Figura 8. *Reaper*, *Grim* y *Hid* actúan de manera cooperativa para inducir la apoptosis.** Cuando la actividad combinada de las tres proteínas excede un umbral, se induce la apoptosis. Daño en el ADN, desregulación del ciclo celular, señales de desarrollo y hormonas esteroideas llevan a la expresión de *reaper*. *grim* y *hid* solo se expresan ante señales de desarrollo. Además, la actividad de *hid* está regulada negativamente por las vías de los factores de crecimiento. Extraído de Bangs y col, 2000.

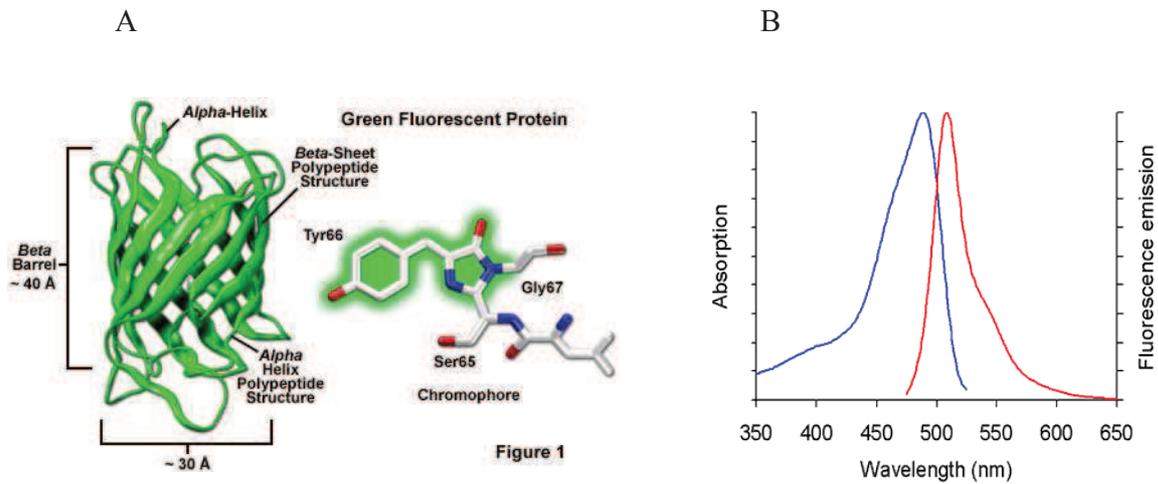
#### **4. Proteína fluorescente verde, una herramienta de la biología molecular.**

La proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) ha sido extensamente utilizada en biología celular y molecular. Ella y sus homólogas constituyen una gran familia de proteínas que contienen cromóforos en su interior, conjunto de aminoácidos responsables de la emisión lumínica (Stepanenko *y col*, 2011).

En particular, GFP presenta varias características que resultan ventajosas: posee alta estabilidad y no requiere de cofactores o sustrato alguno para su funcionamiento, es activada en gran variedad de organismos tanto eucariotas como procariotas (Chalfie *y col*, 1994), y se detecta rápida y fácilmente. Puede fusionarse al extremo de cualquier proteína, la cual, en la mayoría de los casos, retiene su función y localización subcelular (Chalfie *y col*, 1994). En general, no presenta toxicidad para la célula, es altamente resistente a muchas proteasas, detergentes, sales orgánicas, pH alcalino y altas temperaturas. Estas características la convierten en una excelente opción para monitorear prácticamente cualquier proceso intracelular.

Actualmente, el marcado de proteínas es una de las aplicaciones más populares de las proteínas fluorescentes, para visualizar la expresión, localización, translocación, interacciones y degradación de blancos determinados.

La proteína fluorescente verde es un polipéptido de simple cadena compuesto por 238 aminoácidos. El cromóforo responsable de la fluorescencia está formado autocatalíticamente por los residuos Ser<sup>65</sup>, Tyr<sup>66</sup> y Gly<sup>67</sup>, lo cual le confiere la capacidad de excitarse a 395 nm (luz azul, con un pico menor de 470 nm) y emitir luz verde, en un pico de 510 nm (Ormö *y col*, 1996) (Figura 9).



**Figura 9. A. Estructura de GFP. B. espectros de emisión y absorción.** Imágenes obtenidas de:  
A. <http://zeiss.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>  
B. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.EGFPpH7.html>

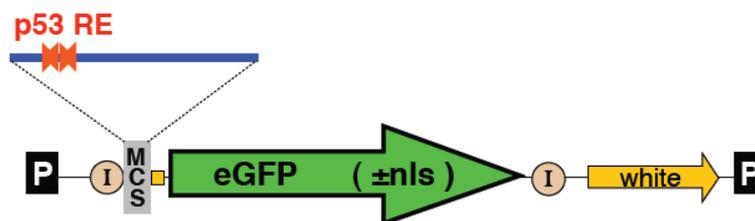
El potencial de GFP como marcador no fue reconocido hasta 1987, a partir de los trabajos de Douglas Prasher (Chalfie *y col*, 1994). Rápidamente comenzaron los estudios en este campo y sus propiedades foto físicas fueron modificadas mediante mutagénesis o hipermutación somática (Wang *y col*, 2004), lográndose variantes que emiten fluorescencia en todas las regiones del espectro visible (Chudakov *y col*, 2010).

Otras variantes más llamativas se denominan foto activables porque tienen la capacidad de pasar de un estado no-fluorescente a la forma activa en respuesta a la irradiación con luz de una determinada intensidad y longitud de onda. Las hay también foto convertibles, que se caracterizan por cambiar el color de la fluorescencia (de verde a rojo, por ejemplo); o directamente no-fluorescentes, es decir que absorben energía pero que no la emiten (Stepanenko *y col*, 2011). En suma, la gama disponible es amplia y variada.

#### 4.1. Sistema reportero y microscopía confocal.

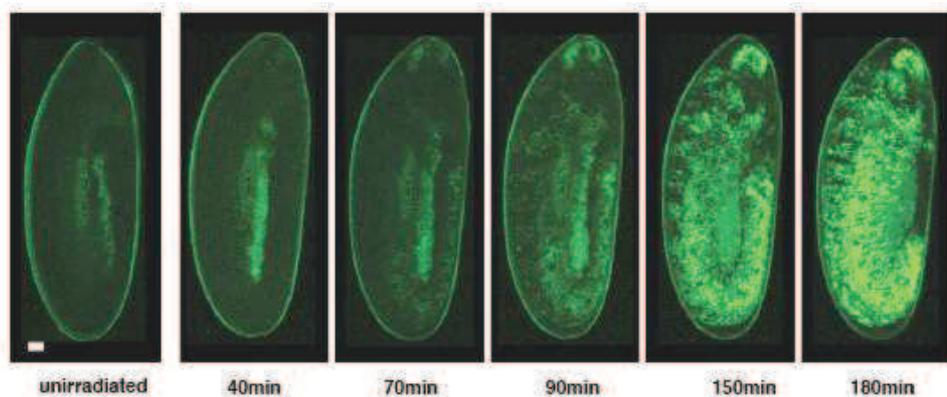
Una forma común de estudiar a p53 es a través de técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos, proteínas de unión selectiva, acopladas a marcas visibles que hacen posible su detección. Sin embargo, los anticuerpos que existen en la actualidad contra p53 en *Drosophila* son de baja eficiencia. Es por ello que con el presente trabajo se intenta optimizar un nuevo sistema para la detección del factor de transcripción, basado en las propiedades fotoquímicas de la proteína GFP y la versatilidad de la mosca de la fruta como modelo de estudio.

La apoptosis ha sido amplia y detalladamente estudiada por Abrams y otros investigadores (Abrams, 1999; Milán y col, 1997) y hoy día conocemos el patrón apoptótico de *D. melanogaster* durante el desarrollo embrionario (Abrams y col, 1993). Para la realización de estos estudios se diseñó el mencionado sistema reportero, consistente en el gen que codifica para la proteína fluorescente verde unido a una porción del promotor del gen *reaper*, que presenta sitios de unión para p53. Cuando p53 es activada por ejemplo luego de irradiación gamma, se une a dicha región y la proteína fluorescente verde se expresa en respuesta a la activación de p53 (Lu y col, 2010) (Figura 10).



**Figura 10. Esquema de la construcción que constituye el sistema reportero.** El gen que codifica para la proteína fluorescente verde se encuentra precedido por una porción de 150 pares de bases del promotor del gen *reaper*. P, secuencia del elemento P. MCS, sitio de clonado múltiple. I, aislante. White: marcador de selección basado en el color de ojo. La inserción del transgén en la mosca, se evidencia fenotípicamente por el color de ojos rojo. Nls, señal de localización nuclear. Las distancias no se muestran a escala.

En la etapa embrionaria se ha visto que GFP comienza a expresarse a los 70 minutos luego de la irradiación, y se vuelve predominante a los 180 minutos, en prácticamente todos los embriones analizados (Lu y col, 2010) (Figura 11). Sin embargo, nada se sabe de la dinámica de expresión de esta construcción genética en el estadio larval.



**Figura 11. Activación del sistema reportero en embriones de *Drosophila*.** Imágenes de microscopía confocal obtenidas de un curso en el tiempo (time lapse *in vivo*) de embriones sometidos 40 Gy de radiación ionizante. Inicialmente, los embriones irradiados lucen igual que el control no irradiado. Luego se observa un incremento de la señal de GFP con el tiempo.

Particularmente, se han elegido los discos imaginales como modelo de estudio. Estos órganos larvales son los que darán origen a las distintas estructuras del adulto, y son un sistema muy conveniente para estudiar la apoptosis causada por estímulos estresantes porque muestran poca apoptosis fisiológica, entonces toda la muerte celular observada será la ocasionada por el tratamiento de estrés.

Como alternativa a los métodos inmunohistoquímicos tradicionales, la optimización del sistema reportero antes mencionado permitirá observar indirectamente los cambios en la expresión de p53, uno de los principales efectores de la muerte celular programada.

5. Hipótesis de trabajo y objetivos.

### **HIPÓTESIS**

**La radiación ionizante promueve la apoptosis mediante la expresión temprana de la proteína p53 en discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.**

### **OBJETIVOS**

**Objetivo general:**

Observar la actividad de p53 en discos imaginales de líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster*, a través de un sistema reportero fluorescente.

**Objetivos específicos:**

- 1) Verificar la presencia y observar activación del transgén reportero en respuesta a radiación ionizante, en discos imaginales de larvas.
- 2) Evaluar la dependencia de la respuesta a la activación de p53.
- 3) Observar si la activación de p53 se produce a una menor dosis de radiación.
- 4) Estudiar si la activación del sistema persiste en el tiempo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se amplificaron en laboratorio 3 líneas de *Drosophila melanogaster*. La primera representa al grupo salvaje (wilde type: WT), la segunda contiene el transgén que codifica para el sistema reportero (STI150) y la tercera presenta ese transgén más la secuencia de p53 mutada que reemplaza al gen endógeno y codifica para una proteína no funcional (STI150-NS). Los genotipos pueden encontrarse en el anexo I. Todas las líneas fueron criadas en viales de 2.5 cm de diámetro por 7 cm de alto, con medio nutritivo específico (ver anexo II) en estufa a 25°C.

### ***1. Colecta de larvas de tercer estadio***

Para obtener individuos en el tercer estadio larval seguimos el siguiente esquema de mantenimiento:

Día 1: machos y hembras se colocan en viales con medio fresco a 25°C.

Día 2: fertilización y ovoposición

Día 3: desarrollo de huevos y larvas

Día 4: continúa el desarrollo. Retiramos los adultos de los viales.

Día 5: las larvas en estadio III comienzan a subir por las paredes del vial, listas para colectar.

### ***2. Verificación de la presencia del transgén por reacción en cadena de la polimerasa***

Para chequear la identidad de la línea de trabajo, se amplificó el fragmento de ADN correspondiente (860 pares de bases) mediante la técnica de PCR.

Realizamos la extracción de ADN total de moscas salvajes y transgénicas, basándonos en una adaptación del protocolo diseñado por Greg Gloor y colaboradores (Gloor *et al.*, 1993). Se colocó una mosca en un tubo de 0.5ml con 50µl del buffer de lisis con proteinasa K (ver anexo III) y se machacó durante 5-10 segundos, utilizando un tip de pipeta. El homogenato se incubó durante 1 hora a 37°C. La proteinasa K se inactivó por calentamiento a 95°C durante 1-2 minutos.

Para la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) agregamos 5 µl de extracto, 1 µl de cada cebador y 3 µl de agua miliQ a una premezcla (GoTaq® Green Master Mix, Promega Inc) que contiene los otros componentes de la reacción en un volumen final de 20 µl.

Los cebadores específicos, complementarios a las regiones flanqueantes del transgén, fueron diseñados de la siguiente manera:

Fw 150 pb *reaper*: CTA GAA TTC CGT CCG CTC GAC TTG TTC AAA CAT GTC  
AGG TTG GTT CTT CCA CTT TTA TTT GAG TAA TTT TCG CCC TTT TTC CAT  
AGA TTT TCA TAG AT (98 bps)

eGFP-Rev1: TGT GGC GGA TCT TGA AGT TCA CCT (24 bps)

La amplificación incluyó los siguientes pasos: 1 minuto a 94°C, 30 ciclos de los siguientes pasos: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de unión de los cebadores a 50°C, 1 minuto de extensión a 72°C, y 2 minutos de extensión final.

Para confirmar la presencia del amplicón realizamos una electroforesis en gel de agarosa 1% y teñimos con bromuro de etidio (ver anexo IV). En las calles se sembraron 5 µl de un marcador de peso molecular, 10 µl de los productos de PCR y de un control negativo carente de ADN molde.

### ***3. Irradiación y disección de discos imaginales***

Los experimentos de irradiación se llevaron a cabo utilizando un equipo Gammacell 3000 Elan, Nordion International cedido por el Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. R. Rossi, de la ciudad de La Plata. Se utilizaron dosis de 20 y 40 Gy. El Gy, como unidad, mide la dosis absorbida de radiación ionizante.

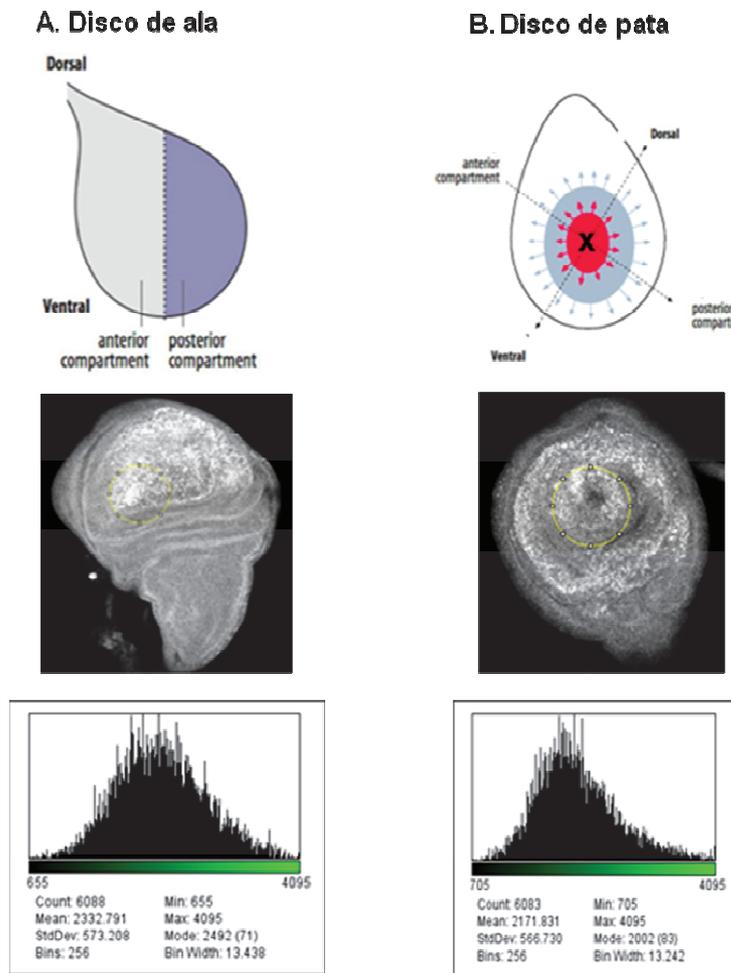
Larvas no irradiadas e irradiadas a diferentes dosis, fueron sacrificadas a las 3hs y 6hs post irradiación. Para ello, se produjo un corte en el tercio anterior correspondiente a la región cefálica en donde se encuentran los discos imaginales. Mediante eversión de las estructuras internas el conjunto de discos quedó expuesto para a disección de cada uno de ellos. El procedimiento se hizo en PBS, y los discos luego fueron fijados en paraformaldehído 4% durante 10 minutos, lavados con PBS y montados en glicerol 100% (ver anexo V). Usamos una lupa Leica MZFLIII, pinzas A. Dumont & Fils, n° 5 y agujas de disección de diseño propio.

La toma de imágenes se realizó con un microscopio confocal Meta Carl Zeiss LSM 510 usando filtros específicos para cada fluoróforo. Mantuvimos ciertos parámetros constantes para poder comparar los resultados (ver anexo VI).

### ***4. Adquisición de imágenes y análisis de los resultados***

Se observaron 50 discos de ala y 50 de pata por cada tratamiento. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ para cuantificar la fluorescencia observada. Seleccionamos un área y calculamos a partir de ella un histograma de frecuencias que mide la intensidad de señal luminosa en cada punto o pixel. De esta manera se obtuvo la media aritmética. En el caso de los discos de ala, la zona considerada

se ubicó en la zona antero-posterior ventral, y para el caso de los discos de pata, en la zona central (Figura 12).



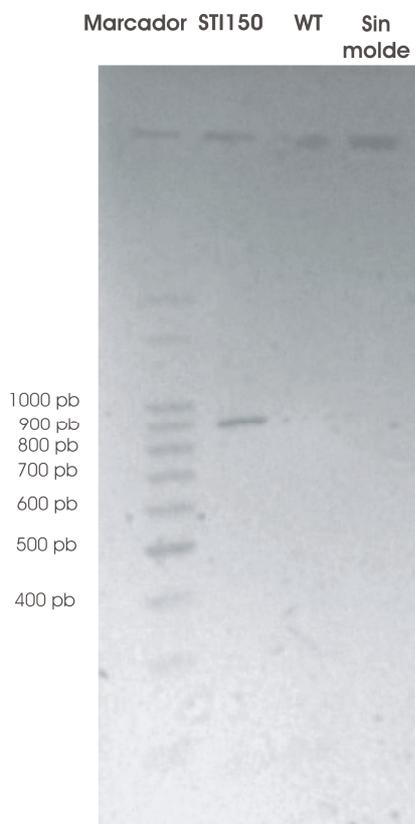
**Figura 12. Modelo para el análisis de imágenes.** Determinación de regiones en discos imaginales de ala (A) y pata (B). Áreas seleccionadas para la medición de la intensidad de fluorescencia en ambos tipos de discos. En el primero, la región se ubica en la zona antero-posterior ventral y en el segundo, en la parte central. A partir del área calculamos un histograma que representa la señal luminosa en cada pixel. Se tomó como dato numérico la media aritmética de estos gráficos.

Las mediciones de cada grupo fueron comparadas mediante test de Student, para evaluar las diferencias entre las medias de diferentes tratamientos.

## RESULTADOS

### ***1) Verificación de la presencia y de la activación del transgén reportero en respuesta a radiación ionizante, en discos imaginales de larvas.***

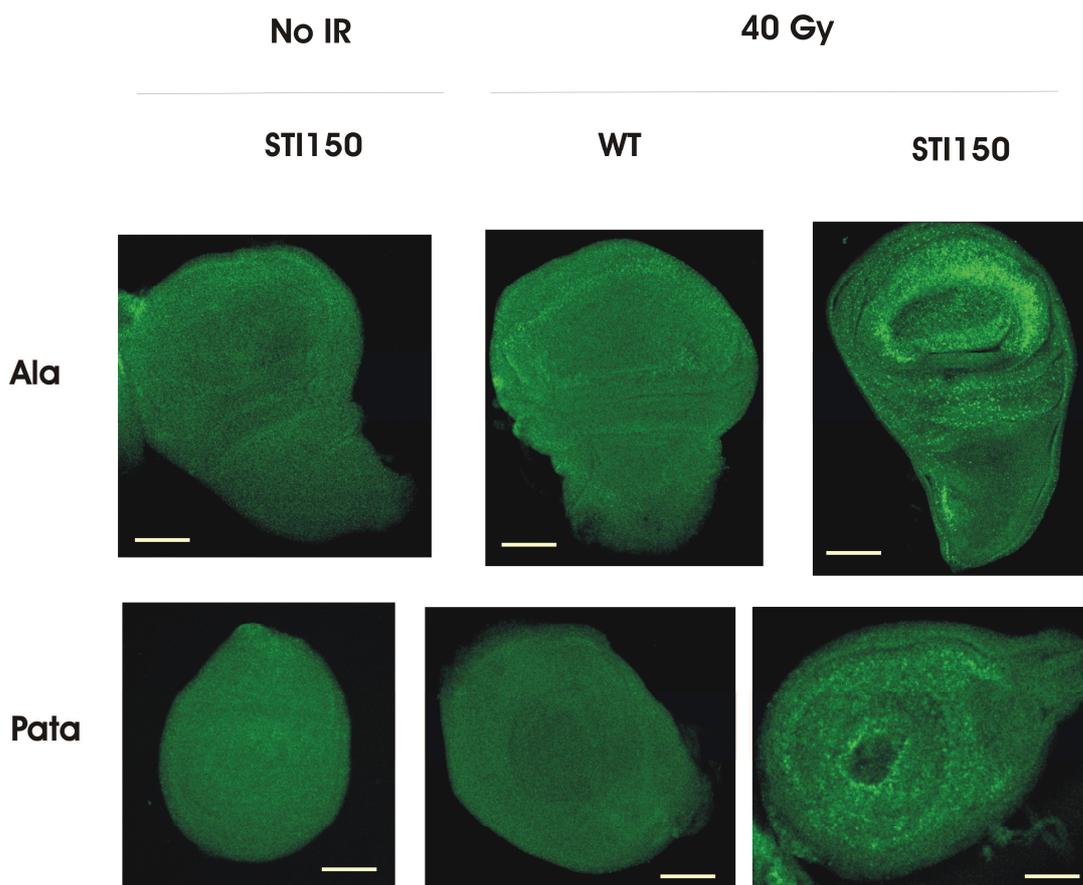
1a) La concreción de los objetivos propuestos más arriba requiere de la utilización de moscas transgénicas portadoras del sistema reportero desarrollado por el Dr. Abrams y colegas. Por eso, el primer paso fue confirmar la presencia del transgén en el genoma de *Drosophila melanogaster*, el cual posee un tamaño de alrededor de 860 pares de bases. Mediante la técnica de PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa 1%, chequeamos la identidad de la línea STI 150. Observamos parte de la secuencia del gen que codifica para GFP (Figura 13).



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1%.** De izquierda a derecha se ve el marcador de peso molecular, las líneas STI 150 y WT, respectivamente. La calle 4 es el control negativo que no tiene ADN molde. Sólo se observa una banda correspondiente al amplicón en la calle de la línea transgénica.

1b) Posteriormente, nos propusimos probar la funcionalidad del sistema reportero en discos imaginales de ala y pata de larvas del tercer estadio larval.

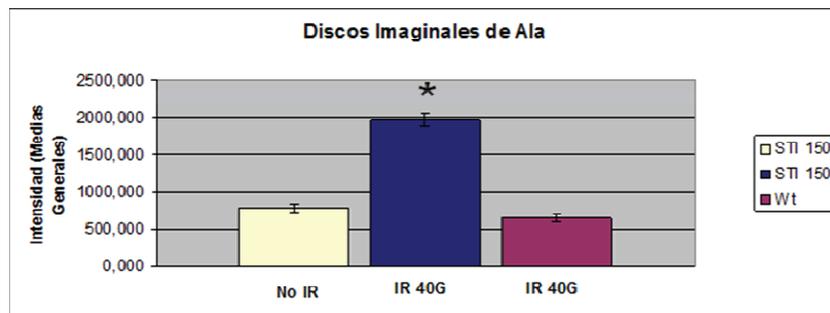
Durante la puesta a punto del sistema reportero en embriones de *Drosophila*, Wan-Jin Lu y colaboradores observaron actividad tras la exposición a 40 Gy de radiación ionizante. La expresión de fluorescencia verde se vio a los 70 minutos y fue predominante pasadas las tres horas del tratamiento (Lu y col, 2010). Basándonos en estas experiencias, decidimos trabajar en el estadio larval bajo las mismas condiciones de irradiación y observar la respuesta 3 horas más tarde. La toma de imágenes al confocal mostró lo que podemos observar en la figura 14.



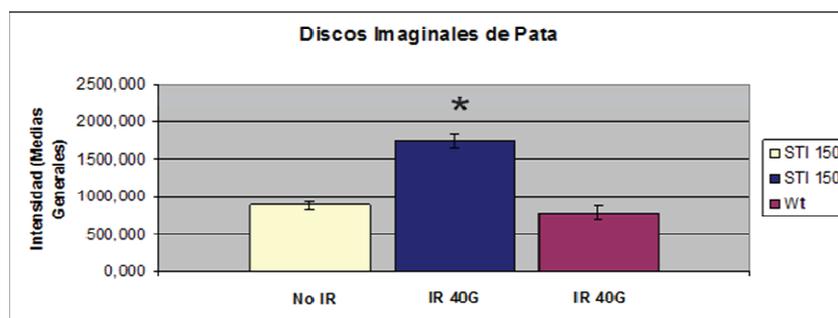
**Figura 14. Discos imaginales disecados 3 horas después del tratamiento de estrés.** Las muestras STI 150 irradiadas presentaron un patrón de expresión de color verde intenso, que claramente se distingue del fondo. En el resto de las muestras observamos una apariencia homogénea, sin cambios visibles de intensidad de color. La barra indica 50  $\mu$ .

Ante la irradiación, la línea STI150 que contiene el sistema reportero muestra un incremento de la señal emitida por GFP. Se observa un patrón irregular de fluorescencia de color verde intenso correspondiente con la acumulación de proteína fluorescente. En cambio, individuos STI 150 no irradiado así como individuos WT irradiados, presentan una apariencia homogénea, dada la ausencia o falta de inducción de proteína fluorescente. Los valores de las muestras STI 150 irradiadas superaron aproximadamente en 2,25 veces los valores de las muestras no irradiadas y 2,6 veces los de la línea salvaje irradiada, en ambos tipos de discos, diferencias estadísticamente significativas. Las líneas STI 50 no irradiada y WT se comportaron se forma similar, no existiendo diferencia alguna entre sus medias (Figura 15).

A.



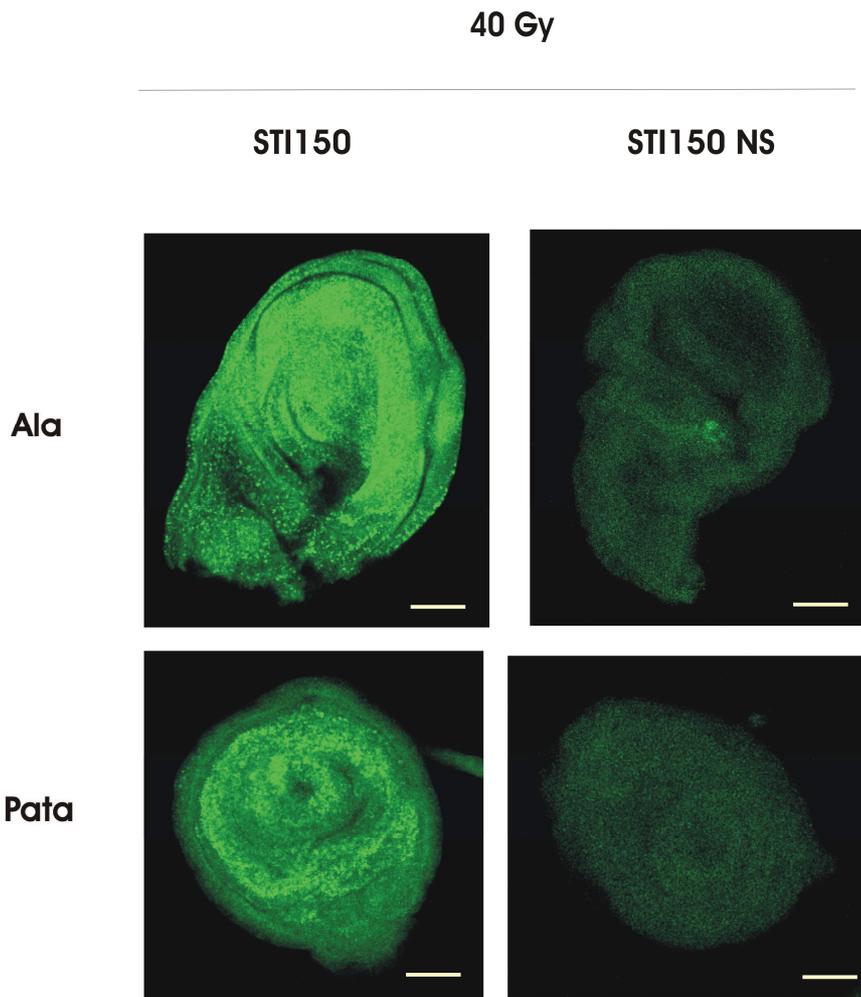
B.



**Figura 15. El sistema reportero es activado ante radiación ionizante en discos imaginales de ala y pata.** A. Para los discos de ala las medias generales fueron: STI 150 No IR: 784.133 ( $\pm$  62.25), STI 150 40G: 1964.910 ( $\pm$  83.79) y Wt 40G: 647.321 ( $\pm$ 58.20). B. Para los discos de pata las medias generales fueron: STI 150 No IR: 882.332 ( $\pm$ 31.07), STI 150 40G: 1741.080 ( $\pm$  89.25) y Wt 40G: 779.007 ( $\pm$  85.11). En todos los casos n = 50.  $\alpha$  = 0,05.

## 2) Dependencia de la respuesta a la activación de p53.

Para comprobar que la activación es p53-dependiente, utilizamos otra línea transgénica, STI150NS. Esta posee el sistema reportero pero junto a una versión no funcional de p53. Se irradiaron ambas líneas con 40 Gy y los discos fueron disecados 3 hs post irradiación. La figura 16 muestra las imágenes obtenidas de ambas líneas.

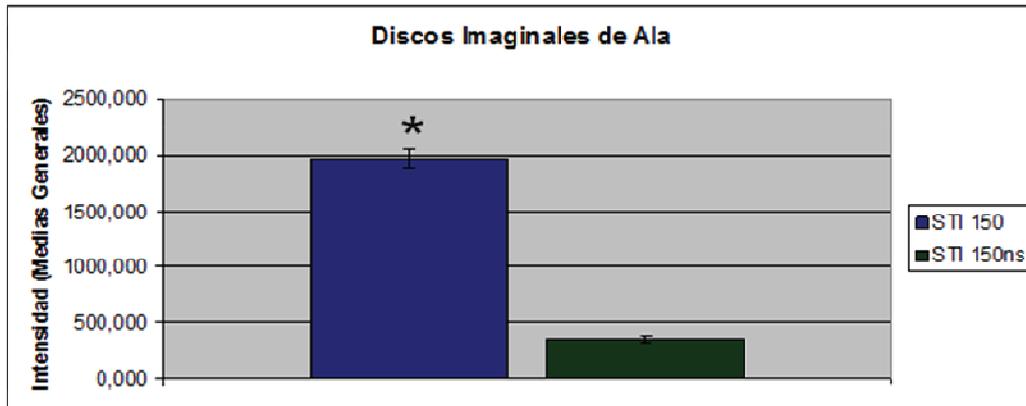


**Figura 16. Discos imaginales irradiados con 40G y disecados 3hs después del tratamiento de estrés.** Los discos de ala y pata carentes de actividad p53 no muestran señal GFP. La barra indica 50  $\mu$ .

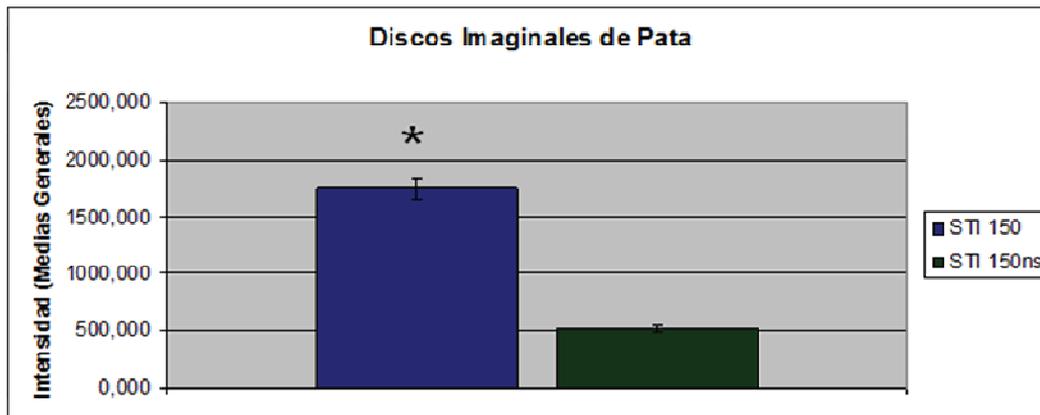
Efectivamente, los discos carentes de p53 no presentan el patrón de expresión observado en aquellos que sí la tienen. La señal es aproximadamente 4.5 veces menor en los discos de

p53<sup>-</sup>, tanto en discos de ala como de pata. La línea STI 150 NS se comporta de la misma manera que la STI 150 no irradiada (Figura 17).

A.



B.

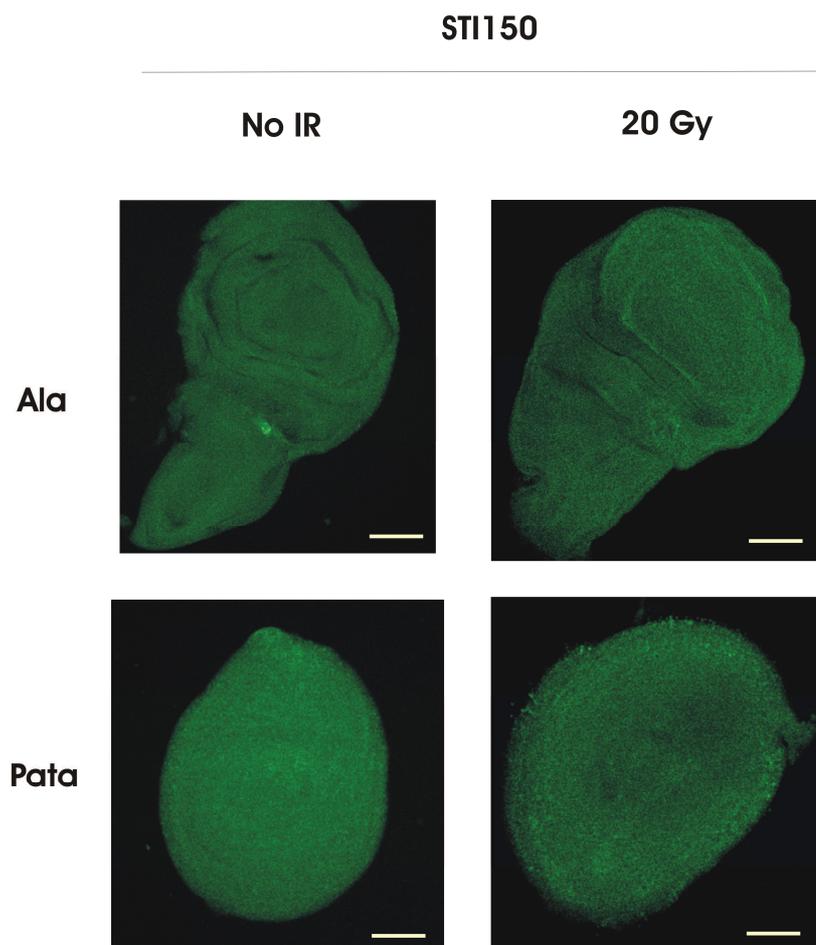


**Figura 17. La activación del sistema reportero es dependiente de p53.** A. Para los discos de ala las medias generales fueron: STI 150: 1964.910 (± 83.79), STI 150ns: 349.099 (± 29.69). B. Para los discos de pata las medias generales fueron: STI 150: 1741.080 (± 89.25), STI 150ns: 515.156 (± 31.45). En todos los casos n = 50.  $\alpha = 0,05$ .

Acorde con lo esperado, la activación del sistema reportero es específica para el aumento de actividad de p53 inducida por radiación ionizante.

### 3) Estudio de la activación de p53 frente a una menor dosis de radiación.

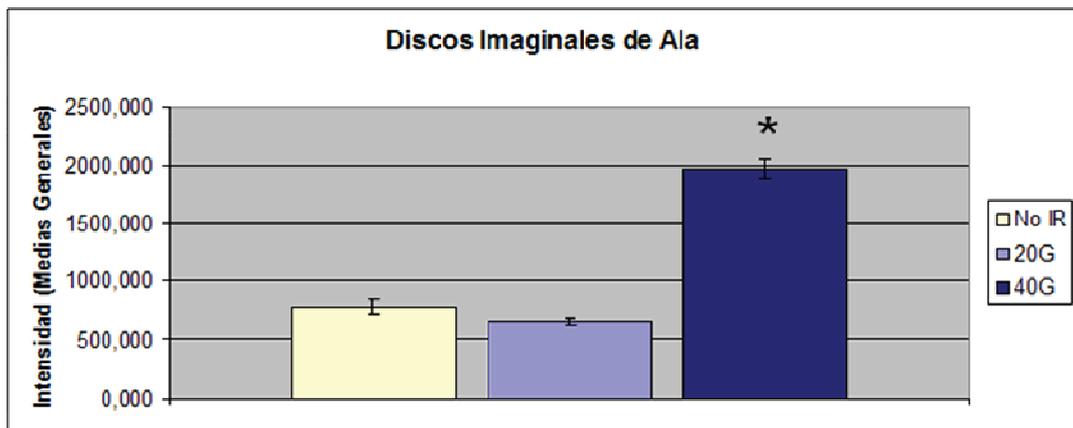
Existen antecedentes de otros investigadores que han utilizado dosis bajas de radiación para inducir apoptosis en diferentes tejidos y estadios de desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Por ejemplo, Abrams y *col.* estudiaron la muerte celular durante la embriogénesis (Abrams y *col.*, 1993) trabajando con dosis de 6 Gy. Milán y colaboradores estudiaron los patrones de muerte en discos imaginales probando dosis de 10 Gy (Milán y *col.*, 1997). En ambos casos, la cantidad de células que exhibían apoptosis era mínima. A raíz de esto, decidimos probar con 20 Gys para observar el tipo de respuesta. Irradiamos larvas STI150 que se compararon con muestras no irradiadas e irradiadas con 40 Gy. En la figura 18 vemos los resultados obtenidos.



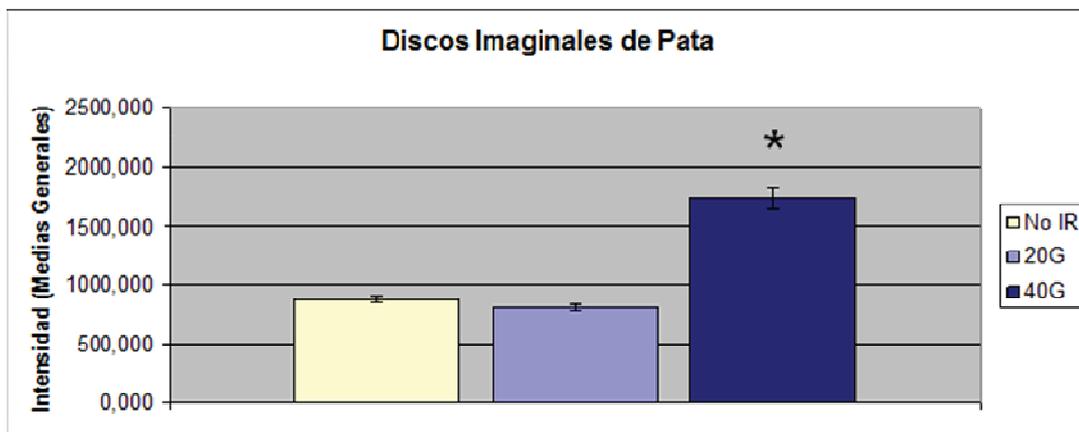
**Figura 18. Discos imaginales irradiados con 20G y disecados 3hs después del tratamiento de estrés.** Los discos tratados con 20G se muestran homogéneos y de aspecto similar a los no irradiados. A la izquierda, muestras no irradiadas. A la derecha, muestras expuestas a 20G. A. Discos de ala. B. Discos de pata. La barra indica 50  $\mu$ .

En este caso, no vimos señal del reportero bajo el tratamiento a dosis bajas de radiación. La comparación de medias reveló que los discos irradiados con 20 Gy se comportaron de la misma manera que los no irradiados, y que además la media fue 2.55 veces menor que la de los irradiados con 40 Gy (Figura 19).

A.



B.



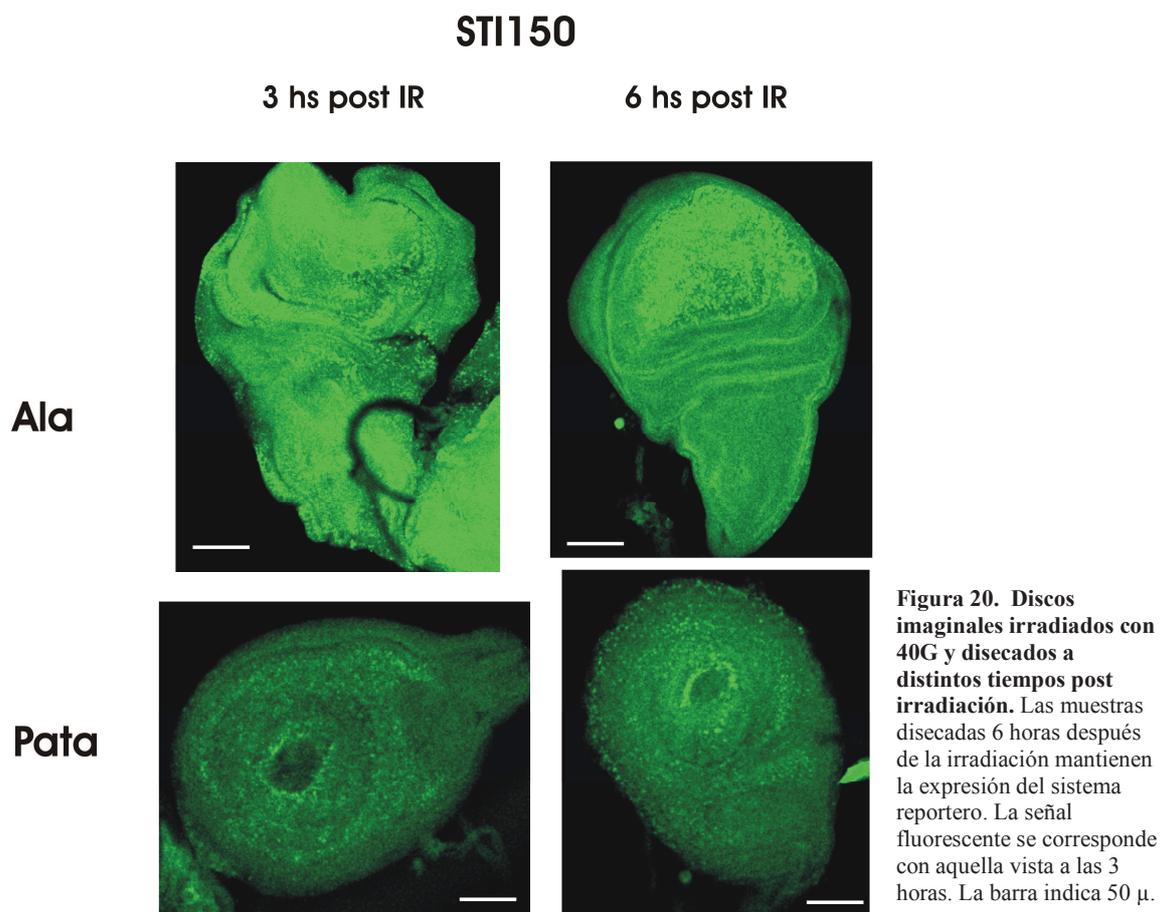
**Figura 19. El sistema reportero no responde a dosis bajas de radiación.** A. Para los discos de ala las medias generales fueron: No IR: 784.133 (± 62.25), 20G: 659.354 (± 27.69), 40G: 1964.910 (± 83.79). B. Para los discos de pata las medias generales fueron: No IR: 882.332 (± 31.07), 20G: 814.363 (± 27.95), 40G: 1741.080 (± 89.25). En todos los casos n = 50.  $\alpha = 0,05$ .

Sólo se vieron diferencias significativas al comparar las muestras sometidas a dosis altas de radiación con las no irradiadas y con las sometidas a 20 Gy. Por lo tanto, el aumento de

actividad de p53 ocurre al tratar con 40G. A simple vista, los discos respondieron de la misma manera que aquellos no irradiados.

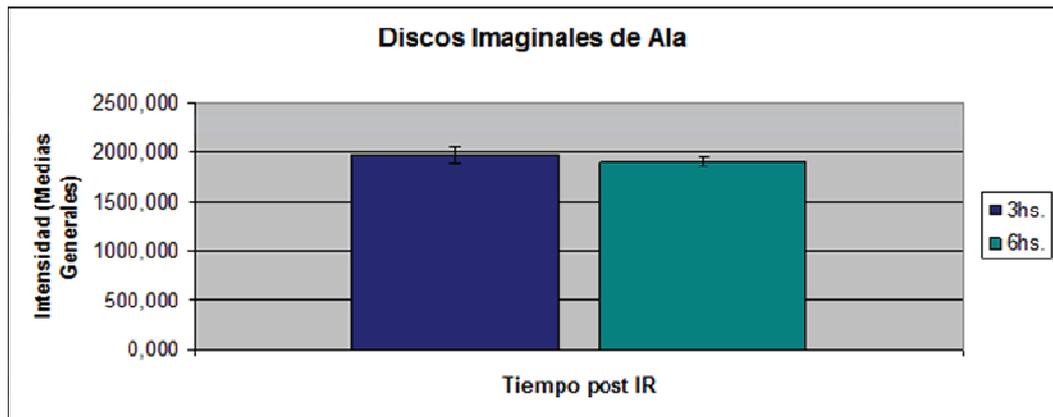
#### 4) Permanencia de activación del sistema reportero en el tiempo.

Finalmente, quisimos estudiar la permanencia de activación del sistema reportero en el tiempo. Para ello las larvas sometidas a 40 Gy de radiación ionizante, fueron disecadas a las 3 y 6 hs post irradiación. Tomamos como límite 6 horas porque pasado este tiempo comienza a observarse una apoptosis independiente de p53, que no estaría activando al sistema reportero (Wichmann y col, 2006). Los resultados se muestran en la figura 20.

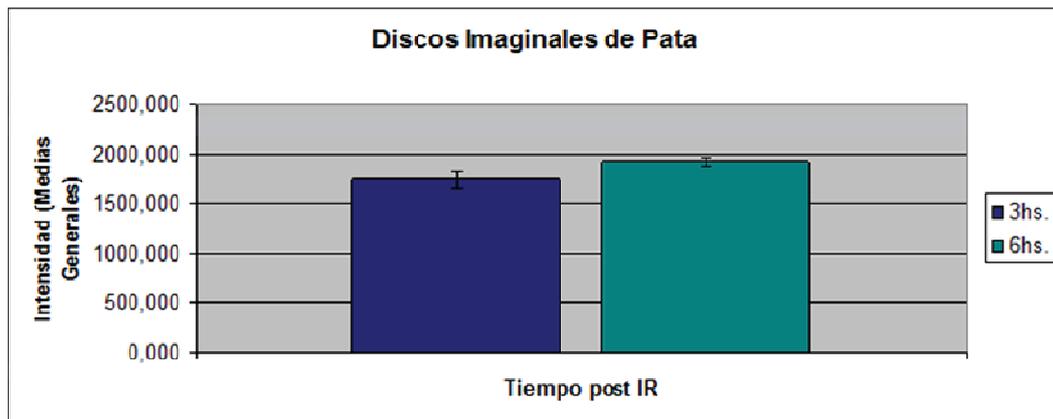


La señal fluorescente se mantiene prácticamente constante en el tiempo, no habiendo diferencias notables de expresión producto del tiempo transcurrido (Figura 21).

A.



B.



**Figura 21. El sistema reportero permanece activo hasta 6 horas después del tratamiento de estrés.** A. Para los discos de ala las medias generales fueron: 3hs.post IR: 1964.910 (± 83.79), 6hs. post IR: 1901.188 (± 49.04). B. Para los discos de pata las medias generales fueron: 3hs.post IR: 1741.080 (± 89.25), 6hs. post IR: 1917.282 (± 47.23). En todos los casos n = 50.  $\alpha = 0,05$ .

De acuerdo a los resultados podemos afirmar que el sistema reportero permanece activo aún 6 horas después de la estimulación, tanto en discos de ala como de pata.

## DISCUSIÓN

La apoptosis o “muerte celular programada” es un mecanismo necesario para el curso de la organogénesis y también ante situaciones que comprometen la estabilidad genómica y del medio interno. La existencia de componentes homólogos a mamíferos en otras especies, da cuenta de la conservación evolutiva del proceso. Gracias a ello, es posible identificar funciones así como la existencia de nuevos reguladores. La proteína supresora de tumores p53 juega un rol importante en situaciones de estrés que producen daño en el ADN, como rotura de doble cadena. Dependiendo de la intensidad del daño, p53 actúa como protector o como inductor de muerte celular (Vousden y Prives, 2009). En el primer caso, es posible detener la progresión del ciclo celular. En el segundo, la célula es dirigida a apoptosis. La conservación de la función de p53 en *Drosophila melanogaster* ha hecho posible que se pueda utilizar este organismo modelo para estudiar su regulación. A diferencia de mamíferos, dmp53 participa solamente en la apoptosis y no en la detención del ciclo celular (Sutcliffe y Brehm, 2004). Además, los reguladores funcionales no son tan conocidos como en mamíferos. Por ejemplo, la proteína Mdm2, uno de los principales moduladores negativos en mamíferos, no se encuentra en *Drosophila*. (Fortini y col, 2000; Bernads y Hariharan, 2001). En este contexto, el grupo de trabajo viene desarrollando estudios que posiblemente vinculen otros candidatos responsables de cumplir, directa o indirectamente esa función (Ferrero y col, 2011; Corujo y col, 2011).

En *Drosophila melanogaster*, la activación de p53 promueve la transcripción de genes blanco como *rpr*, *hid* y *grim*. Estos genes son activados de forma independiente para regular la actividad de otras proteínas llamadas IAPs, las cuales son las encargadas de ubiquitinar y llevar a degradación a las caspasas. Frente a un estímulo de muerte, estos

genes conduce a la degradación vía proteasoma de las proteínas IAPs, dejando a las caspasas libres para ejercer sus funciones (Steller, 2008). Por lo tanto, estimulando la expresión de estos genes, p53 desencadena la apoptosis, por inhibición de los principales inhibidores de las caspasas. Esta no es una condición que se da durante el desarrollo, ya que existe apoptosis promovida por la activación de *reaper*, pero que no está mediada por p53 (Bangs y White, 2000).

Nos propusimos aquí evaluar la actividad de p53 en respuesta a radiaciones ionizantes. Trabajos previos en *Drosophila* en embriones mostraron patrones de apoptosis inducidos por 6 y 40 Gy de radiación (Abrams y col, 1993). Una técnica clásica para “observar” niveles de p53 es mediante inmunohistoquímica. En este caso, se utiliza un anticuerpo contra p53 y un segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo o a una enzima que por degradar un sustrato, pueda dar una reacción de color, por ejemplo. Hoy día existen anticuerpos contra p53 a los cuales se les puede acoplar un segundo anticuerpo que contenga un fluoróforo y observar su expresión in situ en el tejido de interés. Sin embargo, tradicionalmente la inmunohistoquímica no permite detectar con claridad cambios en los niveles de p53, teniendo en cuenta que además, un incremento de su actividad podría no estar necesariamente asociada a incrementos significativos en los niveles proteicos. Fosforilaciones así como modificaciones de otra naturaleza pueden alterar su actividad manteniendo los niveles proteicos constantes.

Mediante el presente trabajo evaluamos una nueva forma de detectar la actividad de p53 *in vivo*, como alternativa a los métodos tradicionales de inmunohistoquímica. El laboratorio del Dr Abrams en UT Southwestern Medical Center, USA, desarrolló un sistema formado por el gen que codifica para la proteína fluorescente verde, controlado por una porción del promotor de *reaper*, que contiene elementos de respuesta a p53 (Lu y col,

2010). La activación de p53 se mide indirectamente por aumentos de los niveles de fluorescencia, en un rango acotado de longitud de onda entre 505-530 nanómetros. Este sistema ha sido hasta el momento, sólo estudiado y validado en embriones. Radiaciones ionizantes de 40 Gy incrementan la expresión de GFP 90 minutos post irradiación y se sostiene durante la embriogénesis en una amplia ventana de tiempo. Experimentos de nuestro laboratorio, no mostrados aquí, reprodujeron estos resultados en embriones, mediante una visualización en tiempo real del aumento de señal de GFP a través de ensayos de “time lapse”.

El objetivo fue validar este sistema en otras instancias del ciclo de vida de *Drosophila*, porque la expresión génica durante la organogénesis y el desarrollo es variable, con un patrón diferencial de expresión de genes. Esto sucede con todos los organismos, independientemente de su complejidad, siendo más notorio y estudiado en eucariotas superiores. Para *Drosophila* en particular, existen numerosos estudios sobre estructuras larvales como los discos imaginales. Estos son órganos conformados como sacos epidermales de una capa (Pastor Pareja *y col*, 2006) con un bajo nivel de apoptosis fisiológica (Milán *y col*, 1997), en donde este patrón puede visualizarse claramente en condiciones de estrés. Así, en una instancia del desarrollo diferente a la embriogénesis, donde es otro el interjuego de expresión de productos génicos, estudiar la activación de p53 ante daño del material genético es útil en el estudio del balance entre proliferación y muerte celular.

A diferencia del tratamiento para la visualización de embriones, los discos imaginales irradiados aquí fueron fijados previamente a la observación. Esto fue necesario porque debido a que la disección necesita tiempo para que los discos queden aislados, de no estar fijados, ocurriría apoptosis por desmembramiento y separación de las estructuras que los

mantiene oxigenados y nutridos. Entonces, las observaciones no serían atribuibles sólo a la irradiación sino a efectos de la manipulación técnica. La fijación preserva en estas condiciones el estado en que se encontraba el tejido y el nivel de apoptosis celular inducidos por la irradiación a los tiempos tratados.

Nuestros resultados indican que el sistema reportero se encuentra activo en discos imaginales a las 3 hs post irradiación, tiempo en el cual es observada la máxima expresión de GFP en embriones, a una dosis equivalente de radiación de 40 Gy. Dicha expresión responde específicamente a la activación de p53, puesto que ensayos similares en una línea carente de p53 funcional, no mostró activación del sistema reportero. Por otra parte, experimentos realizados con una dosis menor – la mitad de la utilizada para embriones y que dio el mismo patrón de apoptosis en discos – no muestran incrementos en los niveles de expresión de GFP y es conocido que dosis tan bajas como 6 Gy en embriones, inducen un leve aumento de apoptosis (Abrams *y col*, 1993).

Finalmente, decidimos evaluar la permanencia de la señal fluorescente en el tiempo, la cual se sostuvo hasta 6 hs post irradiación. Tiempos mayores no fueron estudiados porque la apoptosis observada es independiente de la activación de p53 (Wichmann *y col*, 2006).

El uso de sistemas reporteros está cada vez más extendido, para visualizar componentes de interés sean proteínas o ARN en células en cultivo como en organismos enteros. Los fluoróforos en particular, permiten detectar presencia-ausencia, localización, curso en el tiempo de la síntesis de diferentes productos génicos de interés (Armitage, 2011). En el caso de proteínas, hasta es posible evaluar interacciones proteína-proteína a nivel celular y del organismo entero (ISPIN Project).

En particular, este sistema permite detectar activación de p53, independientemente del análisis estricto de la cantidad total de proteína. Incluso ha permitido observar la activación

de p53 en ovarios de hembras adultas durante la recombinación meiótica, condición fisiológica, en donde la cantidad de esta proteína es menor comparada a la inducida por estrés (Lu y col, 2010).

En suma, este trabajo constituye un aporte original sobre una herramienta para analizar un aspecto de la regulación génica, enfocado en p53 y la apoptosis mediada por esta proteína supresora de tumores. El mismo se encuadra en un proyecto mayor orientado a evaluar posibles reguladores génicos de p53, como el factor de traducción eIF4E. En perspectiva, los estudios apuntan a utilizar esta herramienta en el marco de estudios bioquímicos y moleculares que nos permitan seguir dilucidando intermediarios y rutas de acción en el balance de la proliferación y la muerte celular.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- La línea STI150 tiene incorporado en su genoma un sistema reportero que expresa la proteína fluorescente verde en respuesta al estrés inducido en discos imaginales de larvas de *Drosophila melanogaster* por radiaciones ionizantes. El transgén es estable y se mantiene tras sucesivas rondas de cruzamientos.
- 2.- El sistema reportero es funcional y responde específicamente a la activación de p53.
- 3.- Las dosis se corresponden con las usadas para validar su actividad en embriones.
- 4.- La activación se sostiene en el tiempo, hasta 6 hs luego de la inducción del estrés.

## BIBLIOGRAFIA

- Abrams, J. M.; White, K.; Fessler, L. I. y Steller, H. 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embriogénesis. *Development*. 117(1):29-43.
- Abrams, J. M. 1999. An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends Cell Biol.* 9(11):435-40.
- Alenzi, F. Q.; Loyfy, M. y Wyse, R. K. H. 2010. Swords of Cell Death: Caspase Activation and Regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 11(2):271-80.
- Armitage, B. A. 2011. Imaging of RNA in live cells. *Curr Opin Chem Biol.* En prensa.
- Bangs, P.; Franc, N. y White, K. 2000. Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 7(11):1027-34.
- Bangs, P. y White, K. 2000. Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev Dyn.* 218(1):68-79.
- Bernards, A. y Hariharan, I. K. 2001. Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev.* 11(3):274-8.
- Brodsky, M. H.; Nordstrom, W.; Tsang, G.; Kwan, E.; Rubin, G. M. y Abrams, J. M. 2000. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell.* 101(1):103-13.
- Brodsky, M. H.; Weinert, B. T.; Tsang, G.; Rong, Y. S.; McGinnis, N. M.; Golic, K. G.; Rio, D. C. y Rubin, G. M. 2004. *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 Regulate Multiple DNA Repair and Apoptotic Pathways following DNA Damage. *Mol Cell Biol.* 24(3):1219-31.
- Caelles, C.; Helmborg, A. y Karin, M. 1994. p53-Dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* 370(6486):220-3.
- Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 263(5148):802-5.
- Christich, A.; Kauppila, S.; Chen, P.; Sogame, N.; Ho, S. I. y Abrams, J. M. 2002. The Damage-Responsive *Drosophila* Gene sickle Encodes a Novel IAP Binding Protein Similar to but Distinct from reaper, grim, and hid. *Curr Biol.* 12(2):137-40.
- Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S. y Lukyanov, K. A. 2010. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol Rev.* 90(3):1103-63.

- Conradt, B. 2009. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet.* 43:493-523.
- Corujo G, Campagno R, Rivera Pomar R, Ferrero PV. 2011. A surrogate p53 reporter in *Drosophila* reveals the interaction of eIF4E and p53. *Biocell.* 35 (supl) pp 66.
- Ferrero, P. V.; Corujo, G.; Campagno, R.; Lu, W. J.; Abrams, J.; Rivera Pomar, R. Genetic interaction of p53 and eIF4E at the balance of proliferation and apoptosis. *Drosophila Research Conference. European Lisboa, Portugal 21-24, 2011.*
- Fields, S. y Jang, S. K. 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* 249(4972):1046-9.
- Fortini, M. E.; Skupski, M. P.; Boguski, M. S. y Hariharan, I. K. 2000. A Survey of Human Disease Gene Counterparts in the *Drosophila* Genome. *J Cell Biol.* 150(2):23-30.
- Gloor, G. B.; Preston, C. R.; Johnson-Schlitz, D. M.; Nassif, N. A.; Phillis, R. W.; Benz, W. K.; Robertsons, H. M. y Engelst, W. R. 1993. Type I Repressors of P Element Mobility. *Genetics.* 135(1):81-95.
- Guimarães, C. A. y Linden, R. 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem.* 271(9):1638-50.
- Haupt, S.; Berger, M.; Goldberg, Z. y Haupt, Y. 2003. Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science.* 116: 4077-4085.
- Hay, B. A.; Wassarman, D. A. y Rubin, G. M. 1995. *Drosophila* Homologs of Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Proteins Function to Block Cell Death. *Cell.* 83(7):1253-62.
- Hengartner, M. O. y Horvitz, H. R. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell.* 76(4):665-76.
- Hwang, P. M.; Bunz, F.; Yu, J.; Rago, C.; Chan, T. A.; Murphy, M. P.; Kelso, G. F.; Smith, R. A. J.; Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med.* 7(10):1111-7.
- ISPIN. [ispinproject.org](http://ispinproject.org)
- Jeffrey, P. D.; Gorina, S. y Pavletich, N. P. 1995. Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms. *Science.* 267(5203):1498-502.
- Jiang, L.; Sheikh, M. S. y Huang, Y. 2010. Decision Making by p53: Life versus Death. *Mol Cell Pharmacol.* 2(2): 69–77.
- Jin, S.; Martinek, S.; Joo, W. S.; Wortman, J. R.; Mirkovici, N.; Sali, A.; Yandell, M. D.; Pavletich, N. P.; Young, M. W. y Levine, A. J. 2000. Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(13):7301-6.

- Joerger, A. C. y Fersht, A. R. 2007. Structure–function–rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 26(15):2226-42.
- Joerger, A. C. y Fersht, A. R. 2010. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(6):a000919.
- Kannan, K.; Kaminski, N.; Rechavi, G.; Jakob-Hirsch, J.; Amariglio, N. y Givol, D. 2001. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*. 20(26):3449-55.
- Kaufmann, T.; Strasser, A. y Jost, P. J. 2011. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*.
- Koumenis, C.; Alarcon, R.; Hammond, E. 2001. Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. *Mol. Cell. Biol*. 21(4):1297.
- Kruse, J. P. y Gu, W. 2010. Modes of p53 regulation. *Cell*. 137(4):609-22
- Kusano, K.; Sakaguchi, M.; Kagawa, N.; Waterman, M. R. y Omura, T. 2001. Microsomal p450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure. *J Biochem*. 129(2):259-69.
- Lettre, G. y Hengartner, M. O. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(2):97-108.
- Lu, W. J. y Abrams, J. M. 2006. Lessons from p53 in non-mammalian models. *Cell Death Differ*. 13(6):909-12.
- Lu, W. J.; Chao, J.; Roig, I. y Abrams, J. M. 2010. Meiotic Recombination Provokes Functional Activation of the p53 Regulatory Network. *Science*. 328(5983):1278-81.
- Mack, D. H.; Vartikar, J.; Pipas, J. M. y Laimins, L. A. 1993. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature*. 363: 281-283
- MacFarlane, M. y Williams, A. C. 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision Conference and Workshop on Apoptosis and Disease. *EMBO Rep*. 5(7):674-8.
- Mehta, K. R.; Yang, C. Y. y Montclare, J. K. 2011. Modulating substrate specificity of histone acetyltransferase with unnatural amino acids. *Mol Biosyst*. 7(11):3050-5.
- Mihara, M.; Erster, S.; Zaika, A.; Petrenko, O.; Chittenden, T.; Pancoska, P. y Moll, U. M. 2003. p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Mol Cell*. 11(3):577-90.
- Milán, M.; Campuzano, S. y García-Bellido, A. 1997. Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(11):5691-6.

Nahle, Z.; Polakoff, J.; Davuluri, R. V.; McCurrach, M. E.; Jacobson, M. D.; Narita, M.; Zhang, M. Q.; Lazebnik, Y.; Bar-Sagi, D. y Lowe, S. W. 2002. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol.* 4(11):859-64.

Ola, M. S.; Nawaz, M.; Ahsan, H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* 351(1-2):41-58.

Ormo, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J. 1996. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. *Science.* 273(5280):1392-5.

Pastor Pareja, J. C.; Blanco, E. M.; García-Bellido, A. 2006. Eversión y cierre de los discos imaginales. *Investigación y ciencia.* 72-81.

Ramos Morales, P. 1993. Capítulo I, 1-17. En: Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Ed. McGraw-Hill. 1ª ed. México.

Read, R. D. 2011. Drosophila melanogaster as a model system for human brain cancers. *Glia.* 59(9):1364-76.

Schuler, M.; Bossy-Wetzel, E.; Goldstein, J. C.; Fitzgerald, P. y Green, D. R. 2000. p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *J Biol Chem.* 275(10):7337-42.

Seshagiri, S. y Miller, L. K. 1997. Caenorhabditis elegans CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol.* 7(7):455-60.

Soengas, M. S.; Alarcón, R. M.; Yoshida, H.; Giaccia, A. J.; Hakem, R.; Mak, T. W. y Lowe, S. W. 1999. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science.* 284(5411):156-9.

Steller, H. 2008. Regulation of apoptosis in Drosophila. *Cell Death Differ.* 15(7):1132-8.

Stepanenko, O. V.; Stepanenko, O. V.; Shcherbakova, D. M.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. y Verkhusha, V. V. 2011. Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *Biotechniques.* 51(5):313-27.

Stommel, J. M.; Marchenko, N. D.; Jimenez, G. S.; Moll, U. M.; Hope, T. J. y Wahl, G. M. 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18(6):1660-72.

Sutcliffe, J. E. y Brehm, A. 2004. Of flies and men; p53, a tumour supresor. *FEBS Lett.* 567(1):86-91.

Tenev, T.; Zachariou, A.; Wilson, R.; Paul, A. y Meier, P. Jafrac2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1. *EMBO J.* 21(19):5118-29.

- Verhagen, A. M.; Coulson, E. J. y Vaux, D. L. 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* 2(7):1-10.
- Vousden, K. H. y Prives, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137(3):413-31.
- Wang, L.; Jackson, W. C.; Steinbach, P. A. y Tsien, R. Y. 2004. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(48):16745-9.
- Waning, D. L.; Lehman, J. A.; Batuello, C. N. y Mayo, L. D. 2010. Controlling the Mdm2-Mdmx-p53 Circuit. *Pharmaceuticals (Basel).* 3(5):1576-1593.
- Whitworth, A. J. 2011. Drosophila models of Parkinson's disease. *Adv Genet.* 73:1-50.
- Wichmann, A.; Jaklevic, B. y Su, T. T. 2006. Ionizing radiation induces caspase-dependent but Chk2- and p53-independent cell death in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(26):9952-7.
- Wolf, M. J. y Rockman, H. A. 2011. *Drosophila*, genetic screens, and cardiac function. *Circ Res.* 109(7):794-806.
- Wyllie, A. H. 2010. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol.* 42(1):4-9.
- Youle, R. J. y Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):47-59.
- Yu, H.; Chen, J. K.; Feng, S.; Dalgarno, D. C.; Brauer, A. W. y Schreiber, S. L. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell.* 76(5):933-45.
- Yuan, J.; Shaham, S.; Ledoux, S.; Ellis, H. M. y Horvitz, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 75(4):641-52.
- Zhao, K.; Chai, X.; Johnston, K.; Clements, A. y Marmorstein, R. 2001. Crystal Structure of the Mouse p53 Core DNA-binding Domain at 2.7 Å Resolution. *J Biol Chem.* 276(15):12120-7.

## RESUMEN

La apoptosis o “muerte celular programada” ocurre naturalmente durante el desarrollo y resulta ser un mecanismo eficaz para mantener la homeostasis frente a daños o condiciones estresantes. La maquinaria apoptótica está conservada a través de las especies y *Drosophila melanogaster* presenta homólogos de los miembros más representativos, cumpliendo cada uno de ellos, funciones similares a las de mamíferos. Por esta razón entre otras, la mosca de la fruta se ha vuelto una herramienta de gran utilidad para el desarrollo de diversos estudios.

Uno de los principales intermediarios de la apoptosis es la proteína supresora de tumores, p53, que actúa principalmente como factor de transcripción. Esta proteína se activa principalmente ante situaciones de estrés que dañan el ADN y comprometen la estabilidad genómica. El homólogo de p53, presente en *Drosophila melanogaster* regula la transcripción de genes blanco, como la familia multigénica RHG, *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)* y *grim*. Sus productos proteicos son traducidos de forma independiente para regular la actividad de las caspasas, proteasas específicas que ejecutan el programa de muerte celular.

El presente trabajo estudia y optimiza una nueva forma de detectar la actividad de p53 ante radiaciones ionizantes. Trabajamos sobre discos imaginales (órganos larvales, que darán origen a las estructuras del adulto) de *Drosophila melanogaster*. Éstos últimos son particularmente útiles porque presentan poca apoptosis fisiológica, característica que los convierte en sistemas ideales de evaluación efectiva de la muerte inducida por tratamientos de estrés.

Se utilizó un sistema reportero que consta del gen que codifica para la proteína fluorescente verde, unido a una porción del promotor del gen *reaper*, el cual tiene un elemento de respuesta a p53. Cuando p53 se expresa en respuesta a irradiación gamma, se observa incremento de la fluorescencia verde. El sistema reportero sólo ha sido estudiado en embriones. El grupo de trabajo corroboró su funcionamiento en el estadio larval. Los objetivos se enmarcaron en evaluar la respuesta tras el tratamiento con dosis bajas y altas de radiación ionizante y determinar la permanencia de activación en el tiempo. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que la activación se produce cuando irradiamos las muestras con dosis altas de radiación (40G), y la señal se mantuvo hasta 6 horas después de la exposición al estrés. La misma, es específica para la activación de p53.

Así, este sistema constituye una alternativa para evaluar la actividad de p53 *in vivo*, a los métodos tradicionales de baja eficiencia como la inmunohistoquímica. Esperamos que el presente trabajo estimule el uso de construcciones genéticas de estas características y fomente el desarrollo de nuevas herramientas para la detección de la actividad proteica.

## ANEXOS

### **I. Genotipos de las líneas de *Drosophila melanogaster***

Línea salvaje (WT): Canton-S.

Línea transgénica con sistema reportero: STI150/STI150; Tm3 sb e ri/ $\Delta$ 86 ry e ri

Línea transgénica con sistema reportero y el transgén que codifica para la proteína p53 no funcional: STI150NS/STI150NS; +/-

### **II. Preparación del medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*.**

- Mezclar 5.3g. de agar con 450ml. de agua destilada y hervir.
- Por otro lado mezclar: 44g. de glucosa, 8.8g. de levadura seca, 50g. de harina de maíz y 100ml. de agua destilada.
- Combinar ambas mezclas y hervir durante 20 minutos.
- Agregar una solución de Nipagin 10% p/v en etanol 15,4 ml.
- Alicuotar en viales y/o botellas.
- Mantener en heladera (4°C).
- Agregar levadura seca justo antes de usar.

### **III. Protocolo para la extracción de ADN total a partir de moscas enteras.**

#### ***Composición del buffer de lisis***

- 10mM Tris-Cl ph: 8.2
- 1mM EDTA
- 25 mM NaCl
- 200  $\mu$ g/ml de proteinasa K, agregada al momento de uso.

#### **IV. Preparación del gel de agarosa 1%**

- Mezclamos 0.5 g de agarosa con 50 ml de buffer TBE 1X\*.
- Calentamos la mezcla en microondas hasta fundir y disolver completamente la agarosa.
- Añadimos 5µl de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml).
- Vertemos en la “cama electroforética” y dejamos gelificar.

\*STOCK. TBE 10X (1 litro)

- Disolver 108g de Tris base y 55g de ácido bórico en 900ml de agua destilada.
- Agregar 40ml. de Na<sub>2</sub>EDTA 0.5M, ph: 8.
- Ajustar el volumen con agua destilada.
- Guardar a temperatura ambiente.

Para usar, diluir TBE 10X 1/10.

TBE 1X (1 litro). Tomar 100 ml de TBE 10X y agregar 900 ml de agua deionizada.

#### **V. Soluciones para la fijación y el montaje.**

PBS 1X, PFA 4%, glycerol 100%.

Preparación:

STOCK: PBS 10X (1 litro)

- Disolver 80 g. NaCl, 2 g. KCl, 26.8 g. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 2.4 g. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml. de agua destilada.
- Ajustar a ph: 7.4.
- Ajustar el volumen con agua destilada.
- Alicuotar y autoclavar.
- Guardar a 4°C.

**PBS 1X (1 litro)**

Tomar 100 ml de PBS 10X y agregar 900 ml de agua deionizada.

**Paraformaldehído 4% (PFA 4%)**

Pesar 4g de PFA (p/v) en 100 ml de PBS 1X.

**Glicerol 100%**

**VI. Parámetros establecidos para la toma de imágenes de microscopía confocal.**

Se destacan en negrita y cursiva los parámetros más importantes.

Scan Mode: Plane

Scan Zoom: 1.0

***Objective: Plan-Neofluar 20x/0.5 (objetivo usado para la visualización de discos)***

Pixel time: 12.8  $\mu$ s

Average: line 4

***Detector Gain: Ch 2: 950 (intensidad de señal)***

Amplifier Gain: Ch 2: 1.0

Amplifier Offset: Ch 2: -0.1 V

Pinhole: Ch 2: 241  $\mu$ m

***Filters: Ch 2: BP 505-530 (espectro de emisión de fluorescencia)***

Beam Splitters: MBS: HFT 488

DBS1: Mirror

DBS2: Mirror

DBS3: None

FW1: None

***Wavelength: 488 nm, 5.0 % (longitud de onda del laser Argón, potencia).***