

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Caracterización de los complejos SCF y estudio de
la función de la proteína F-box Slimb en la
ovogénesis de *Drosophila melanogaster***

Autor: Lic. Mariana Muzzopappa

Director: Dr. Pablo Wappner

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de
la Universidad de Buenos Aires**

Año 2005

Resumen

La degradación de proteínas mediada por el sistema ubiquitina/proteasoma es un mecanismo de control de la abundancia de proteínas específicas dentro de la célula. Muchas proteínas son marcadas para su degradación por una familia de E3 ubiquitin-ligasas multiméricas, denominadas complejos SCF. Estos complejos están compuestos por tres polipéptidos constantes – Skp1, Cdc53/Cul1, Rbx1/Hrt1 – y un cuarto componente variable, la proteína adaptadora con motivo F-box. Utilizando el sistema del doble híbrido de levaduras, como así también ensayos de interacción *in vitro*, hemos identificado por primera vez a los componentes del núcleo invariante de los complejos SCF en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Mediante experimentos de complementación funcional en *S.cerevisiae* demostramos que la proteína Rbx1 de *Drosophila* puede restaurar la viabilidad de mutantes *hrt1* de levaduras, indicando que los complejos SCF están funcionalmente conservados en la evolución.

Slimb es una proteína de *Drosophila* con motivo F-box, que cumple distintas funciones en el desarrollo y la fisiología celular. En esta tesis, hemos analizado la función de Slimb durante la ovogénesis de *Drosophila*. Demostramos que la pérdida de función de Slimb en la línea germinal provoca una reducción en los niveles de dE2F2 y Dp, lo cual se correlaciona con alteraciones en la regulación de los ciclos mitóticos durante la formación del cisto, con anomalías en la endorreplicación del genoma de las células nodrizas y con defectos en el vertido del contenido del citoplasma de las células nodrizas dentro del ovocito. Nuestros resultados sugieren que Slimb regula indirectamente los niveles de E2F2 y Dp, controlando de esta manera el desarrollo del cisto.

Por otro lado, la generación de clones mutantes *slimb* en la línea somática del ovario dio lugar a la aparición de alteraciones en la morfología del germario y a defectos en la encapsulación del cisto por parte del epitelio folicular. Asimismo, ovarios con clones somáticos *slimb* exhibieron retrasos en la diferenciación del epitelio folicular, lo cual se correlacionó con la aparición de células polares ectópicas, falta de tallos interfoliculares y deslocalización del ovocito dentro del folículo. Encontramos también que en la ovogénesis media, Slimb se necesita en el epitelio folicular para especificar a las células foliculares que darán origen a los apéndices dorsales. La hiperactivación débil de la vía de Dpp dio lugar a la aparición de fenotipos semejantes a los de pérdida de función de *slimb*, los cuales fueron totalmente suprimidos cuando se sobre-expresó la proteína Slimb simultáneamente con Dpp. Significativamente, en ovarios con clones *slimb* se observó la expresión ectópica del gen *Broad-Complex* y del reportero transcripcional *dad-LacZ*, como así también una acumulación anormal de la proteína co-Smad, Medea. Proponemos que Slimb normalmente regula negativamente a la vía de Dpp, destinando a degradación a la proteína Medea. Finalmente, proporcionamos evidencias de que Slimb interacciona genéticamente con componentes y con reguladores de los complejos SCF, sugiriendo que Slimb funciona como subunidad adaptadora de este complejo en el ovario de *Drosophila*.

Palabras clave: ubiquitina, complejo SCF, F-box, Slimb, ovogénesis, *Drosophila*.

Abstract

Ubiquitin/proteasome mediated proteolysis is a commonly employed mechanism for the control of protein abundance in the cell. Many proteins are targeted for degradation by a family of multimeric E3 ubiquitin ligases, termed SCF complexes. These complexes are composed of three constant proteins- Skp1, Cdc53/Cul1, Rbx1/Hrt1- and a variable adaptor subunit, the F-box protein. By utilizing the yeast two hybrid system and *in vitro* interactions we have identified for the first time the components and overall structure of the basic SCF complex in *Drosophila melanogaster*. A functional complementation test performed in a *S.cerevisiae* showed that *Drosophila* Rbx1 can restore the viability of yeast *hrt1* mutant cells, indicating that the complex is functionally conserved throughout evolution.

Slimb (Slmb) is a *Drosophila* F-Box protein that fulfills several roles in development and cell physiology. We have analyzed here its participation in egg chamber development by generating mutant clones in the ovary. *slmb* loss of function in the germline provoked a reduction in dE2F2 and dDP levels, which correlated with misregulation of mitotic cycles during cyst formation, abnormal nurse cell endoreplication and impairment of dumping of the nurse cell content into the oocyte. We suggest that Slmb indirectly downregulates E2F2 and Dp levels, thereby controlling mitotic and endocycle replication during cyst development, as well as the process of nurse cell dumping and apoptosis.

slmb mutant clones in the somatic line caused alterations in the morphology of the germarium and defects in encapsulation of the cyst. Furthermore, *slmb* somatic clones exhibited a delay in follicle cell differentiation, which correlated with the occurrence of ectopic polar cells, lack of interfollicular stalks and mislocalization of the oocyte. We found that, at mid-oogenesis, Slmb was required in the follicular epithelium to specify the shape and position of two patches of cells that will give rise to dorsal appendages. Mild overactivation of the Dpp pathway provoked similar phenotypes that could be antagonized by simultaneous overexpression of Slmb and interestingly, ectopic expression of the *Broad-Complex* gene and of a *dad-LacZ* reporter element, as well as over-accumulation of the co-Smad protein Medea, were recorded in *slmb* somatic clones. We propose that Slmb normally downregulates the Dpp pathway in follicle cells by targeting Medea for proteasomal degradation. Finally, we provide evidences that Slmb genetically interacts with components and regulators of the SCF complex, suggesting that Slmb functions as a subunit of an SCF complex in the ovary.

Keywords: ubiquitin, SCF complex, F-box, Slimb, oogenesis, *Drosophila*

El trabajo de tesis que aquí se presenta, "Caracterización de los complejos SCF y estudio de la función de la proteína F-box Slimb en la ovogénesis de *Drosophila melanogaster*" fue enteramente realizado en el laboratorio del Dr. Pablo Wappner, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación Instituto Leloir, en la Ciudad de Buenos Aires.

Esta tesis se generó dentro de un proyecto iniciado en el laboratorio por la Dra. Silvia Bocca, cuyo objetivo original era caracterizar los complejos E3-ubiquitin ligasa de *Drosophila*, en particular aquellos relacionados con la degradación del Factor Inducible por Hipoxia Sima/Hif-1 α . En el transcurso de los experimentos, encontramos que el complejo E3-ligasa SCF^{Slimb} estaba involucrado en el desarrollo del ovocito de *Drosophila*. Dado nuestro interés en temas de biología del desarrollo, decidimos estudiar en detalle la función de la proteína F-box, Slimb, durante la ovogénesis de *Drosophila*.

Este trabajo de tesis consta de dos capítulos diferenciados experimental y metodológicamente: el Capítulo I comprende la identificación de las proteínas que componen los complejos SCF de *Drosophila* y el estudio de sus interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido de levaduras y en ensayos de interacción *in vitro*. El Capítulo II constituye la parte más importante de esta tesis y se centra en la caracterización funcional del complejo SCF^{Slimb} en la ovogénesis de *Drosophila*.

Mariana Muzzopappa

Abreviaturas

Aa: aminoácido

Ade: adenina

APF-1: ATP-dependent Proteolytic Factor-1 (ubiquitina)

Arm: Armadillo/ β -catenina

BDGP: Berkeley Drosophila Genome Project

CDK: ciclina dependiente de quinasa

cDNA: DNA copia

Ci: *Cubitus interruptus*

CMF: Células madre somáticas/foliculares

CMG: Células madre germinales

C-terminal: Carboxi-terminal

Cul1: Cullin1

CycE: Ciclina E

Dad: Daughters against Dpp

Dpp: Decapentaplegic (TGF- β)

E1: Enzima activadora de ubiquitina

E2: Enzima conjugadora de ubiquitina

E3: Enzima ubiquitin ligasa

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EST: Expressed Sequence Tag

FLP: Flipasa

GFP: Green Fluorescent Protein

Grk: Gurken

GST: Glutation S-Transferasa

HECT : Homologous to E6-AP Carboxi-Terminus domain

Hh: Hedgehog

His: histidina

Hs: Heat-shock

IVTT: *in vitro* transcription and translation

Leu: leucina

Mad: Mothers against Dpp

Mad-P: Mad fosforilado

Med: Medea

mRNA: RNA mensajero

N-terminal: Amino-terminal

PCR: Polimerase Chain Reaction

Ptc: Patched

RING: Really Interesting New Gene

SCF: Skp1- Cul1- F-box

Slmb: Slimb (Supernumerary limbs)

Tkv: Thickveins

Trip: triptofano

UAS: Gal4-Upstream Activating Sequence

Ub: ubiquitina

Ubc: Ubiquitin conjugating enzyme, E2

Wg: Wingless/Wnt

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosido

Indice

	Página
I- Introducción. -----	1-13
1. La vía de degradación ubiquitina/proteasoma.-----	1
1.1. El proteasoma 26 S.-----	4
1.2. La ubiquitina.-----	5
1.3. La maquinaria de ubiquitinación E1, E2, E3. -----	6
1.3.1. La enzima activadora de ubiquitina, E1.-----	6
1.3.2. La enzima conjugadora de ubiquitina, E2.-----	7
1.3.3. E3 ubiquitín-ligasas: una familia diversa.-----	8
HECT-E3 ligasas.-----	9
RING-E3 ligasas.-----	10
2. Ubiquitinación y patogénesis.-----	12
II- Capítulo I: Identificación y caracterización de los complejos SCF en <i>Drosophila melanogaster</i>.	
Introducción -----	14-28
1. Descubrimiento de los complejos SCF.-----	14
2. Arquitectura de los complejos SCF.-----	16
2.1. La subunidad Skp1.-----	16
2.2. Cullin1, el andamio estructural.-----	17
2.3. Rbx1, la subunidad catalítica.-----	18
2.4. La proteína con motivo F-box: el componente variable.-----	19
3. La hipótesis combinatoria y los complejos SCF.-----	22
3.1. Complejos SCF en levaduras.-----	22
3.2. Complejos SCF en mamíferos.-----	25
4. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo para el estudio de la vía ubiquitina/proteasoma.-----	27
Objetivos. -----	29
Resultados. -----	30-43
1. Identificación de proteínas candidatas por homología de secuencias.-----	30
1.1. La proteína Skp1 de <i>Drosophila</i> .-----	30
1.2. La Cullin1 de <i>Drosophila</i> .-----	31
1.3. La subunidad Rbx1 de <i>Drosophila</i> .-----	33
2. Otros componentes del sistema Ubiquitina/Proteasoma en <i>Drosophila</i> .-----	35
2.1. Slimb, una proteína con motivo F-box.-----	35
2.2. Enzimas activadoras de ubiquitinas, E2.-----	35
3. Obtención de los cDNAs de las proteínas identificadas en <i>Drosophila</i> .-----	36
4. Ensayos de interacciones en el sistema de Doble Híbrido en levaduras. -----	37
4.1. Ensayos de interacción en placa.-----	38
4.2. Ensayos de interacción en medio líquido.-----	39
5. Análisis de interacciones <i>in vitro</i> .-----	41
5.1 Interacciones <i>in vitro</i> observadas.-----	41

Discusión. -----	44
• Las subunidades del complejo SCF Skp1, Rbx1 y Cul1 están conservadas en <i>Drosophila</i> e interaccionan físicamente.-----	44
• Los componentes del complejo SCF interaccionan específicamente con la enzima E2, UbcD1.-----	46
• Modelo propuesto para el complejo SCF ^{Slimb} de <i>Drosophila</i> .-----	48
• Modelo actual de los complejos SCF.-----	48
Conclusiones. -----	51

III- Capítulo II: Estudio de la función del complejo SCF^{Slimb} en el desarrollo del ovocito de *Drosophila melanogaster*.

Introducción. -----	52-71
1. Slimb, una proteína con motivo F-box.-----	52
2. El ovario de <i>Drosophila</i> como sistema modelo.-----	53
3. La ovogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i> .-----	54
3.1. Primeras etapas de la ovogénesis: el gemario.-----	54
3.2. El proceso de encapsulación.-----	56
3.3. Desarrollo del linaje germinal.-----	59
3.4. Desarrollo y diferenciación del linaje somático-folicular.-----	60
3.4.1. Diferenciación de los dominios terminales del epitelio folicular-----	60
3.4.2. Establecimiento del eje antero-posterior del folículo.-----	61
3.4.3. Diferenciación de sub-poblaciones foliculares en el dominio terminal-anterior.-----	63
3.4.4. Determinación del eje dorso-ventral del folículo.-----	64
3.5. La cubierta del huevo.-----	66
3.6. Estructura del corion.-----	68
3.7. Resumen de la ovogénesis de <i>Drosophila</i> .-----	70
Objetivos. -----	72
Resultados. -----	73-105
1. Alelos mutantes <i>slmb</i> .-----	73
2. Patrón de expresión de <i>slmb</i> .-----	74
3. Estudios de pérdida de función en ovarios mutantes <i>slmb</i> .-----	74
3.1. Slimb en el desarrollo del linaje germinal.-----	75
3.1.1. Morfología de los ovarios mutantes <i>slmb</i> .-----	75
3.1.2. División mitótica en cistos mutantes para <i>slmb</i> .-----	76
3.1.3. Estudio de reguladores del ciclo celular en clones mutantes <i>slmb</i> .-----	77
3.2. Slimb en el desarrollo del linaje somático-folicular.-----	79
3.2.1. Fenotipos de pérdida de función de <i>slmb</i> .-----	79
3.2.2. Slimb en la diferenciación del epitelio folicular.-----	80
3.3. Defectos en la morfogénesis del corion.-----	82
4. Rol de Slimb en la regulación de distintas vías de señalización intracelular.-----	83
4.1. Análisis de interacciones génicas entre <i>slmb</i> y distintas vías de transducción de señales.-----	83

4.2. La vía de Hedgehog-----	85
A) Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía Hh en el ovario.----	85
B) Análisis de marcadores moleculares de la vía Hh en clones mutantes <i>slmb</i> .-----	86
4.3. La vía Wingless.-----	87
Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía Wg en el ovario.-----	87
4.4. La vía del EGFR.-----	87
A) Análisis de marcadores moleculares de la vía del EGFR en clones mutantes <i>slmb</i> .-----	88
4.5. La vía de Decapentaplegic.-----	89
A) Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía de Dpp en el ovario.	90
B) Interacción entre Slmb y la vía de Dpp.-----	91
C) Análisis de marcadores moleculares de la vía de Dpp en clones mutantes <i>slmb</i> .-----	93
C.1) Análisis de la expresión de Dpp en clones mutantes <i>slmb</i> .-----	93
C.2) Análisis de la expresión de <i>Broad-Complex</i> .-----	93
C.3) Análisis de la expresión de <i>dad-LacZ</i> .-----	94
C.4) Análisis del patrón de expresión de Medea en clones mutantes <i>slmb</i> .-	95
D) Resumen de las interacciones observadas entre Slmb y la vía de dpp.---	96
5. Interacción de Slmb con componentes y reguladores de los complejos SCF.----	97
Figuras -----	100-105
• Figura 28: Patrón de expresión de <i>slmb</i> en el ovario.-----	100
• Figura 29: Fenotipos provocados por la pérdida de función de <i>slmb</i> en el linaje germinal.-----	100
• Figura 30: Divisiones mitóticas en los cistos mutantes <i>slmb</i> .	101
• Figura 31: Fenotipos provocados por la pérdida de función de <i>slmb</i> en el linaje somático.-----	101
• Figura 32: Retraso en la diferenciación celular y aparición de células polares ectópicas en los folículos con clones mutantes <i>slmb</i> .-----	102
• Figura 33: Morfología del corion de huevos mutantes <i>slmb</i> .-----	102
• Figura 34: Hiperactivación de la vía Hh en el linaje folicular.-----	103
• Figura 35: La vía de EGFR no está alterada en los clones mutantes <i>slmb</i> .-----	103
• Figura 37: Fenotipos causados por la hiperactivación de la vía de Dpp en el linaje somático del ovario.-----	104
• Figura 38: Estudio de marcadores moleculares de la vía de Dpp en folículos con clones <i>slmb</i> .-----	104
• Figura 39: Interacciones de Slmb con componentes y reguladores de los complejos SCF.-----	105
Discusión -----	106-117
• Slmb es necesario en la línea germinal y en el linaje somático del ovario para el desarrollo del ovocito en <i>Drosophila</i> .-----	106
• Slmb es necesario para la regulación del ciclo celular durante el desarrollo del cisto.-----	107
• Slmb es requerido en dos etapas del desarrollo del linaje somático.-----	109
• Las vías de Hh, Wg y EGFR no están alteradas en los clones mutantes <i>slmb</i> .----	111

• Slmb regula la vía de Dpp en el linaje somático del ovario.-----	113
• La proteína co-Smad, Medea, tiene un patrón de expresión dinámico durante la ovogénesis.-----	115
• Slmb regula los niveles de Medea en el epitelio folicular.-----	116
Conclusiones. -----	118
IV- Conclusión final -----	e/118-9
V- Materiales y métodos. -----	119-128
1- Materiales y Métodos utilizados en los experimentos del Capítulo I-----	119
2- Materiales y Métodos utilizados en los experimentos del Capítulo II-----	123
VI- Bibliografía. -----	129-139
VII- Apéndice -----	140-149

I- INTRODUCCIÓN

La degradación mediada por el sistema ubiquitina/proteasoma cumple un rol central en muchos procesos celulares, ya que no sólo degrada proteínas defectuosas o mal plegadas, sino que provee un mecanismo de control preciso de la vida media de factores cuyos niveles son críticos para la adecuada proliferación, diferenciación y homeostasis celular. Las proteínas que son degradadas en el proteasoma de 26S se marcan con una cadena de poli-ubiquitina, sintetizada por acción secuencial de las enzimas E1, E2 y E3. En la mayoría de los organismos existe una única enzima E1, un número acotado pero significativo de enzimas E2 y una amplia variedad de E3 ligasas, lo que otorga exquisita especificidad al proceso de ubiquitinación.

1. La vía de degradación ubiquitina/proteasoma

En el año 1980, Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose, describieron por primera la degradación de proteínas mediada por ubiquitina, en una serie de experimentos bioquímicos pioneros, publicados en el *Proceedings of the National Academy of Sciences* [2-4]. Por la relevancia de este trabajo, los autores recibieron el Premio Nobel de Química, en el año 2004 [5].

Avram Hershko comenzó a interesarse por los mecanismos que median la degradación proteica, cuando realizaba su postdoctorado en el laboratorio de Gordon Tomkins, en el año 1969. Estudiando la regulación de la enzima Tirosin-amino-transferasa en cultivos de hepatocitos, encontró que su degradación era completamente suprimida cuando se agregaban al medio inhibidores de la síntesis de ATP. Este resultado fue sorprendente, ya que sugería que un proceso que *a priori* debería ser exergónico, requería de energía para llevarse a cabo [6]. Al regresar a Israel en 1971, Hershko estableció su grupo en el Instituto Technion, en la ciudad de Haifa y comenzó a estudiar la degradación de proteínas dependiente de energía, mediante técnicas de fraccionamiento celular y reconstitución, utilizando extractos de reticulocitos de conejo [7]. Por aquellos días, Aaron Ciechanover se sumó a su grupo como estudiante doctoral y realizó la puesta a punto del sistema experimental que los llevaría a dilucidar un nuevo mecanismo de degradación proteica [7]. Entre 1978 y 1979, Hershko pasó un año sabático en el laboratorio de Irwin Rose, comenzando allí una importante colaboración. Luego de años de trabajo, los experimentos realizados por Ciechanover, Hershko y Rose revelaron que muchas de las

proteínas celulares destinadas a degradación están covalentemente unidas a un polipéptido pequeño, de 9 kDalton, al que llamaron ATP-dependent Proteolysis Factor 1 (APF-1, luego renombrado ubiquitina, Fig. 1A). Realizando experimentos en extractos libres de células, observaron que la proteína APF-1 se conjugaba a los sustratos exógenos lisozima y globina, en reacciones dependientes de ATP. La resistencia de los conjugados al tratamiento con ácido, hidroxilamina, SDS o álcali dió la clave de que dicha unión era de naturaleza isopeptídica [8]. Finalmente, analizando extractos celulares por SDS-PAGE, encontraron que la estequiometría de la conjugación era variable, pudiéndose observar cantidades crecientes de APF-1 unidas a una sola molécula de sustrato (Fig. 1B).

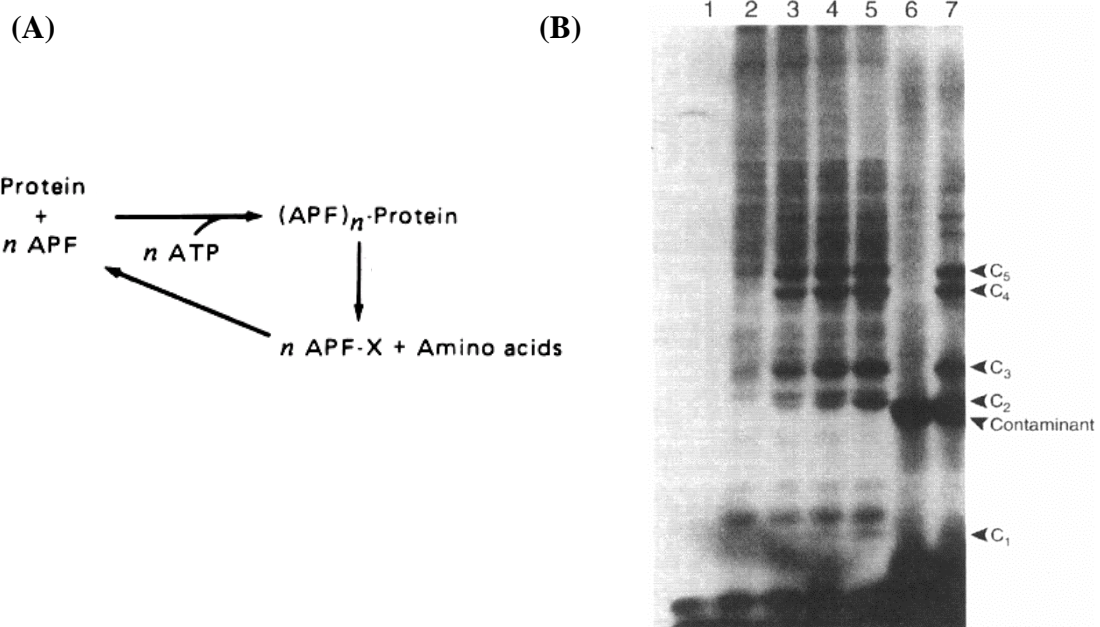


FIGURA 1: Formación de conjugados de APF-Ubiquitina. (A) modelo original postulado para la conjugación de APF-1 (luego ubiquitina) a una proteína blanco. La unión covalente de APF-1 a un sustrato es un proceso dependiente de energía y provoca la degradación proteolítica de las proteínas marcadas con éste péptido. Una vez liberado, el péptido APF-1 puede ser utilizado en una nueva reacción de conjugación (B) Conjugados APF-lisozima analizados por SDS-PAGE. El experimento consistió en separar el extracto de reticulocitos en dos fracciones crudas, en columnas de DEAE-celulosa: la Fracción I (FI) es no adsorbida mientras que la Fracción II (FII) contiene a las proteínas adsorbidas y eluidas con alta sal. Calle 1, ¹²⁵I-APF incubada con la FI en ausencia de ATP; la ubiquitina libre migra en el frente. Calles 2-5, ¹²⁵I-APF incubada con la FI, en presencia de ATP. Calle 2, la ubiquitina queda unida a varios derivados de alto peso molecular, presumiblemente sustratos endógenos. Calles 3-5, aparición de nuevas bandas proteicas (C1-C5), que se incrementan a concentraciones crecientes de lisozima. Calles 6-7, incubación de ¹²⁵I-Lisozima con la FII, en ausencia (6) o presencia (7) de ATP y APF frío. Las bandas C1-C5 contienen ¹²⁵I-lisozima con un número creciente de moléculas de APF-ubiquitina unidas covalentemente.

Basándose en estos resultados, Hershko, Ciechanover y Rose, propusieron que la unión de varias moléculas de APF-1 a una proteína blanco, actuaría como señal para que la

misma sea reconocida y degradada por una proteasa específica [3]. Poco tiempo después, Wilkinson y colaboradores encontraron que APF-1 era idéntica a una proteína llamada Ubiquitina [9], aislada de extractos de timo bovino por Goldstein y colaboradores y encontrada luego en numerosos organismos y tipos celulares [10]. APF-1 es conocida hoy como Ubiquitina, haciendo referencia a su distribución ubicua y al alto grado de conservación en organismos eucariotas.

Habiendo descripto la conjugación de ubiquitina a proteínas blanco, el grupo de Hershko se propuso encontrar a las enzimas responsables de esta reacción, empleando nuevamente un abordaje bioquímico. En los diez años siguientes, éste y otros laboratorios descubrieron y caracterizaron varios aspectos de las tres familias de enzimas requeridas para la reacción de ubiquitinación, a las que llamaron **E1**, **E2** y **E3** [11, 12]. Por otro lado, la “proteasa” responsable del reconocimiento y degradación de las proteínas multi-ubiquitinadas fue descubierta por Rechsteiner y colegas [13], quienes encontraron que se trataba de un gran complejo proteolítico ATP-dependiente, con un coeficiente de sedimentación de 26S, conocido hoy como **Proteasoma** [14]. Actualmente se sabe que la degradación de proteínas por la vía de la ubiquitina involucra dos etapas consecutivas: 1) la síntesis de una cadena de poliubiquitina sobre la proteína blanco, por acción secuencial de las enzimas E1, E2 y E3 y 2) el reconocimiento y la degradación de dicha proteína en el proteasoma de 26S (Fig. 2) [15-17].

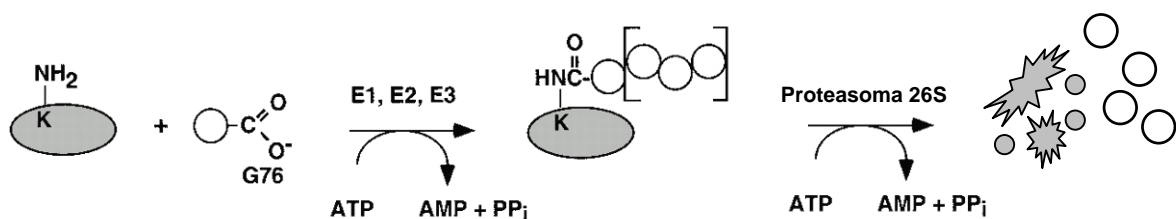


Figura 2: Vía proteolítica ubiquitina/proteasoma. La proteína blanco es ubiquitinada en una lisina específica (K) por acción de la cascada enzimática E1-E2-E3, en una reacción dependiente de energía. La cadena de poliubiquitina sintetizada sobre el sustrato actúa como señal para su reconocimiento y degradación en el proteasoma de 26S. La ubiquitina está simbolizada como un círculo vacío (Figura adaptada de Pikart [17]).

1.1. El proteasoma de 26S

El proteasoma de 26S es una proteasa multicatalítica de aproximadamente 2,5 Mda, que reconoce y degrada proteínas que han sido etiquetadas con una cadena de poliubiquitina [18]. Esta megaproteasa está constituida por dos subunidades complejas: un núcleo catalítico con coeficiente de sedimentación de 20S y una partícula reguladora de 19S (Fig. 3A). El núcleo de 20S está compuesto por cuatro anillos apilados, dos externos α y dos internos β , que tienen a su vez siete subunidades cada uno ($\alpha 1...7$; $\beta 1...7$). Este arreglo resulta en una estructura $\alpha_7\beta_7 \beta_7\alpha_7$ con forma de barril hueco, que alberga en su interior una “cámara proteolítica” (Fig.3B). La actividad catalítica de dicha "cámara" reside en tres de las siete sub-unidades que forman el anillo β . Por microscopía electrónica, se ha observado que el barril de 20S está cubierto en uno de sus extremos, o en ambos, por una partícula de 19S, que regula la actividad del proteasoma (Fig. 3A).

La partícula reguladora de 19S está formada por dos sub-complejos proteicos: una “base” con 6 ATPasas (Rpt1-6) y tres proteínas adicionales (Rpn1, -2 y -10) y una “tapa” (lid) con forma de disco, constituida por 8 subunidades, las proteínas Rpn3, -5, -6, -7, -8, -9, -11 y -12 (Fig. 3B). Si bien el núcleo de 20S es capaz de hidrolizar péptidos pequeños y algunas proteínas mal plegadas, se ha demostrado que no es capaz de degradar sustratos marcados con cadenas de ubiquitina. La partícula de 19S reconoce a los sustratos poliubiquitinados a través de su subunidad Rpn10, los despliega con su actividad de chaperona e induce la formación de un canal en los anillos α de la partícula 20S, promoviendo el acceso de los sustratos a la “cámara proteolítica” (Fig. 3C). Tanto el proceso de desplegamiento de la proteína sustrato como la apertura del canal de translocación requieren energía metabólica, que es proporcionada por las ATPasas de la partícula de 19S.

Es importante destacar que la mayor parte de las proteínas que conforman el proteasoma exhiben más de un 40% de identidad entre levaduras y humanos, mientras que algunos componentes clave, como las ATPasas de la subunidad 19S, presentan de un 70% a un 80% de identidad. Se ha demostrado además, que la mayoría de las subunidades están conservadas funcionalmente en los organismos eucariotas, pudiendo complementarse mutantes letales de levaduras con los genes ortólogos humanos.

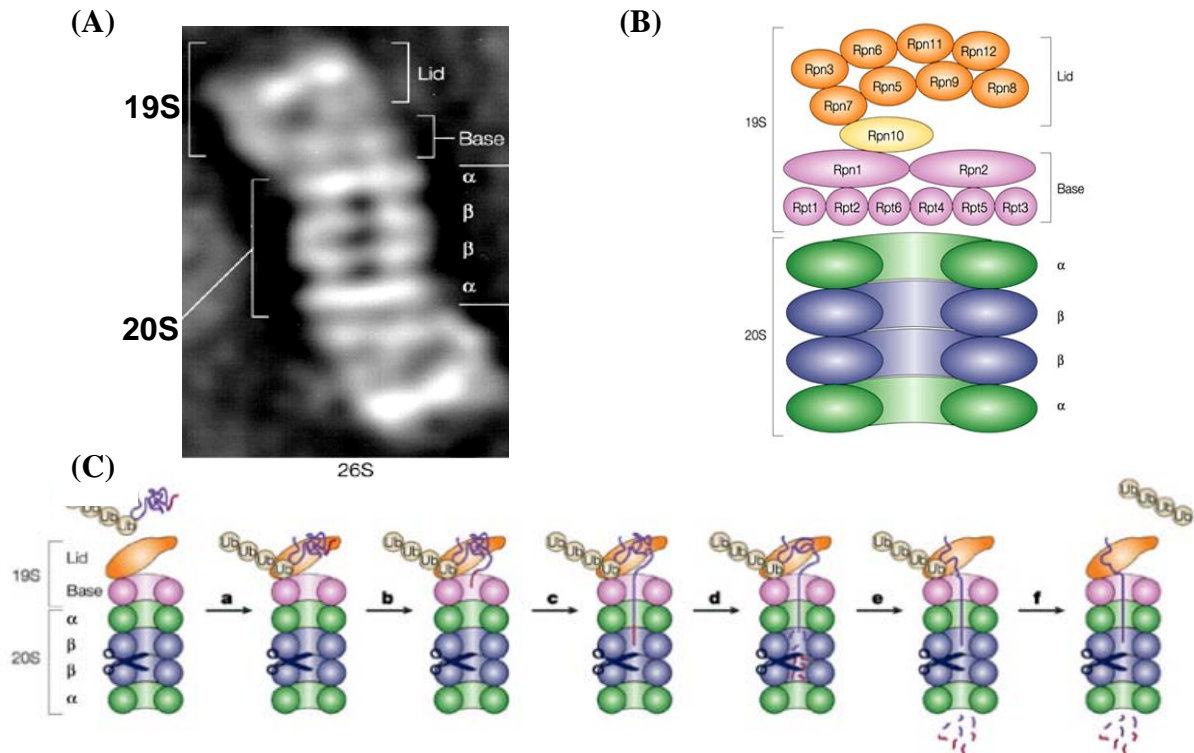


Figura 3: El proteasoma eucariota de 26S. **(A)** Microscopía electrónica del proteasoma de *S.cerevisiae*. En esta fotografía puede distinguirse la subunidad de 20S, formada por dos anillos α y dos anillos β y las subunidades de 19S, constituidas por una base y una tapa. **(B)** Diagrama que muestra las proteínas que integran a las subunidades de 19S y de 20S del proteasoma. Rpt= partículas regulatorias ATPasa; Rpn= partículas regulatorias no-ATPasa. Los anillos α y β de la subunidad de 20S forman la cámara proteolítica del proteasoma **(C)** Esquema del reconocimiento y degradación de sustratos en el proteasoma. La subunidad Rpn10 de la partícula de 19S reconoce la cadena de poliubiquitina presente en el sustrato. El desplegamiento y la translocación del sustrato a través del poro requieren de la hidrólisis de ATP. El sustrato transita hacia la cámara proteolítica, donde va a ser degradado por dos proteínas que forman parte de los anillos β (representadas como una tijera). La cadena de poliubiquitina se libera y es reciclada (Figuras adaptadas de Pickart et al. [18]).

1.2. La ubiquitina

La ubiquitina es una proteína pequeña, de 76 aminoácidos, que se encuentra ampliamente distribuida y conservada en todos los organismos eucariotas [10, 19]. Por mucho tiempo se pensó que la ubiquitinación de un sustrato conducía indefectiblemente a su degradación en el proteasoma. Durante los últimos quince años, sin embargo, se han ido acumulando "excepciones" a esta regla, conociéndose hoy en día distintos procesos celulares "no canónicos" en los cuales esta molécula se encuentra involucrada [16]. Ejemplos de ello son el requerimiento de ubiquitina para la endocitosis de receptores y proteínas de membrana [20-22], la regulación de la funcionalidad ribosomal [23], la reparación post-replicativa del ADN [24] y para cambios en la localización subcelular de factores de transcripción [25]. A pesar de la diversidad de procesos que están regulados por

ubiquitina, se sabe que la maquinaria celular responsable de llevar a cabo la reacción de ubiquitinación es en todos los casos la misma: la cascada enzimática E1, E2, E3.

1.3. La maquinaria de ubiquitinación E1, E2, E3.

La conjugación de la molécula de ubiquitina a una proteína blanco involucra la acción secuencial de tres enzimas: una enzima **activadora de ubiquitina (E1)**, una enzima **conjugadora de ubiquitina (E2 o Ubc)** y una **ubiquitín-proteín ligasa (E3)**, que cataliza la transferencia final de la ubiquitina al sustrato. En el primer paso de esta cascada, la enzima **E1** activa a la ubiquitina en una reacción dependiente de ATP, para formar un intermediario tiol-éster de alta energía, E1-S~Ub (Fig. 4). En el segundo paso, la ubiquitina activada se transfiere a una cisteína presente en el sitio activo de la enzima E2, formando el segundo intermediario, E2-S~Ub (Fig. 4). En el último paso de la cascada, la E3 ubiquitín ligasa cataliza la transferencia de la ubiquitina a una Lisina específica de la proteína blanco (Fig. 4). La reiteración de este proceso sobre un mismo sustrato, genera una cadena de poliubiquitina que marca a dicha proteína para su degradación en el proteasoma de 26S (Fig. 4). Si bien la ubiquitina puede actuar como señal en distintos procesos celulares, se ha demostrado que sólo aquellos sustratos que llevan un polímero de al menos cuatro ubiquitinas unidas entre sí por puentes isopeptídicos Lisina48-Glicina76 son eficientemente reconocidos por el proteasoma [26, 27]. Contrariamente, la unión de una sola ubiquitina al sustrato, o la polimerización entre las Lisina 48 y 63 de las moléculas de ubiquitina, regulan una variedad de procesos celulares que no involucran degradación proteasomal, como por ejemplo la endocitosis de receptores de membrana y la reparación post-replicativa del ADN, entre otros [16]. Estas observaciones ponen en evidencia que la topología de la cadena de ubiquitinas juega un papel central en la especificidad de este mecanismo de señalización.

1.3.1. La enzima activadora de ubiquitina, E1.

En la mayoría de los organismos, existe una única enzima E1 que activa la ubiquitina en todos los procesos celulares en los cuales esta molécula es requerida. La química de esta activación ha sido bien estudiada [28]: la reacción comienza con el pegado secuencial de Mg.ATP y ubiquitina a la enzima E1, formándose un intermediario

ubiquitín-adenilato. Luego, la E1 utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para generar una unión tiol-éster entre la Glicina C-terminal de la ubiquitina y una Cisteína presente en su sitio activo [11]. Este proceso es rápido y eficiente y conduce a la formación de un intermediario E1-Ub de alta energía, que servirá como donador de ubiquitina en la próxima reacción enzimática de la cascada.

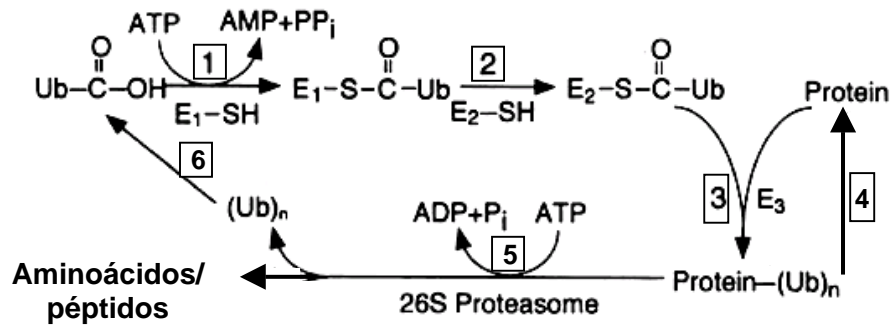


Fig. 4: La cascada de ubiquitinación E1-E2-E3. **(1)** La enzima E1 activa a la molécula de ubiquitina en una reacción dependiente de ATP, formando un intermediario E1-Ub de alta energía. **(2)** La ubiquitina activada es trans-esterificada a una cisteína presente en el sitio activo de la enzima E2. **(3)** En un tercer paso, la E3 ligasa cataliza la conjugación específica de la ubiquitina a la proteína sustrato. **(4)** La reiteración de este proceso genera una cadena de poliubiquitina sobre el sustrato, promoviendo la degradación del mismo en el proteasoma de 26S, proceso que también requiere de energía metabólica **(5)**. **(6)** Las moléculas de ubiquitina son liberadas por el proteasoma y pueden ser utilizadas en nuevas reacciones de ubiquitinación.

1.3.2. Enzimas conjugadoras de ubiquitina, E2.

En el segundo paso de la cascada, la ubiquitina activada se transfiere desde la enzima E1 a una **enzima conjugadora de ubiquitina, E2**. En esta etapa comienza la diversificación de la vía, ya que se han descrito entre 10 y 20 enzimas conjugadoras de ubiquitina en la mayoría de los organismos. La estructura de estas enzimas ha sido bien estudiada [17]: todas las E2 comparten un dominio conservado de ~150 aminoácidos, con una cisteína capaz de conjugarse a la molécula de ubiquitina activada. Es también este dominio el que reconoce a la enzima E1, mientras que el motivo denominado Ubc, es el que se une a la E3-ligasa. A su vez, algunas enzimas E2 presentan extensiones N- o C-

terminales que no están conservadas entre miembros de la familia y que les otorgan especificidad en la interacción con un grupo particular de E3 ligasas. Consistente con esto, se ha visto que la mutación de algunas E2 provoca fenotipos característicos, sugiriendo que su función no es reemplazable ni redundante. Un ejemplo de esto es el de la enzima UbcD1 de *Drosophila*, que está involucrada particularmente en el desprendimiento de los telómeros durante la meiosis y la mitosis [29]. Por otro lado, la E2 de levaduras Cdc34 es requerida para la progresión del ciclo celular, ya que promueve la degradación del inhibidor de ciclina dependiente de quinasa, Sic1 [30]. Actualmente es aceptado que esta especificidad de función refleja la capacidad de las E2 de unirse a enzimas E3 determinadas, ya que son estas últimas las enzimas encargadas de reclutar el sustrato a la maquinaria de ubiquitinación. Un número significativo de enzimas E2 han sido identificadas en distintos organismos; tanto el genoma de *S. cerevisiae* como el de *Drosophila melanogaster*, codifican al menos 11 proteínas conjugadoras de ubiquitina, mientras que son más de 20 los genes de enzimas E2, predichos en el genoma humano.

1.3.3. E3 ubiquitín-ligasas: una familia diversa.

En el último paso de la cascada, las **E3 ubiquitín ligasas** promueven la transferencia de ubiquitina activada al grupo ϵ -amino de una lisina específica de la proteína blanco. Son estas enzimas las que otorgan exquisita especificidad al sistema, ya que por un lado se unen específicamente a enzimas E2 determinadas, mientras que por otro lado reconocen señales en las proteínas blanco, reclutándolas en forma selectiva a la maquinaria de ubiquitinación. En muchos casos, las E3 funcionan como *andamio estructural*, posicionando a la enzima E2 y al sustrato de manera de optimizar la transferencia directa de la molécula de ubiquitina. Otras E3 ligasas cumplen un *rol catalítico*, ya que unen covalentemente a la molécula de ubiquitina a su sitio activo y luego la conjugan al sustrato. A pesar de la enorme divergencia que muestran las E3-ubiquitín ligasas, estas enzimas se han clasificado en dos grandes familias, en base a la presencia de motivos proteicos en común: 1) las HECT-E3 ligasas, que presentan el dominio catalítico HECT y 2) las RING-E3 ligasas, enzimas cuyo dominio catalítico comprende el motivo llamado RING *finger* [17]. Recientemente se ha descrito una nueva variante de E3 ligasas, denominadas **E4 poli-ubiquitín ligasas** [31], que presentan una versión modificada del dominio RING, llamado U-box [32]. Estas enzimas tienen la capacidad de adicionar moléculas de

ubiquitina sobre proteínas mono-ubiquitinadas o sobre cadenas de ubiquitina preformadas, razón por la cual se las ha propuesto como **elongasas de ubiquitina** [33, 34]. A continuación, se describen las características más importantes de las dos principales familias de E3 ligasas:

- **HECT-E3 ligasas**

Cuando se infectan células humanas en cultivo con el virus HPV-16/18 (Human Papillomavirus tipo 16 o 18), la proteína celular p53 es rápidamente degradada en el proteasoma, provocando la desregulación del ciclo celular y la eventual formación de tumores. Análisis bioquímicos demostraron que este proceso es dependiente del reconocimiento de p53 por la proteína viral E6 y por una proteína celular llamada E6-AP (E6-associated protein) [35]. Estudios posteriores demostraron que E6 y E6-AP pueden unirse y formar un heterodímero con actividad E3 ligasa, que reconoce y ubiquitina específicamente a p53 [36]. A partir de la secuencia C-terminal de E6-AP, se ha definido una familia de E3 ubiquitín-ligasas, que comparten el motivo denominado **HECT** (Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus). El motivo HECT es una secuencia de ~350 aminoácidos que contiene una cisteína muy conservada, capaz de formar una unión tiol-éster con la molécula de ubiquitina [37]. La estructura de las E3-HECT es modular: el dominio N-terminal de cada miembro de esta familia es variable y está implicado en la interacción específica con el sustrato; el dominio C-terminal (HECT) es requerido para la interacción con las E2 y para la química de la ubiquitinación. Consistente con esto, el dominio HECT aislado se une fuertemente a la enzima E2, mientras que su delección no impide la unión de la proteína E3 al sustrato [38-40]. Las HECT-E3 ligasas funcionan principalmente como enzimas monoméricas, que transfieren la ubiquitina conjugada desde su sitio activo a la proteína blanco. Algunas de las HECT-E3 conocidas son Smurf, que funciona como regulador negativo de la vía de Dpp/TGF- β [41]; Nedd4, ligasa que promueve la internalización y degradación del receptor Notch [42] e Hyperplastic discs, enzima de *Drosophila* involucrada en la regulación de las vías Dpp/TGF- β y Hedgehog durante la diferenciación de los fotorreceptores del ojo [43, 44].

no ha sido aún esclarecido. Algunas evidencias provienen del análisis estructural de c-Cbl, una E3 ligasa que reconoce receptores tirosina-quinasa activados [54]. La estructura cristalina de c-Cbl unida a la E2 UbcH7 y a un péptido sustrato, reveló que el dominio RING *finger* de la enzima E3 se une a la enzima E2 y orienta su sitio activo hacia la molécula de sustrato, enfrentándolo con la región que contiene la lisina a ser ubiquitinada [55]. En base a ésta y otras evidencias, se ha sugerido que las RING-E3 ligasas funcionarían como andamio estructural, posicionando de manera óptima a la enzima E2 con el sustrato, para promover la transferencia directa de la molécula de ubiquitina [55].

Dentro de la familia de RING-E3 ligasas existen dos grandes grupos: las RING-E3 monoméricas (Fig. 6A) y las RING-E3 multiméricas (Fig.6B,C). Ciertos miembros de la esta familia, como c-Cbl [54], Mdm2 [56-58], E3 α [59, 60] y Parkin [61] son monómeros u homodímeros que contienen tanto al motivo RING *finger* como el dominio de unión al sustrato, en la misma molécula. Otras E3 ligasas forman complejos multiproteicos, entre los que se encuentran el complejo APC/C (Anaphase Promoting Complex/Ciclosoma), responsable de la degradación de reguladores del ciclo celular durante la anafase [62], el complejo VCB-Cul2-Ring (Von-Hippel Lindau, Elongina B y C), involucrado en la degradación del factor inducible por hipoxia HIF1- α [60, 63, 64] y los complejos SCF (Skp, Cullin/Cdc53, F-box), responsables de la degradación de diversos sustratos fosforilados, incluyendo efectores de diversas vías de señalización (Fig. 6B) [65]. Las RING-E3 ligasas multiméricas presentan una estructura característica y en todos los casos, la actividad catalítica del complejo reside en una subunidad, que presenta el motivo RING-H2: la proteína llamada Apc11, en el complejo APC/C y la proteína Rbx1, en los complejos VCB y SCF.

Dado que este trabajo de tesis se centrará en la caracterización y el estudio funcional de un complejo SCF en *Drosophila melanogaster*, las características más sobresalientes de este grupo de RING-E3-ligasas se describirán en detalle en el Capítulo I.

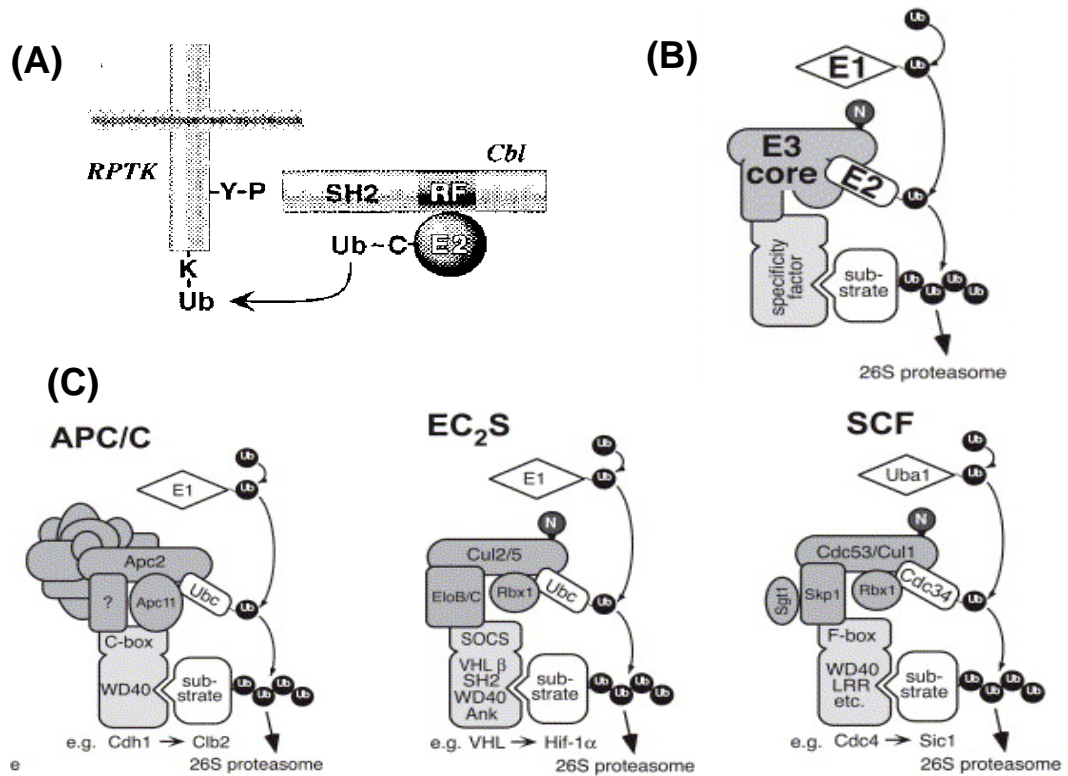


Figura 6: RING-E3 ligasas. Esta familia de E3 ligasas está formada por enzimas monoméricas (A), que tienen el motivo catalítico RING (responsable de la interacción con la enzima E2) y el sitio de unión al sustrato en la misma molécula y por enzimas multiméricas (B), cuya estructura básica es homóloga. Estas enzimas presentan un núcleo invariante (core) que interacciona con la enzima E2, siendo responsable de la actividad catalítica del complejo a través del motivo RING-H2. Por otro lado, todas tienen una subunidad variable, involucrada en el reclutamiento específico del sustrato a la maquinaria de ubiquitinación. (C) Los complejos E3 ligasa mejor caracterizados son el complejo APC/C, que incluye a la proteína RING-H2, Apc11 y los complejos EC₂S/VCB y SCF, cuya actividad catalítica reside en la subunidad RING-H2, Rbx1 (Figura adaptada de Willerms *et al* [65]).

2. Ubiquitinación y patogénesis

Teniendo en cuenta la cantidad de sustratos y procesos que se encuentran regulados por la vía ubiquitina/proteasoma, no es sorprendente encontrar que alteraciones en este sistema conducen a desórdenes metabólicos, o están asociados a la patogénesis de muchas enfermedades. Si bien la existencia de una única enzima E1 activadora de ubiquitina resulta en la letalidad de los individuos que portan esta mutación en homocigosis, mutaciones que afectan a otros elementos de esta vía pueden ser viables, provocando alteraciones más o menos pleiotrópicas, dependiendo de su jerarquía dentro de la cascada de ubiquitinación y degradación proteasomal. Los estados de patogenia asociados al

sistema de la ubiquitina, han sido asociados a dos causas principales: 1) a mutaciones en componentes de la maquinaria de ubiquitinación o en las proteínas sustrato que impiden la degradación, resultando en la **estabilización** de dichos factores o 2) a defectos que provocan degradación excesiva y anormal de las proteínas blanco, conduciendo a la **depleción** de importantes factores celulares.

En humanos se han descripto numerosos ejemplos de patogenicia; en general, muchos tipos de cáncer pueden tener su origen en la estabilización de oncoproteínas y factores que promueven crecimiento celular (ej. N-myc, c-myc, c-fos, Src, Epidermal Growth Factor Receptor, etc) o en la desestabilización de factores que actúan como supresores de tumores (ej. p53 y p27) [16]. Otras patologías asociadas a la vía de la ubiquitina incluyen malformaciones durante el desarrollo, como el Síndrome de Angelman, caracterizado por retardo mental de los pacientes. Este síndrome se origina por la mutación de la E3 ligasa E6-AP y la consecuente estabilización de un sustrato, aún no identificado, que altera el desarrollo normal del cerebro [66]. Por otro lado, numerosas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Huntington, Alzheimer y algunas distrofias musculares, también son causa de alteraciones en la vía de ubiquitina/proteasoma. Se encontró que la mutación del gen que codifica la RING-E3 ligasa, Parkin, se asocia al Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo, una de las formas familiares más comunes de esta enfermedad [67].

En resumen, la gran variedad de procesos en los que ha sido involucrada la vía ubiquitina/proteasoma desde que se describieron los primeros aspectos de esta maquinaria celular, permite inferir la enorme importancia que tendrá el estudio de esta área de la biología celular en los próximos años, así como también la variedad de procesos celulares y patologías que podrán ser comprendidos a nivel molecular.

II- CAPITULO I

**Identificación y caracterización de los complejos
SCF en *Drosophila melanogaster***

1. Descubrimiento de los complejos SCF

Los complejos SCF (Skp1-Cullin1-F-box) son un sub-grupo de RING-E3 ligasas multiméricas, que se encuentran involucradas en una amplia variedad de procesos celulares, como transducción de señales, regulación de la expresión génica y ciclo celular [65]. Estos complejos están formados por un núcleo constante de tres proteínas- Skp1, Cullin1/Cdc53 y Rbx1/Hrt1- y un cuarto componente variable, la proteína con el motivo F-box, que media el reconocimiento específico del sustrato.

Los complejos SCF fueron inicialmente caracterizados a partir de estudios del ciclo celular, realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Realizando experimentos genéticos, Schwob y colaboradores observaron que a temperaturas restrictivas, las cepas mutantes termosensibles *cdc4*, *cdc34* y *cdc53* (*cdc* por *cell division cycle*) se arrestaban en la fase G1 del ciclo celular, ya que no podían degradar al inhibidor de ciclina dependiente de quinasa, Sic1. Observaron que dicho factor, que normalmente se degrada durante la transición G1-S del ciclo, se estabilizaba indefinidamente en estas mutantes, impidiendo su transición a la fase S [68]. Unos años antes, se había descrito que la proteína codificada por el gen *cdc34* presentaba homología con la enzima conjugadora de ubiquitina Rad6 y que era capaz de promover la ubiquitinación *in vitro* de las histonas H2A y H2B [69]. Teniendo en cuenta estas evidencias, Schwob y col. propusieron que Cdc34 promovía la degradación de Sic1 por la vía de la ubiquitina y que esta era la razón por la cual el inhibidor se estabilizaba en los mutantes *cdc34*.

A estas evidencias se sumaron las obtenidas en 1997 por Bai y colegas, quienes describieron una nueva mutación, *skp1^{ts}*, que presentaba el mismo fenotipo de arresto en fase G1 y de estabilización de Sic1 que los mutantes *cdc*. En este trabajo, los autores demostraron que la sobre-expresión de Skp1 podía revertir el arresto celular del mutante

cdc4^{ts} y probaron que existía interacción directa entre Skp1 y Cdc4. Mas interesante aún, encontraron que Cdc4 presentaba una secuencia aminoacídica conservada con dos proteínas previamente descritas, CiclinaF y Skp2, y que dicha secuencia era la que mediaba la interacción con Skp1. Este motivo proteico fue denominado F-box, haciendo referencia a su presencia en la Ciclina F. En base a estos resultados y a las evidencias previas, Bai y col. propusieron un modelo en el cual Skp1 actuaría como componente central de un complejo E3 ligasa, reclutando a sus sustratos directamente, o a través de las proteínas con motivo F-box [70].

Si bien estos autores sugirieron por primera vez la existencia de un “complejo E3 ligasa” que incluía a Skp1 y a Cdc4, no existían aún evidencias bioquímicas que confirmaran esta idea, ni podía inferirse un rol para Cdc53 (llamada también Cullin1) en el proceso de ubiquitinación. Los experimentos clave que confirmaron y terminaron de completar el modelo propuesto por Bai y col. fueron realizados por los grupos de Deshaies y Harper: utilizando extractos crudos de levaduras, demostraron que se requería la actividad de Cdc34 y de Cdc4, para que la proteína Sic1 fuera ubiquitinada [30]. Por otro lado, en dos trabajos publicados simultáneamente, Feldman [71] y Skowyra [72] demostraron que Cdc4, Cdc53 y Skp1 se ensamblaban en un complejo que presentaba actividad de ubiquitín ligasa sobre Sic1 y que dicha actividad era dependiente de la enzima conjugadora de ubiquitina, Cdc34. Estos autores propusieron el nombre de “Complejos SCF” para esta nueva familia de E3 ligasas, haciendo referencia a los tres componentes caracterizados: Skp1, Cdc53/Cullin1 y la proteína con motivo F-box.

Dos años mas tarde, distintos laboratorios identificaron en levaduras y células de mamíferos a una nueva proteína, Rbx1/Roc1/Hrt1, que resultó ser esencial para la actividad de los complejos SCF [73-76]. Rbx1 fue identificada y aislada como proteína de unión a Cull1 humana en ensayos de doble híbrido de levaduras [75] y formando parte del complejo SCF^{Skp2} purificado de células HeLa [74]. Simultáneamente, su ortólogo en levaduras, Rbx1/Hrt1, fue encontrado como componente específico de los inmunoprecipitados de Skp1 y de Cdc53/Cull1 [76]. Reforzando estas observaciones, se demostró que células mutantes *rbx1/hrt^{ts}* no eran capaces de degradar al inhibidor Sic1, mientras que el agregado de Hrt1 recombinante estimulaba dramáticamente la ubiquitinación *in vitro* de Ciclina1, Ciclina2, Sic1 e IκB [74-78]. El alineamiento de los ortólogos de Rbx1/Hrt1 en distintos organismos reveló que esta proteína se encuentra altamente conservada en los eucariotas. Se presume que por esta razón, Rbx1 no fue

identificada en los estudios iniciales de reconstitución de la actividad ligasa de los complejos SCF [30]. Probablemente, el alto grado de conservación que presenta esta proteína entre los distintos organismos eucariotas posibilitó que el complejo recombinante incorporara a la proteína Rbx1 endógena de las células en donde se realizaron los ensayos de ubiquitinación.

Actualmente se acepta que los complejos SCF están formados por tres subunidades básicas, las proteínas Skp1, Cullin1 y Rbx1 y una cuarta subunidad adaptadora, la proteína con motivo F-box (o “proteína F-box”)[52].

2. Arquitectura de los complejos SCF

Una vez descritos los complejos SCF, el trabajo de numerosos grupos contribuyó a caracterizar distintos aspectos de las proteínas que componen estas E3 ligasas multiméricas. Análisis genéticos y bioquímicos revelaron que dichas proteínas se encuentran muy conservadas entre organismos eucariotas, tanto estructural como funcionalmente. Una evidencia de ello es la posibilidad de complementar a los mutantes de levaduras *cdc53^{ts}*, *skp1* y *hrt1*, con las proteínas humanas hCullin1, hSkp1 y hRbx1, respectivamente, así como también la capacidad de las proteínas humanas de ensamblarse con las subunidades de levaduras, para formar un complejo SCF funcional [70, 72, 75-79]. A continuación se describen algunas características básicas de las subunidades que componen a los complejos SCF.

2.1 La subunidad Skp1

Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1A) [80] es una proteína pequeña, de aproximadamente 160 aminoácidos, involucrada en el reclutamiento de la proteína con motivo F-box al núcleo del complejo SCF. Análisis por delección y comparaciones de secuencias realizadas por distintos grupos revelaron que Skp1 tiene dos dominios estructurales: el N-terminal de 110 aminoácidos, similar a la subunidad ElonginaC del complejo elongador de la transcripción Elongina y un dominio C-terminal, único. En ensayos de doble híbrido, se encontró que los primeros 91 aminoácidos de la proteína Skp1 humana (hSkp1) pueden unirse a hCullin1 [81] y que los fragmentos 37-163 y 1-65 se unen a la proteína F-box, Skp2, con una eficiencia del 15% y 20%, respectivamente, cuando se los compara con la proteína entera [82]. Consistente con esto, diferentes proteínas con

motivo F-box, como así también la proteína Cdc53/Cullin1, pueden unirse a Skp1 cuando son co-expresadas en bacterias o en células de insecto, sugiriendo que las interacciones entre ellas son directas [72, 79, 83]. En conjunto, estos resultados mostraron que el dominio N-terminal de Skp1 contiene el sitio de unión a Cullin1 y que dicho dominio es también el mayor determinante de la unión de la proteína con motivo F-box (Fig. 7A) [82, 84].

2.2 Cullin1, el andamio estructural

La subunidad Cdc53/Cullin1 (Cul1) de los complejos SCF es una proteína de aproximadamente 800 aminoácidos, perteneciente a la así llamada familia de las Cullinas [85]. Las cullinas se caracterizan por la presencia de un dominio globular de ~120 aminoácidos en el extremo C-terminal (Cullin Homology domain, CH) y un dominio N-terminal de ~200 aminoácidos, con una serie de repeticiones de cinco hélices, conocidas como “repeticiones cullina”. Se encontró que el genoma humano codifica al menos seis miembros de esta familia (hCul1, 2, 3, 4A, 4B y 5), mientras que existen cinco componentes en *C.elegans* y tres en *S.cerevisiae*.

Los dominios funcionales de Cul1 se definieron a partir de análisis deleciones realizados en sistemas de levaduras (Fig. 7B). Realizando ensayos de co-inmunoprecipitación, se encontró que Cdc53 Δ 448-748 (una versión de Cdc53/Cul1 que tiene delecionada la secuencia aminoacídica 448 a 748) sigue uniéndose a Skp1 y a la proteína F-box, mientras que la deleción Δ 9-280 impide que Cdc53/Cul1 interactúe tanto con Skp1, como con la subunidad con F-box [86]. Consistente con esto, los primeros 219 aminoácidos de la proteína Cul1 humana tienen la capacidad de unirse a hSkp1 y a la proteína con F-box, Skp2, en ensayos de doble híbrido y de GST *pull-down*. Estos resultados, junto al hecho de que una mutación puntual en el residuo Y133 impide la interacción con Skp1, sugirieron que el extremo N-terminal de Cul1 incluye al sitio de unión a Skp1 y a la subunidad F-box del complejo SCF [81]. Es interesante notar que este dominio es el menos conservado entre todos los miembros de la familia Cullina: en ensayos de doble híbrido, sólo hCul1, y no sus parálogos hCul2-5, pudo unirse a Skp1 [81].

Por otro lado, se ha demostrado que la deleción del dominio N-terminal de Cdc53/Cul1 no impide que esta proteína siga interactuando con Rbx1 y con la enzima

E2, Cdc34 [75, 86], sugiriendo que el sitio de unión para dichos factores se encuentra río abajo del dominio N-terminal. Consistente con esto, la mutante *cdc53-1*, que tiene una mutación puntual dentro del dominio CH (R488C), impide específicamente la interacción de Cdc53 con Cdc34 [86]. Comparaciones de secuencias muestran que el dominio CH está también presente en una de las subunidades del complejo E3 ligasa APC/C, la proteína Apc2 [87]. En base a distintas evidencias, se propuso que este dominio podría constituir el módulo de anclaje de los complejos E3 ligasa a las enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina [87, 88].

Se encontró que la región más distal del dominio C-terminal de Cull1 es la que presenta mayor conservación entre los miembros de la familia Cullina. Estudios de complementación realizados en levaduras revelaron que esta región no es esencial para su función, ya que luego de delecionar los aminoácidos 757-814, hCul1 sigue complementando a la mutante *cdc53^{ts}*, siendo capaz de mediar eficientemente la ubiquitinación de Sic1 *in vitro* [71, 86, 89]. Por otro lado, se encontró que esta misma región sufre una modificación postraduccional, que consiste en la unión covalente de la proteína Rub1/Nedd8 a una lisina presente en el extremo C-terminal [89, 90]. Rub1/Nedd8 es una proteína pequeña, similar a la ubiquitina, que se conjuga a todos los miembros de la familia Cullina, a través de una cascada enzimática homóloga a la “E1-E2-E3” (reacción conocida como neddilación) [91, 92]. Estudios realizados en sistemas de reticulocitos, demostraron que la neddilación de Cull1 aumenta notablemente la actividad ubiquitín ligasa de los complejos SCF [93, 94]. La proximidad del sitio de neddilación en hCul1 con el sitio de unión de Rbx1 (subunidad involucrada en el reclutamiento de la enzima E2), sugiere que esta modificación “modularía” la unión y el posicionamiento de la enzima conjugadora de ubiquitina, haciendo más eficiente la transferencia de la ubiquitina al sustrato [95, 96]. En conjunto, estas evidencias sugieren que si bien el extremo C-terminal no sería esencial para la funcionalidad de Cull1, la neddilación que ocurre en ese dominio incrementaría notablemente la actividad ubiquitín ligasa de los complejos SCF.

2.3 Rbx1, la subunidad catalítica

Rbx1 (RING box protein 1), también llamada Roc1 o Hrt1, es la subunidad del complejo SCF que tiene la actividad catalítica. Rbx1 es una proteína pequeña de 121 aminoácidos, que se encuentran altamente conservada entre organismos eucariotas. Esta

proteína presenta un dominio N-terminal de 54 aa y un dominio C-terminal de 64 aa, que contiene el motivo responsable de la actividad catalítica, el RING-H2.

El análisis de la secuencia del motivo RING-H2 de Rbx1 reveló la presencia de tres cisteínas adicionales, que no se encuentran en el motivo RING canónico (las cisteínas C3, C4 y C5), que tienen la capacidad de coordinar un tercer átomo de Zinc (Fig. 7C). Curiosamente, si bien estos residuos están completamente conservados en todos los homólogos de Rbx1 y de Apc11 (la subunidad RING del complejos APC/C), se encontró que los mismos no son esenciales para su funcionalidad: hRbx1 puede complementar a las mutantes de levaduras *Δhrt1*, aún cuando las cisteínas C3 y C4 fueron mutadas, mientras que la mutación de las estas dos cisteínas en el ortólogo de levaduras, Hrt1, no causa letalidad [77, 78]. Se ha demostrado, sin embargo, que mutaciones en las otras cisteínas o histidinas del dominio RING-H2 anulan la capacidad de Rbx1 de complementar a los mutantes *Δhrt1*, sugiriendo que la integridad del dominio RING “canónico” es esencial para su funcionalidad [73, 75, 77].

Se observó que, a pesar de su pequeño tamaño, Rbx1 puede unirse a la enzima conjugadora de ubiquitina Cdc34, a Cdc53/Cul1 y a distintas proteínas con motivo F-box, como Grr1, Met30 y Cdc4 (Fig. 7D) [77, 78]. Se encontró también, que tanto Rbx1 como su parólogo hRoc2, se unen a todos los miembros de la familia Cullina descritos en humanos (hCul1-hCul5) [75], sugiriendo que el dominio RING-H2 mediaría la interacción con proteínas que presentan el dominio de homología cullina (CH). Consistente con esto, otras E3 ubiquitín ligasas multiméricas, el complejo APC/C y el complejo VCB, presentan la dupla “Cullin-RING” en sus componentes Apc2-Apc11 y Cul2-Rbx1, respectivamente [65].

2.4 La proteína con motivo F-box: el componente variable

El motivo β -transducina, conocido hoy como F-box, fue descrito por Kumar y Paietta en el año 1995, como región de homología entre las proteínas Cdc4, β -TrCP, Met30, Scon2 y MD6 [97]. Sin embargo, su función no fue caracterizada hasta que Bai y col. encontraron que este motivo, conservado en Ciclina F, Cdc4 y Skp2, funcionaba como secuencia de reconocimiento por parte de Skp1, confiriendo al complejo SCF la capacidad de reclutar a distintos sustratos para ser ubiquitinados [70]. La familia de proteínas F-box comparten una secuencia consenso de 45-50 aminoácidos, el motivo F-box, generalmente situada en la mitad N-terminal de la proteína. Se ha observado que este motivo no presenta

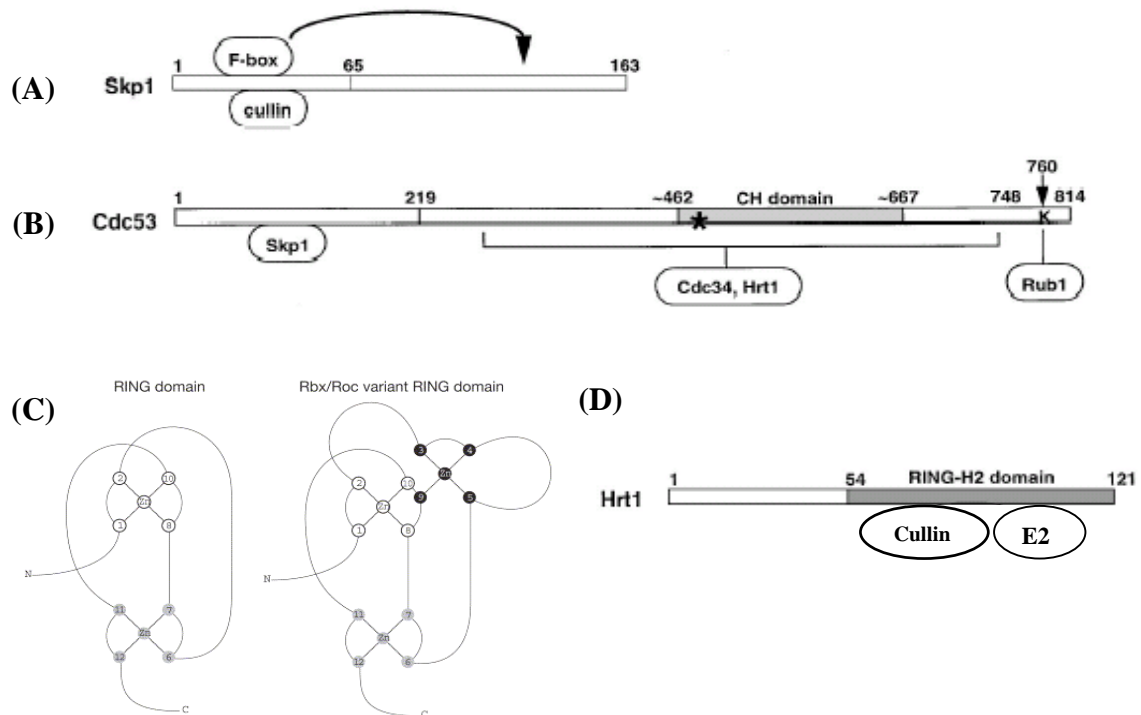


Figura 7: Esquema de las proteínas Skp1 (A), Cdc53/Cul1 (B) y Hrt1/Rbx1 (C-D) mostrando las interacciones con otras proteínas del complejo, inferidas a partir de análisis deleciones e interacciones proteicas [52]. (A) El dominio N-terminal de Skp1 está involucrado en la interacción con Cdc53/Cul1 y con la proteína F-box, si bien la secuencia situada río abajo es necesaria para la estabilización de esta última (flecha) (B) El dominio N-terminal de Cdc53/Cul1 se une a Skp1, mientras que la región de homología cullina (CH) está involucrada en el pegado de Rbx1/Hrt1 y de la enzima E2 (Cdc34), si bien no se probó que la interacción con esta última sea directa. La proteína Rub1/Nedd8 se une a una lisina específica (K), presente en el extremo C-terminal de Cdc53/Cul1. (C) Estructura del dominio canónico RING finger (izquierda) y la variante RING-H2 encontrada en la familia de proteínas Rbx/Apc11 (derecha). El motivo canónico presenta dos sitios de unión de Zinc, mientras que la variante de Rbx1 tiene un tercer sitio de coordinación [65]. (D) El dominio RING-H2 de Rbx1 recluta a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina al complejo E3 ligasa y además media la interacción de Rbx1 con el dominio CH de Cdc53/Cul1.

un consenso estricto, siendo muy pocos los aminoácidos que son invariantes entre las distintas proteínas (Fig. 8A). Por esta razón, se han diseñado distintos algoritmos que permiten identificar proteínas con motivo F-box, a partir de bases de datos de secuencias [98].

Análisis posteriores revelaron que la mayoría de las proteínas F-box tienen asociado un segundo dominio de interacción proteína-proteína, entre los que generalmente se encuentran las repeticiones WD40 (ej. Met30 y Cdc4) y las repeticiones ricas en leucina (LRR, ej. Grr1 y Skp2). Otros miembros de la familia F-box predichos en bases de datos presentan dominios de interacción proteica variados, tales como el *helix-loop-helix* (HLH), los cierres de leucinas, regiones ricas en prolina y el motivo *Src Homology 2* (SH2), entre

otros (Fig. 8B). Fuera de estos dominios, los miembros de la familia F-box no muestran secuencias conservadas y son altamente variables.

Por otro lado, se ha encontrado que las proteínas con motivo F-box se unen específicamente a sustratos fosforilados: estudios de reconstitución de la actividad ubiquitín-ligasa de los complejos SCF, revelaron que la proteína F-box Cdc4 reconoce a Sic1, sólo cuando ese factor ha sido fosforilado por la quinasa CDK-Cln/Cdc28 y que el dominio WD40 es esencial para dicho reconocimiento. De manera similar, la proteína F-box Grr1, se une a las formas fosforiladas de Ciclina1 (Cln1) y Ciclina2 (Cln2), siendo el dominio LRR, en este caso, el que está involucrado en el reconocimiento de estos sustratos [71, 72]. Numerosos trabajos posteriores realizados en sistemas de mamíferos y levaduras confirmaron esta hipótesis [99-103]; actualmente se acepta que las proteínas con F-box actúan como subunidades adaptadoras, reclutando sustratos fosforilados al complejo de ubiquitinación, SCF.

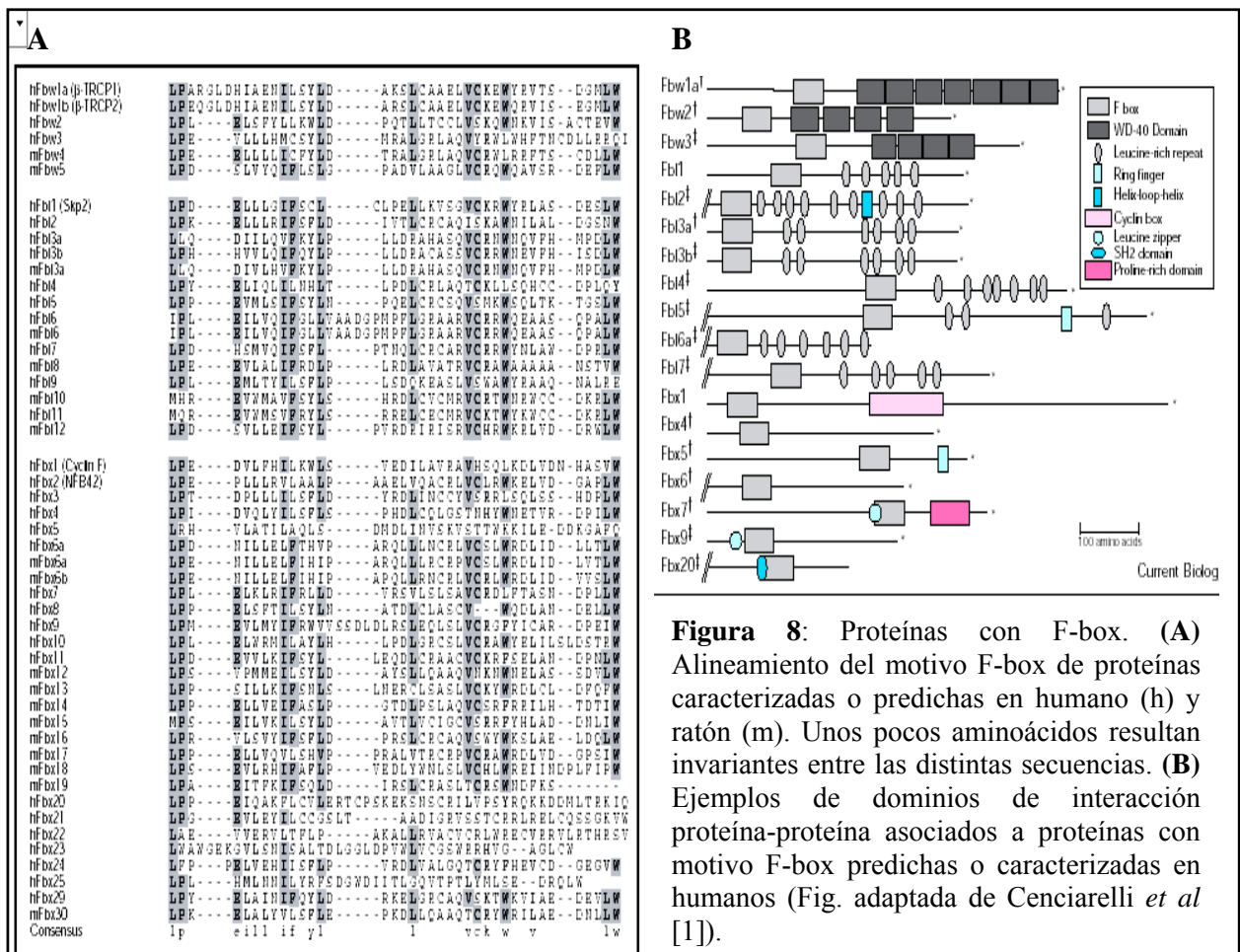


Figura 8: Proteínas con F-box. (A) Alineamiento del motivo F-box de proteínas caracterizadas o predichas en humano (h) y ratón (m). Unos pocos aminoácidos resultan invariantes entre las distintas secuencias. (B) Ejemplos de dominios de interacción proteína-proteína asociados a proteínas con motivo F-box predichas o caracterizadas en humanos (Fig. adaptada de Cenciarelli *et al* [1]).

3. La hipótesis combinatoria y los complejos SCF

Tanto en células de levadura como en sistemas de mamíferos, se han descrito distintos complejos SCF que varían en su componente F-box y que se encuentran involucrados en diferentes procesos celulares. Desde un principio, Skowyra y colaboradores observaron que la proteína F-box Cdc4, formaba un complejo con Cdc53/Cul1 y Skp1 para ubiquitinar a Sic1, mientras que otra proteína con motivo F-box, Grr1, formaba parte de un complejo semejante, capaz de promover la ubiquitinación de Ciclina1 y Ciclina2 pero no la de Sic1 [78]. Por otro lado, el análisis del genoma de diferentes organismos predice la existencia de numerosas proteínas con motivo F-box: en mamíferos (humano y ratón) se encontraron al menos 33 proteínas de esta familia capaces de unirse a Skp1 en ensayos de doble híbrido [104], mientras que la utilización de diferentes algoritmos permite identificar alrededor de 21 proteínas F-box en *S.cerevisiae*, 31 en *Drosophila*, más de 200 en *C.elegans*, 94 en humanos y alrededor de 700 en *Arabidopsis*¹ [65]. Estas observaciones llevaron a proponer la "hipótesis combinatoria de las proteínas con F-box", que postula que diferentes proteínas con este motivo se unirían a Skp1 para formar complejos SCF con distinta especificidad de sustrato [105], ampliando de esta manera el repertorio de factores que pueden ser ubiquitinados y los procesos que pueden ser regulados por los complejos SCF. Con el paso de los años, se han ido encontrando numerosos casos que refuerzan esta hipótesis, tanto en levaduras como en *C.elegans* y mamíferos. A continuación, se ilustran algunos ejemplos:

3.1 Complejos SCF en levaduras

En *S.cerevisiae* se han caracterizado tres complejos SCF: SCF^{Cdc4}, SCF^{Grr1} y SCF^{Met30} (la proteína F-box se anota como superíndice). Si bien cada uno reconoce y promueve la ubiquitinación de sustratos diferentes, sus actividades están relacionadas y todos contribuyen a la progresión normal del ciclo celular (para mayor detalle ver Willems *et al* [65]). El primer complejo descrito, SCF^{Cdc4}, está involucrado en la degradación de inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas (CDK) y otros efectores requeridos para la división mitótica (Fig. 9A). Cuando las células de levadura se acercan al final de la fase G1 del ciclo, las quinasas Cln1-2/Cdc28 incrementan su actividad y fosforilan al inhibidor

¹ La falta de consenso estricto de las F-box hace necesario el uso de algoritmos para su identificación. De acuerdo al algoritmo utilizado puede predecirse un número variable de F-box en los diferentes organismos (ISREC server: http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan; SMART database: <http://smart.embl-heidelberg.de>)

de Cln-Cdc28, Sic1. En fase G1 tardía, Cdc4 reconoce a Sic1 fosforilado y lo recluta al complejo SCF para catalizar su ubiquitinación y consecuente degradación en el proteasoma. La mutación de los sitios de fosforilación de Sic1 conduce a la estabilización de este factor y provoca un fenotipo de arresto en G1, similar al observado en los mutantes *cdc4*. Si bien Sic1 es el primer sustrato caracterizado, se conocen otros factores que son ubiquitinados por el complejo SCF^{Cdc4}: entre ellos Far1, que es inhibidor de las quinasas Cln/Cdc28 necesario para arrestar el ciclo celular ante la señal de feromonas de apareamiento en levaduras. Far1 es, a la vez, fosforilado por sus quinasas blanco (Cln/Cdc28), marcándose así para su ubiquitinación mediada por el complejo SCF^{Cdc4}. También en este caso, la mutación de los sitios de fosforilación de Far1 provoca su estabilización, llevando al arresto en fase G1 en ausencia de feromonas. Otros sustratos conocidos del complejo SCF^{Cdc4} son el activador de la replicación del DNA cromosómico, Cdc6 y el factor de transcripción Gcn4, requerido para la biosíntesis de ciertos aminoácidos en condiciones de privación de nutrientes.

El segundo complejo caracterizado, SCF^{Grr1}, se encuentra involucrado en la degradación de un grupo distinto de moduladores del ciclo celular (Fig. 9B). Durante la fase G1 del ciclo, las Ciclinas 1 y 2 se fosforilan en múltiples sitios, en una reacción autocatalítica, dependiente de Cdc28. Una vez fosforilados, estos factores son reconocidos por la proteína F-box Grr1 y reclutados al complejo SCF, donde son ubiquitinados y marcados para su destrucción en el proteasoma. Degradadas estas ciclinas, la actividad de la quinasa Cln-Cdc28 disminuye, lo que permite la transición a la fase S del ciclo celular. Por otro lado, los factores Gic1 y Gic2, requeridos para la polarización del citoesqueleto de actina durante la gemación, se estabilizan en los mutantes *grr1*. Consistente con esto, se ha demostrado que Gic1 y Gic2 pueden ser ubiquitinados por el complejo SCF^{Grr1} en ensayos bioquímicos [106]. Finalmente, la proteína Grr1 es requerida para la inducción de genes transportadores de glucosa *HTX*, en condiciones de alta glucosa. En este caso, si bien no ha sido aún demostrado, el represor transcripcional de los genes *HTX* es el candidato más probable a ser ubiquitinado y llevado a degradación. Dado que los mutantes *grr1* presentan fenotipos adicionales, como defectos en el transporte de algunos cationes y distintos aminoácidos, se cree que el complejo SCF^{Grr1} estaría involucrado en la degradación de otros factores que regulan la expresión de genes de transporte.

Finalmente, el complejo SCF^{Met30} media la represión transcripcional de varios genes *MET* en respuesta a metionina (Fig. 9C). Bajo condiciones limitantes de metionina,

el factor transcripcional Met4 es reclutado por los complejos Cbf1–Met28 y Met31–Met32 a los promotores *MET*, activando allí la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de este aminoácido. Entre los genes blanco de Met4 se encuentra el que codifica la misma proteína F-box Met30, que actúa como regulador negativo de esta vía en condiciones de exceso de metionina. Los efectos de la ubiquitinación de Met4 son complejos: cuando las levaduras se cultivan en medio mínimo, Met4 se poliubiquitina y se elimina por la vía convencional del proteasoma. En medio rico, Met4 es oligoubiquitinado en forma dependiente de Met30, disociándose de los complejos transcripcionales, pero no resulta degradado en el proteasoma. Bajo esas condiciones, Met4 sigue activando la transcripción de algunos genes blanco, como *SAM1*, que codifica la sintetasa de S-adenosil-metionina (AdoMet), enzima esencial para el crecimiento de las levaduras en medio rico. Este sistema está muy conservado en hongos, encontrándose los ortólogos de Met30, Scon2 y SconB, en *Neurospora crassa* y en *Aspergillus nidulans*, respectivamente. En otro contexto, el complejo SCF^{Met30} actúa como regulador del ciclo celular, ya que durante la transición G2/M, reconoce y marca para degradación a la quinasa Swe1, permitiendo la entrada en mitosis [107].

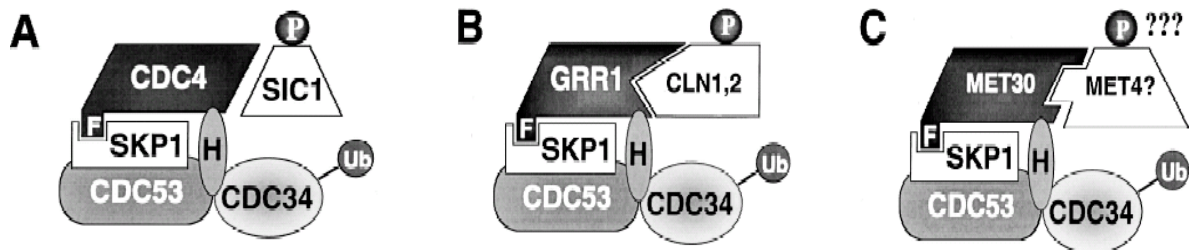


Figura 9: Complejos SCF caracterizados en *Saccharomyces cerevisiae*. (A-C) El complejo SCF^{Cdc4} se encontró involucrado en la ubiquitinación del factor inhibitorio, Sic1; SCF^{Grr1} marca para degradación a las Ciclinas 1 y 2, mientras que SCF^{Met30} regula la expresión de genes inducibles por metionina, probablemente mediando la degradación de Met4. Se ha demostrado que tanto Sic1, como Cln1 y Cln2, deben estar fosforilados para ser reconocidas por la proteína F-box (Figura adaptada de Deshaies, 1999 [52]).

3.2 Complejos SCF en mamíferos

En mamíferos se conocen tres complejos SCF involucrados en la ubiquitinación de diferentes sustratos: el primero en ser caracterizado es el que incluye a la proteína F-box/WD40 β -TrCP (β -Transducin Containing Protein). Estudios realizados en células humanas infectadas con el virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type-1), revelaron que la proteína viral Vpu puede unirse simultáneamente a β -TrCP y al antígeno de membrana CD4, creando un nexo que promueve la ubiquitinación y la consecuente degradación proteasomal de CD4 [108]. CD4 es el principal receptor para el ingreso de este virus a la célula y se cree que su degradación impediría una posible superinfección viral [109]. Por otro lado, la proteína Vpu actúa como regulador negativo de β -TrCP, ya que secuestra a esta proteína en el citoplasma y promueve la acumulación de sus sustratos endógenos, provocando así severas alteraciones en la fisiología celular [110]. El complejo $SCF^{\beta-TrCP}$ se encontró también involucrado en la ubiquitinación y destrucción de la proteína I κ B, cuando ésta ha sido previamente fosforilada por la quinasa IKK. La degradación de I κ B permite que el factor de transcripción NF κ B pueda translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes pro-inflamatorios y de supervivencia celular [111, 112].

Se encontró que β -TrCP reconoce también al factor de transcripción β -catenina, principal efector de la vía Wnt. En ausencia de activación de esta vía, β -catenina es rápidamente fosforilada por la quinasa GSK-3 β , convirtiéndose en un buen sustrato para ser ubiquitinado por el complejo $SCF^{\beta-TrCP}$. Cuando la vía Wnt se activa, la fosforilación de β -catenina es inhibida, de modo que esta proteína puede escapar a la degradación, translocar al núcleo y formar parte de un complejo transcripcional que activa la expresión de genes específicos. Tanto en el caso de Vpu como en el de I κ B y β -catenina, se encontró que el motivo fosforilable reconocido por β -TrCP tiene la secuencia consenso DSGXXS (donde S son las serinas fosforilables) [99]. Recientemente se han reportado nuevos sustratos regulados por el complejo $SCF^{\beta-TrCP}$, entre los que se encuentra ATF-4, factor de transcripción de la familia ATF-CREB bZIP [113], los efectores de la vía de TGF- β , Smad3 y Smad4 [114, 115] y el inhibidor del complejo APC/C, Emi1, que es a su vez una proteína con motivo F-box [102].

El segundo complejo SCF caracterizado en mamíferos, SCF^{Skp2}, cumple distintas funciones en el control del ciclo celular [65]. Entre los sustratos de este complejo se encuentra la proteína E2F1, miembro de la familia de factores de transcripción E2F, que dirige la expresión de diferentes genes durante la transición G1/S, incluyendo la expresión de *ciclinaE* [116]. La degradación de E2F1 depende de la unión de Skp2 a su extremo amino terminal, en un evento que no parece estar mediado por fosforilación sino por la disponibilidad de la proteína F-box Skp2, que presenta un pico máximo de expresión en la fase S del ciclo celular [117]. Por otro lado, la unión de la proteína supresora de tumores pRb a la región N-terminal de E2F1 interfiere con el pegado de Skp2, impidiendo que E2F1 sea ubiquitinada y degradada en el proteasoma [118]. Otro sustrato del complejo SCF^{Skp2} es el inhibidor de CDK p27, cuya degradación es esencial para la entrada en la fase S del ciclo celular [119]. Se ha reportado que el reconocimiento de p27 por parte de Skp2 requiere su previa fosforilación en un único residuo, la Treonina187 [119]. Curiosamente, la mutación de ese residuo estabiliza a p27 en la fase S/G2, pero no en G1, sugiriendo que existen otros factores involucrados en su regulación en las distintas etapas del ciclo celular [120]. El complejo SCF^{Skp2} ha sido también involucrado en la ubiquitinación de otras proteínas requeridas para la transición G1/S: entre ellas se encuentra hOrc1, una subunidad del “complejo de reconocimiento del origen”, que es degradado vía Skp2, asegurando así una sola ronda replicativa del genoma por ciclo celular [121]. Por otro lado, trabajos recientes indican que Skp2 regula la actividad de Myc, un potente factor de transcripción proto-oncogénico que se encuentra estabilizado o sobre-expresado en un 30% de los casos de cáncer humanos [122]. Myc modula la expresión génica, uniéndose a los elementos “E-box” en el DNA; curiosamente, la proteína Skp2 media la degradación proteasomal de Myc, a la vez que actúa como co-factor de Myc, activando la transcripción de sus genes blanco [123].

Finalmente, el tercer complejo caracterizado recientemente en humanos, es el que incluye a la proteína F-box, Fbw7. Este complejo SCF está involucrado en la degradación de un grupo de importantes reguladores celulares, entre los que se encuentran CiclinaE, Notch y nuevamente, Myc. El rol de Fbw7 en la degradación de Ciclina E fue reportado tanto en mamíferos como en levaduras (a través del ortólogo, Cdc4), en donde se encontró que el reconocimiento es dependiente de fosforilación [124]. Por otro lado, si bien mencionamos que Myc es reconocido por la proteína F-box Skp2, se demostró que este factor es también regulado por el complejo SCF^{Fbw7}: es interesante notar que los motivos

fosforilados que reconoce cada una de las proteínas F-box es diferente: mientras que Skp2 parece unirse al motivo MBII y al dominio bHLH de Myc [123, 125], Fbw7 reconoce dos residuos fosforilados en el motivo MB1, cuya mutación tiene efecto oncogénico [126, 127]. Por otro lado, la pérdida simultánea de *skp2* y *fbw7* no estabiliza completamente a Myc, sugiriendo que otras vías de degradación actuarían en conjunto con los complejos SCF para regular la abundancia de esta proteína.

4- *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio de la vía ubiquitina/proteasoma

Si bien muchos de los procesos celulares básicos pueden ser estudiados en sistemas de levaduras o células en cultivo, el estudio de mecanismos que conducen al desarrollo de organismos pluricelulares requieren además un análisis genético.

Drosophila melanogaster, conocida como mosca de la fruta o mosca del vinagre, se ha convertido en uno de los modelos genéticos por excelencia desde que en 1909, el genetista estadounidense Thomas Hunt Morgan comenzó a utilizarla para estudiar las bases de la herencia². Desde entonces, el trabajo con este insecto se ha expandido enormemente, convirtiéndose en uno de los principales organismos utilizados en el área de la genética y la biología del desarrollo. El genoma de la mosca presenta un tamaño muy apropiado para el trabajo genético³: tiene cuatro cromosomas -3 autosomas y el cromosoma sexual X/Y- que codifican alrededor de 13.500 genes con baja redundancia funcional. Hoy en día el genoma de *Drosophila* está completamente secuenciado y existen bancos públicos con colecciones de ESTs (Expressed Sequence Tags) y cósmidos que incluyen todo el ADN genómico, así como bases de datos que permiten la búsqueda de secuencias por homología y el clonado *in silico* de genes de interés.

Al inicio del proyecto que dio lugar a mi tesis doctoral, se habían descrito en *Drosophila* los genes que codifican la ubiquitina, la enzima activadora de ubiquitina E1, algunas enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina y unas pocas E3 ubiquitín ligasas. Asimismo, se había caracterizado una proteína con motivo F-box, llamada Slimb [128,

² Thomas Morgan postuló las bases de la herencia ligada al sexo, a través de la caracterización de la mutación recesiva *white*, asociada al cromosoma sexual X. Por el trabajo realizado, Morgan recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina, en el año 1933.

³ comparado con el genoma humano que tiene 3300 millones de bases y alrededor de 30,000 genes o el de levaduras, que codifica 5800 genes en 13,5 millones de bases.

129], involucrada en el desarrollo de las patas y las alas del adulto. Sin embargo, en aquel momento, no existía aún ninguna evidencia genética ni bioquímica que demostrara la existencia de los complejos SCF en *Drosophila*. Los estudios realizados en sistemas de levaduras, *C.elegans*, *Xenopus* y células de mamíferos, permitían inferir un rol fundamental de los complejos SCF en el control de factores involucrados en la transducción de señales, en la regulación de la expresión génica y en otros procesos celulares que median el desarrollo.

Con el objeto de definir nuevas funciones de los complejos SCF durante el desarrollo y la diferenciación de organismos complejos, decidimos utilizar a *Drosophila melanogaster* como sistema experimental. La primera etapa del trabajo de esta tesis consistió en identificar a las proteínas que componen los complejos SCF-E3 ubiquitín ligasa en *Drosophila* y definir las interacciones físicas que ocurren entre ellas.

Objetivos

El objetivo de la primera etapa de esta Tesis fue identificar a las proteínas que componen el núcleo invariante de los complejos SCF de *Drosophila melanogaster* y analizar las interacciones de dichas proteínas entre sí y con otros componentes de la maquinaria de ubiquitinación.

Objetivos específicos:

- Identificar en *Drosophila* a los ortólogos de las proteínas Skp1, Cullin1 y Rbx1.
- Analizar las interacciones de estas proteínas entre sí y con la proteína F-box, Slimb.
- Analizar las interacciones de los componentes del complejo SCF con enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina.

1. Identificación de proteínas candidatas por homología de secuencias

Para identificar a las proteínas candidatas que componen los complejos SCF de *Drosophila*, realizamos una búsqueda por homología de secuencias en la base de datos del Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP). El BDGP es un consorcio del *Drosophila* Genome Center, cuyo principal objetivo es completar la secuenciación de eucromatina del genoma de *Drosophila melanogaster*, generar secuencias de alta calidad y mantener actualizadas las anotaciones biológicas de las mismas (www.fruitfly.org). Las secuencias utilizadas para realizar alineamientos contra el genoma de *Drosophila*, con el programa BLAST-P (Basic Local Alignment Sequence Tool- Protein), fueron las correspondientes a las proteínas humanas Skp1 (hSkp1) [79], Cullin1 (hCul1) [79, 130] y Rbx1 (hRbx1) [77]. A continuación se describe la identificación de estas proteínas en *Drosophila* y el resultado de los alineamientos obtenidos entre las proteínas candidatas de *Drosophila* y los ortólogos de humanos, *C.elegans* y *S. cerevisiae*.

1.1 La proteína Skp1 de *Drosophila*

El alineamiento de hSkp1 con el genoma de *Drosophila* arrojó siete secuencias candidatas con un grado significativo de homología con la proteína humana. La secuencia que mostró la mayor identidad con hSkp1, correspondió al gen CG16983 (anotación GadFly; flybase.bio.indiana.edu/genes) al que designamos *dskpA* (*Drosophila skpA*) (Fig. 10A). El porcentaje de identidad de dSkpA con la proteína humana fue del 76%, mientras que la identidad con los ortólogos de *C.elegans* [131, 132] y *S.cerevisiae* [133] fue del 36% y el 42%, respectivamente (Tabla 1). Las otras seis secuencias tuvieron menor homología con hSkp1, presentando entre un 67% y

un 22% de identidad aminoacídica (Fig.10B).

A)

```

dSkpA : .....M.PS.IKIQSSDDEEIFDIDIQIAKCSGIIKTMLEDGCMEDD..... : 39
hSkp1 : .....M.PS.IKIQSSDGEIFEVDVEIAKQSVIIKTMLEDLGMDEG..... : 40
ScSkp1 : .....MVTSNVYLVSGEGEGERFTVDDKKIAERSLLKKNYLDMMHDSNLQNNSDSDSDSDSETNHKSKD : 61
CeSkp1 : MSAPIVDAPAAEIVYKIISSDGVVSKMSEKAVQQSKIIISNIIENLGYTIEN..... : 51
-----

dSkpA : .....ENAI.VPLPNVNSTIILKRVLTWAHYHKDDPQPTEDDESKEKRTDDIISWDADF LKVDQGT : 98
hSkp1 : .....DDD..PVPLPNVNAAILKKVIOGCTHHKDDPPPEDDENKEKRTDDIPVWDQEF LKVDQGT : 99
ScSkp1 : NNGGDDDDDEDEIVMPVFNVRSSVLOKVIEWAEHHRD SNFPDEDDDD.SRKSAPVDSWDREF LKVDQEM : 130
CeSkp1 : .....IETRDPVPTVNVNGKTMKVAEWECEKHKDAIPEDNMNV..LKTLTIPVWDQKFLKTEDEA : 110
-----

dSkpA : LFEIILAANYLDIKGLLELTCKTVANMIKGTPEEIRKTFNIIKDFSPAEEEQVRKENLEWCEEK : 162
hSkp1 : LFEIILAANYLDIKGLLDVTCCKTVANMIKGTPEEIRKTFNIIKDFTEEEEAQVRKENLQWCEEK : 163
ScSkp1 : LYEIILAANYLNKPLLDAGCKVVAEMIRGRSPEEIRKTFNIVNDFTEEEAAIRRENLEWAEDR : 194
CeSkp1 : LFDLILASNFLDIKGLMYFCCKTVSNMAKGGKTAELREIFGINTDEQDAAEETAQRAAAEVA... : 172
    
```

B)

	CG16983 (dSkpA)	CG8881	CG12227	CG11941	CG12700	CG11942	CG 15800
hSkp1	76% (125/160)	67% (110/163)	57% (93/162)	56% (81/144)	54% (79/144)	45% (70/154)	22% (37/162)

Figura 10: (A) Alineamiento múltiple de dSkpA con los ortólogos de humano (h), *S.cerevisiae* (Sc) y *C.elegans* (Ce). La región N-terminal, presuntamente involucrada en la interacción con Cull1 y con la proteína F-box (se marca con línea de puntos), aparece muy conservada entre la proteína humana y la de *Drosophila*, mientras que es algo más divergente de la secuencia de levaduras, que presenta una inserción N-terminal de 30 aminoácidos. (B) Porcentaje de identidad aminoacídica entre los miembros de la familia Skp codificados en el genoma de *Drosophila* y la proteína humana. Entre paréntesis se detalla el número de aminoácidos idénticos sobre los considerados en el alineamiento.

1.2 La Cullin1 de *Drosophila*

El segundo componente del complejo SCF buscado por homología de secuencias, fue la proteína Cullin1 (Cul1), homóloga a Cdc53 de levaduras. Analizando el genoma de *Drosophila* con el programa BLAST, pudimos identificar siete miembros de la familia de las cullinas, que presentaron distinto grado de homología con la Cul1 humana. El homólogo más cercano correspondió al gen anotado como CG1877/*lin19* (GadFly), que presentó un 62% de identidad aminoacídica con hCul1 y un grado significativo de identidad con sus ortólogos en *C.elegans* (42%) y *S.cerevisiae* (30%) (Fig. 11A, Tabla 1). Los demás miembros de la familia Cullina, encontrados en *Drosophila* mostraron un

menor porcentaje de identidad con hCull1 (entre el 37% y el 22%, Fig. 11B), pero presentaron una homología significativa con los otros integrantes de esta familia descriptos en humanos (hCul2-hCul5 y Apc2; Figura 11B) [79]. En particular, la proteína anotada como CG11861/*guftagu*, presentó un 67% de identidad con hCul3, cullina que se encontró involucrada en la ubiquitinación de CiclinaE y que podría formar parte de un complejo similar al SCF [65, 134].

(A)

```

dCull1 : -mnrsgnsqttqklvnliddwselvegimqvfeheks-----ltrsgymrf : 45
hCull1 : msstrsqnphglkqigldqldqddllragiggyvtrgs-----maksgymel : 45
CeCull1 : ----mtnseprrrmtcdsevwkklqgdldvayrren-----mapkdyntl : 41
ScCula : -----msetlprsdldleatwnfilepcingllgneknqgastskrvykilspymyev : 51

dCull1 : ythvydyctsvsaapsgrfssgk-----tggeqlvgkklydrlecflksylse : 92
hCull1 : ythvnyctsvhqsngargagvppskskkgqtpggagfvglcllykrlkeflknyltn : 102
CeCull1 : ytsvydyctsiltlstsrldgedgraesstpartagadfvghemygrveeyvkayvia : 98
ScCula : ytaiynycvnksrsgghfstdsrtg-----qstilvgsseiyeklknylknvyln : 100

dCull1 : lltkfkaisgeevllsrytkqwkvsyqfssstvlldgicnynlnrnwvkrceegqkgyk : 149
hCull1 : llkdgedlmdesvlk-fytcgwdedyrfsskvlngicaylnrhwwrrrecdegrkgye : 158
CeCull1 : vcekgaelsgedllk-vyttewenfrisskvmdgifaylnrhwirreldegeniym : 154
ScCula : fkq-----snsetflqfyvkrwkrftigaiflnhafdymnrywvqkersdjkhhfid : 152

dCull1 : iyrlalvawkghlfgvlnepvtkavlksieeerggkllnrslvrdiviecyvelsfne : 206
hCull1 : iyslaltvtwrdclfrplnkqytnavllkiekernggetintrllisgvvgsyvelgln : 215
CeCull1 : vvtlavlwwkcrnlfnclkkdvidamlelirsertgsminsryisgveclvelgvad : 211
ScCula : yntcllmtwkevmpfapskdvlinelldqvtlgregqilqrsnistakslvalgidp : 209

dCull1 : e----dtdaeqqklsvykonfenkfiladtsafyekesdafilstn-tvteylkhvenr : 258
hCull1 : d----daakg-ptlvtvykesfesqfladterfytrresteflqqn-pvteymkkaear : 266
CeCull1 : setdakkdaetkklavykeffevkfleatrgfytqaanflsnggnvtdymikvetr : 268
ScCula : q-----dlkklnlwvyiqvfeqpfllkktqeyvtqyndylekh-swteyifeahei : 259

dCull1 : lleetqrrgrfnsknglsylhetadavlkstceevllekhllkifhtefgnllhadrmd : 315
hCull1 : lleeqrr-----vqvylnhestqdelarkceqvllekhleifhtefgnlldadkme : 316
CeCull1 : lngeddr-----cqlylnsstktpllatcesvllsnglldflqrhfggllvdkrd : 318
ScCula : ikreeka-----mtlywddhtkkplsmalnkvlltdhiekleneffvvlldardie : 309

dCull1 : dlkrmyslvalssknltdlksilenihhg-----teaiak : 352
hCull1 : dlgrmynlvsliqdgllgelklllethihhg-----laaiek : 353
CeCull1 : dlsrnfklcdvvpngldelkslenhiakg-----hqaler : 355
ScCula : kitslyalrldftlprmasvfenyvkktgeneissllamhkhnmknenanpkkl : 366

dCull1 : ccttdaandpktyvgildvhhkynalvltafnndngfvaaldkacgkfinsrvvt- : 408
hCull1 : cg-eaalndpkmyvgvldvhhkynalvmsafndagfvaaldkacqrfinnnavtk : 409
CeCull1 : vameaat-daklyvkllelvheryqslvnrsknepqfmqslkkaatsfinnnavtk : 411
ScCula : almtahslspkdyikklllevhdifskilfnesfpddiplakaldnaccgafindefal : 423

dCull1 : ian----saskspellakycdl1llkssknpedkelednlngvmvfkylidkdvfg : 461
hCull1 : maq----ssskspellarycdsllkssknpaealedtlngvmvfkylidkdvfg : 462
CeCull1 : rapp-qaqltksaellarycdqllrksknpdeaelelqtKimvfkylidkdvfs : 467
ScCula : pagspksatsktsemlakysdillkkatkpevasdmsded--iitiffkyltdkdafa : 478

dCull1 : kyyskmlakrlvnhtsasddaeamisklqtccgyeytvklqrmfddigvskdlnsy : 518
hCull1 : kfyakmlakrlvhqmsasddaeamisklqacgfeytsklqrmfddigvskdlntad : 519
CeCull1 : kfytkmfskrliselsasdeaanfittklksmccgyeytarlskmynctgvskdlntad : 524
ScCula : thyrllfakrlinghtstsaedeenllqrlqaansmeytqkittkmfddirllskilled : 535

dCull1 : fkgyl---aeknlmeidfglevlssgswpf-qlsmnflpseleersvrqfnefyaa : 571
hCull1 : fkkhl---tms-epldldfsiqvlssgswpf-qqctfalpseleersyrftafyas : 571
CeCull1 : fkekk---acmlgqksvefnvllvssgswpf-fpttpitlpqqlsktileiigqfyne : 577
ScCula : fava_knepayskakypdlqpfvlaenmwpsyqevfklpkelvpsheklikesysq : 592

dCull1 : rnsgrklnwlyqmkgelimvnrnnsstytlgastfgmsvllqfndqlsftvqglq : 628
hCull1 : rnsgrkltwlyqiskgelvtcfkn---rytlqastfgmallyqntedaytvqglq : 625
CeCull1 : kfngrlntwvysqsrgeitstafpk---kyvftatlaqmcmtullfnegdsytvegia : 631
ScCula : khngfllkwlpicrgelkaigkpgmpfnftvtllqmalilllynadavltleniq : 649
    
```

```

dCul1 : dntgtqggenliqvlqillkakkvltssd-----nensltpestvelfldyknkkririn : 680
hCul1 : dstqkmdilaaqvlqillkskllvledenanvdevelkpdliklylqyknkklrvn : 682
CeCul1 : aatkndeksapaivgsliknlvlkadtelqkede vpm--atvslnkaymkkvrvd : 686
ScCula : egtsltiqhlaaaavpfiikflliqvppg---ldalvkkpeqgfklsrpykalktinn : 703

dCul1 : in-----qplstelkveqetvkhhiedrklliqaalvrimk* : 717
hCul1 : in-----vpmkteqkgqetthknieedrklliqaalvrimk : 719
CeCul1 : lsk-----ftmkqdvrdtenvqknveedrksvisacivrimk : 724
ScCula : fagvkn dilqslsggghdnhgnklgnkrltederiekelntergfleacivrimk : 760

dCul1 : mrkrlnhtnlisevlnqlstfrfkpkvpvikcidiliekeylermeghkdtyssyla- : 773
hCul1 : mrkvlkhqqllqevltqlsrfkprvpvikcidiliekeylervdgekdyssyla- : 775
CeCul1 : trkrvqhqqmtevitqlsrfkpkvemikrcigs liekeymlrtesqkdlyeyla- : 780
ScCula : akrnlphttlvneclacshcfrfnakvsmvkraidsligkylgrgd-dgesyayla- : 815

```

(B)

	hCul1	hCul2	hCul3	hCul4A	hCul4B	hCul5	hAPC2
CG1512	37% 56%	50% ident 70% simil	29% 50%	27% 50%	32% 52%	26% 46%	19% 41%
CG1401	31% 52%	30% 51%	27% 48%	26% 47%	29% 48%	67% 81%	No signif.
CG1877 (<i>lin19</i>)	62% ident 75% simil	33% 55%	28% 49%	31% 49%	37% 55%	27% 46%	23% 46%
CG11861 (<i>guftagu</i>)	32% 51%	29% 49%	67% ident 79% simil	37% 56%	45% 60%	26% 47%	24% 38%
CG11261	26% 48%	23% 46%	27% 45%	24% 45%	26% 48%	26% 48%	No signif.
CG8711	30% 48%	30% 48%	34% 53%	62% ident 74% simil	67% ident 77% simil	26% 45%	28% 40%
CG3060	22% 41%	20% 39%	20% 39%	23% 43%	22% 42%	20% 47%	42% ident 64% simil

Figura 11: (A) Alineamiento múltiple de dCul1 con sus ortólogos en humano (h), *C.elegans* (Ce) y levaduras (Sc). El dominio CH de Cull1, involucrado en la interacción con Rbx1, está muy conservado entre los distintos organismos (encerrado entre líneas). El extremo C-terminal de Cull1, que incluye la lisina a donde se conjuga Nedd8/Rub1 (marcado con un asterisco), es el más conservado entre todos los miembros de la familia Cullina y muestra un alto grado de identidad aminoacídica aún entre los organismos más divergentes. (B) Porcentajes de identidad y similitud entre las proteínas de la familia Cullina descritas en humanos (hCul) y las predichas en el genoma de *Drosophila*.

1.3 La subunidad Rbx1 de *Drosophila*

Una búsqueda similar fue realizada alineando la secuencia de hRbx1 contra la base de datos del BDGP. En este caso, encontramos tres secuencias con homología significativa con hRbx1: la correspondiente a la anotación GadFly CG16982, presentó el mayor grado

2. Otros componentes del sistema Ubiquitina/Proteasoma en *Drosophila*

2.1 Slimb, una proteína con motivo F-box

Como hemos mencionado, la especificidad en el reconocimiento del sustrato en los complejos SCF, viene dada por un cuarto componente variable, la proteína F-box. Al comienzo de mi proyecto de tesis se había caracterizado una única proteína con motivo F-box en *Drosophila*, llamada Slimb (Slmb; Supernumerary limbs; se describe en detalle en el Capítulo II) [128, 129]. El análisis de la secuencia de Slmb reveló que esta proteína presenta además el dominio de interacción WD40 [136] y homología significativa con las proteínas F-box de levaduras, Met30 (31% de identidad) y Cdc4 (25% de identidad) [86] y un 80% de identidad con la proteína humana β -TrCP [111]. Habiéndose demostrado en otros organismos que dichas proteínas F-box forman parte de complejos SCF con actividad de ubiquitin-ligasa sobre distintos sustratos y partiendo de la hipótesis que Slmb podría formar parte de un complejo SCF en *Drosophila*, decidimos estudiar posibles interacciones físicas entre esta proteína F-box y los putativos componentes de los complejos SCF de *Drosophila*, dSkpA, dCul1 y dRbx1.

2.2 Enzimas activadoras de ubiquitina, E2

Hemos mencionado que la conjugación de ubiquitina al sustrato mediada por las RING-E3-ligasas, ocurre por transferencia directa de la ubiquitina desde la enzima E2 a la proteína blanco. En sistemas de levaduras y de mamíferos, se han descrito distintas enzimas E2 que actúan junto con los complejos SCF en la cascada de ubiquitinación. Entre ellas se encuentran las proteínas humanas Ubc3 (homóloga a Cdc34 de levaduras), UbcH5b y UbcH5c [112, 137]. Por otro lado, cuando comenzamos con este trabajo de tesis, se habían caracterizado tres enzimas E2 en *Drosophila* (Tabla1): UbcD1 [138], que presenta un alto porcentaje de identidad aminoacídica con enzimas de la familia UbcH5 [139], UbcD6, el homólogo más cercano a la proteína humana HHR6A y a Rad6 de levaduras [140] y UbcD10 [141], cuyo homólogo en humanos es la enzima UbcH7, involucrada en la cascada de ubiquitinación de distintas RING-E3 ligasas monoméricas [55, 61]. En base a estos datos de la literatura, decidimos investigar si alguna de las

enzimas conjugadoras de ubiquitina descritas en *Drosophila* era capaz de interactuar con los putativos componentes del complejo SCF.

Tabla 1: porcentajes de identidad entre las proteínas de *Drosophila* y sus ortólogos en humanos, *C.elegans* y *S.cerevisiae*.

	Núcleo SCF			Enzimas E2		
	dSkpA	dCul-1 (<i>lin19</i>)	dRbx1	UbcD1 (<i>effette</i>)	UbcD10	UbcD6
<i>H.sapiens</i>	76.7% (Skp1)	62.3% (Cul-1)	91% (Rbx1)	94.6% (UbcH5B) 93.9% (UbcH5C)	74.0% (UbcH7)	86.2% (HHR6A) 84.9% (HHR6B)
<i>C. elegans</i>	35.8% (Skr-1)	42.1% (Cul-1)	61.6% (Rbx1)	88% (Ubc2)	59% (Ubc-18)	78.1% (Ubc-1)
<i>S. cerevisiae</i>	41.5% (Skp1)	30.0% (Cdc53)	44.1% (Hrt1)	81% (Ubc4) 82% (Ubc5)	79.7% (Ubc4) 80.4% (Ubc5)	59.9% (Rad6)

3. Obtención de los cDNA de las proteínas identificadas en *Drosophila*

Los ADN copia (cDNA) correspondientes a dSkpA, dCul1 y dRbx1 fueron obtenidos de la colección de Expressed Sequence Tags (ESTs) del BDGP (ver sitio www.fruitfly.org/DGC), donde encontramos varios clones que fueron complementarios al extremo 5' de cada uno de los cDNA. La colección de ESTs del BDGP fue generada a partir de bibliotecas de cDNAs de distintos tejidos y estadios de la mosca y contiene mas de 10.000 secuencias no redundantes, que representan alrededor del 75% de todos los genes predichos en *Drosophila*. Se buscaron también ESTs correspondientes a Slmb, UbcD1, UbcD6 y UbcD10, eligiéndose un clon representativo para cada uno de estos genes, entre los varios encontrados en caso (ver materiales y métodos). Para confirmar la identidad de los clones y cerciorarnos de que la secuencia codificante estuviera completa, secuenciamos los extremos 5' y 3' de todos los ESTs y analizamos sus patrones de restricción, utilizando distintas enzimas (no se muestra).

4. Ensayos de interacciones en el sistema del Doble Híbrido de Levaduras

La primer metodología utilizada para analizar las interacciones entre los putativos componentes del complejo SCF, así como también entre dichas proteínas y otros elementos de la vía de ubiquitinación, fue el sistema del Doble Híbrido en Levaduras [142]. Este método permite detectar la unión física entre dos proteínas, a través de la reconstitución de la actividad del factor de transcripción, Gal4. Las proteínas cuya interacción se desea analizar se expresan, una, como fusión al dominio de transactivación de Gal4 (Gal4-HA-AD, también lleva el epítopo Hemaglutinina) y la otra, como fusión al dominio de unión al DNA de dicho factor de transcripción (Gal4-DBD). La actividad transcripcional se pone en evidencia mediante la inducción de genes reporteros que se encuentran bajo el control del promotor UAS (Upstream Activated Sequence), reconocido específicamente por Gal4 (Fig. 13A). La cepa de *S.cerevisiae* utilizada en este ensayo fue PJX, que tiene auxotrofia para Histidina y Adenina y lleva los genes reporteros, *HIS3* (biosíntesis de Histidina), *ADE2* (biosíntesis de Adenina) y *LacZ* (gen de la β -galactosidasa). De esta forma, sólo aquellas células que induzcan los tres genes reporteros van a crecer en medio de cultivo carente de Histidina y Adenina y desarrollarán color azul, en presencia del sustrato cromogénico de la β -galactosidasa, X-gal. A fin de disminuir la aparición de falsos positivos y aumentar la confiabilidad del método, los tres elementos reporteros se encuentran bajo el control de tres promotores UAS ligeramente diferentes, que provienen de distintos genes endógenos de respuesta a Gal4 (Fig. 13B).

Las secuencias codificantes de *dskpA*, *dcu11*, *dcu13*, *drbx1*, *slmb*, *ubcD1*, *ubcD6* y *ubcD10* fueron amplificadas por PCR a partir de sus respectivos ESTs y subclonadas en los vectores de Doble Híbrido pAS21 y pACT2, para generar proteínas fusionadas por su extremo N-terminal, al dominio Gal4-DBD o al dominio GAL4-AD, respectivamente (ver Apéndice). Asimismo, los vectores pAS21 y pACT2 llevan los genes TRP1 (involucrado en la biosíntesis de Triptofano) y LEU2 (involucrado en la biosíntesis de Leucina), respectivamente, para ser utilizados como marcadores de selección en levaduras. Para estudiar las interacciones entre distintos pares de proteínas, las levaduras de la cepa PJX fueron co-transfectadas con diferentes combinaciones de plásmidos pAS21/pACT2 y plaqueadas en medio mínimo SD, sin Leucina y sin Triptofano (Clontech) para seleccionar a las co-transfectantes. Para cada una de las interacciones a analizar, se incluyó un control negativo que consistió en co-transfectar la proteína de fusión a uno de los dominios de

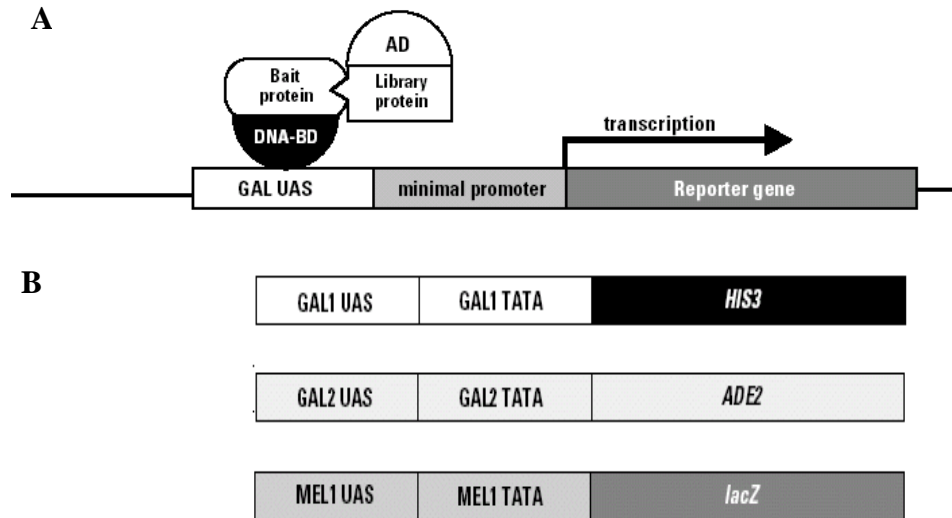


Fig. 13: Principio del Sistema del Doble Híbrido en Levaduras. **(A)** La interacción entre dos proteínas se detecta por reconstitución de la actividad del factor de transcripción Gal4, que induce la expresión de los genes reporteros que se encuentran bajo el control del promotor UAS. **(B)** La cepa de *S.cerevisiae*, PJX, lleva tres genes reporteros, *ADE2*, *HIS3* y *LacZ*. Cada uno de estos reporteros se encuentra regulado por un promotor UAS ligeramente diferente, proveniente de los genes endógenos de levadura *Gal1*, *Gal2* y *Mel1*, respectivamente.

Gal4, junto con vector que codifica el dominio complementario de Gal4, vacío (sin proteína fusionada). Para verificar la expresión de dichas proteínas en las células de levaduras, realizamos ensayos de *western blot* con los anticuerpos anti-Gal4-DBD o anti-HA. Todas las proteínas de fusión se expresaron correctamente en la cepa de levaduras PJX exhibiendo la movilidad electroforética esperada a partir del peso molecular predicho (no se muestra).

4.1 Ensayos de interacción en placa.

Para analizar interacciones entre distintos pares de proteínas, realizamos ensayos estriando las células co-transfectantes en placas con medio mínimo SD sin Adenina, sin Histidina y con X-Gal. Utilizamos el criterio de *crecimiento* de colonias y *desarrollo de color azul*, para detectar la activación de los genes reporteros *ADE2*, *HIS3* y *LacZ*, respectivamente. De esta manera, pudimos determinar la existencia de interacción específica entre las proteínas dCul1 y dSkpA y entre dSkpA y la proteína F-box, Slmb

(Tabla 2). La interacción dCul1-dSkpA se observó sólo cuando las fusiones fueron al Gal4-AD y Gal4-DBD, respectivamente, pero no en la combinación recíproca. Esto pudo haberse debido a un enmascaramiento del dominio N-terminal de Skp1, lugar donde reside el presunto dominio de interacción con Cul1, a causa de la fusión con el dominio Gal4-AD. Por otro lado, no pudimos detectar interacción entre dSkpA y una segunda cullina testada, dCul3, sugiriendo que dCul1 sería la cullina reclutada específicamente al complejo SCF (Fig. 14). Al analizar interacciones de dRbx1 con las demás proteínas, observamos que tanto su fusión al dominio Gal4-DBD como al dominio Gal4-AD, activaron fuertemente la expresión de los genes reporteros aún en los controles en los que los vectores complementarios de Gal4 estuvieron vacíos. Por esta razón, las interacciones de dRbx1 no pudieron analizarse con este método.

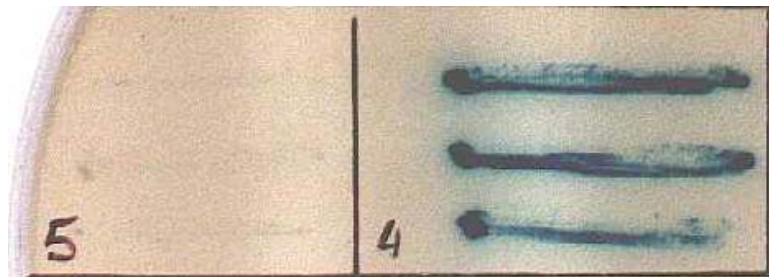


Figura 14: Ejemplo de ensayos de interacción en placa. A la derecha se detecta la interacción positiva entre dSkpA y dCul1 y a la izquierda se evidencia la ausencia de interacción entre dSkpA y dCul3. La cepa PJX de *S. cerevisiae* fue co-transfectada con los plásmidos pACT2 y pAS21, expresando distintas proteínas de fusión. Se realizaron estrías de tres colonias independientes en placas con medio selectivo SD sin Leu, Trp, Ade ni His a las que se agregó X-Gal. Las interacciones positivas fueron detectadas por crecimiento de las colonias y desarrollo de color.

4.2 Ensayos de interacción en medio líquido.

En muchos casos, la interacción débil entre dos proteínas puede resultar en una activación suave de los elementos reporteros, que no es suficiente para permitir el crecimiento de las levaduras en el medio selectivo, en los tiempos habituales que lleva el ensayo. Con el objeto de "rescatar" posibles falsos negativos, re-testeamos algunas de las interacciones que resultaron negativas en los ensayos en placa, utilizando para ello ensayos colorimétricos en medio líquido. Para tal fin, nos valimos de otro sustrato de la β -galactosidasa, el ONPG, cuyo producto de reacción puede medirse por espectrofotometría, aumentando así la sensibilidad del método (ver materiales y métodos). Con esta estrategia,

detectamos dos nuevas interacciones positivas: UbcD1-dCul1 y UbcD1-dCul3. La co-expresión de dCul1 o dCul3 con UbcD1 incrementaron 4 y 10 veces, respectivamente, la actividad de la β -galactosidasa al comparárselo con el experimento control. Asimismo, las interacciones ensayadas para UbcD6 y UbcD10 resultaron nuevamente negativas, sugiriendo que UbcD1 sería la enzima E2 específicamente involucrada en la cascada de ubiquitinación mediada por los complejos SCF. Por otro lado, las interacciones dCul1-Slmb y dCul3-dSkpA tampoco pudieron detectarse en estos ensayos, confirmando los resultados negativos obtenidos en los ensayos en placa.

Tabla 2: Resultado de las interacciones analizadas en los ensayos del Doble Híbrido en placa. Se marca como positiva (+) o negativa (-) la activación de los genes reporteros, detectada para las distintas combinaciones de proteínas de fusión. La obtención de falsos positivos con dRbx1 se pone en evidencia a través de la activación de los genes reporteros, aún con el vector complementario vacío (*). En todos los casos se realizó un control negativo, utilizando el vector recíproco sin fusionar a otra proteína (no se muestra en la tabla).

Gal4AD-híbrido (pACT2)	Gal4DBD-híbrido (pAS2-1)	His/Ade	β -Gal
dSkpA	dCul1	+	+
dCul1	dSkpA	-	-
dSkpA	dCul3	-	-
dCul3	dSkpA	-	-
dSkpA	dSkpA	-	-
dCul1	dCul1	-	-
UbcD1	dCul1	-	-
UbcD1	dCul3	-	-
UbcD6	dCul1	-	-
UbcD6	dCul3	-	-
UbcD10	dCul1	-	-
UbcD10	dCul3	-	-
UbcD6	dSkpA	-	-
UbcD1	dSkpA	-	-
UbcD10	dSkpA	-	-
-	dRbx1*	+	+
dRbx1*	-	+	+
Slmb	dCul1	-	-
Slmb	dCul3	-	-
Slmb	dSkpA	+	+

Análisis de interacciones *in vitro*

Para analizar la capacidad de dRbx1 de interactuar con los distintos componentes del complejo SCF y con la enzima E2, UbcD1, así como también para confirmar los resultados positivos obtenidos en los ensayos del Doble Híbrido de Levaduras, realizamos ensayos de interacción *in vitro*. En cada uno de estos ensayos utilizamos dos proteínas: una de ellas, expresada en *Escherichia coli* como proteína de fusión a Glutathion S-transferasa (GST) o a poli-Histidina (His) y la otra, marcada con ^{35}S -Metionina por transcripción-traducción *in vitro* (IVTT) en extractos de reticulocitos de conejo (ver Fig. 15, ver materiales y métodos). Las secuencias codificantes de dSkpA, dRbx1, dCul1, Slmb y UbcD1 fueron clonadas en los vectores de expresión bacterianos pGEX-3X y/o pTrc-HisC para generar las proteínas de fusión a GST ó a His, respectivamente, o expresadas por IVTT directamente a partir de los ESTs clonados en el vector pOT2 (ver Apéndice). Los extractos proteicos conteniendo a cada una de las proteínas de fusión a testear se combinaron con los productos de IVTT, se incubaron juntos para permitir la interacción y fueron luego sometidos a precipitación por el método de GST-*pull down* o por inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Histidina. El material precipitado se analizó por SDS-PAGE, seguido de autorradiografía, para investigar la presencia de la proteína marcada con ^{35}S -Metionina en la fracción precipitada (Fig.15).

5.1 Interacciones *in vitro* observadas

Se analizó la interacción de la proteína dRbx1 fusionada a GST con las proteínas dSkpA, dCul1, Slmb y dRbx1, marcadas con ^{35}S -Metionina. Como se muestra en la Figura 16A, dRbx1 interactuó específicamente con dCul1 y con la proteína F-box Slmb, pero no fue capaz de unirse a dSkpA. Estos resultados son consistentes con los reportados en levaduras, en donde Hrt1/Rbx1 interactúa con Cdc53/Cul1 y con las proteínas F-box, Grr1 y Cdc4 [76, 77]. Por otro lado, dRbx1 no mostró interacción consigo misma en los ensayos de GST-*pull down*, sugiriendo que en los complejos SCF estaría presente como monómero. Experimentos similares fueron realizados para confirmar las interacciones positivas encontradas en los ensayos del Doble Híbrido. En este grupo de ensayos utilizamos a las proteínas dSkpA y UbcD1 fusionadas a His, mientras que las proteínas Slmb, dCul1 y dRbx1 se marcaron con ^{35}S -Metionina por IVTT. Dado que en las pruebas preliminares de inmunoprecipitación observamos muy poca cantidad de His-dSkpA e His-

UbcD1 en la fracción inmunoprecipitada a partir de los extractos bacterianos (analizando por *western blot*, con anticuerpo anti-His), decidimos purificar estas proteínas recombinantes utilizando columnas de ácido imidoacético-sefarosa, logrando así concentrarlas (ver materiales y métodos, Fig. 15). En la Figura 16B puede verse que tanto Slmb como dCul1, co-inmunoprecipitaron con His-dSkpA e His-UbcD1, confirmando los resultados positivos obtenidos por la técnica del Doble Híbrido. Al mismo tiempo, estos ensayos revelaron una nueva interacción positiva, Slmb-UbcD1, que no había sido estudiada previamente. Finalmente, las interacciones de dRbx1 con las proteínas UbcD1 y dSkpA resultaron negativas, siendo este último resultado consistente con el observado en el ensayo de *GST-pull down*.

Durante la realización de los experimentos de interacción *in vitro*, observamos que las proteínas dCul1 y Slmb, expresadas en sistemas de reticulocitos, migraron como un doblete en SDS-PAGE (Fig. 16B). En el caso de dCul1, la doble banda pudo ser causa de su neddilación a partir de la proteína Nedd8/Rub1 presente en el lisado de reticulocitos de conejo [91]. En el caso de Slmb, la causa pudo haber sido la adición de una molécula de ubiquitina [143] o alguna otra modificación post-traduccional no conocida.

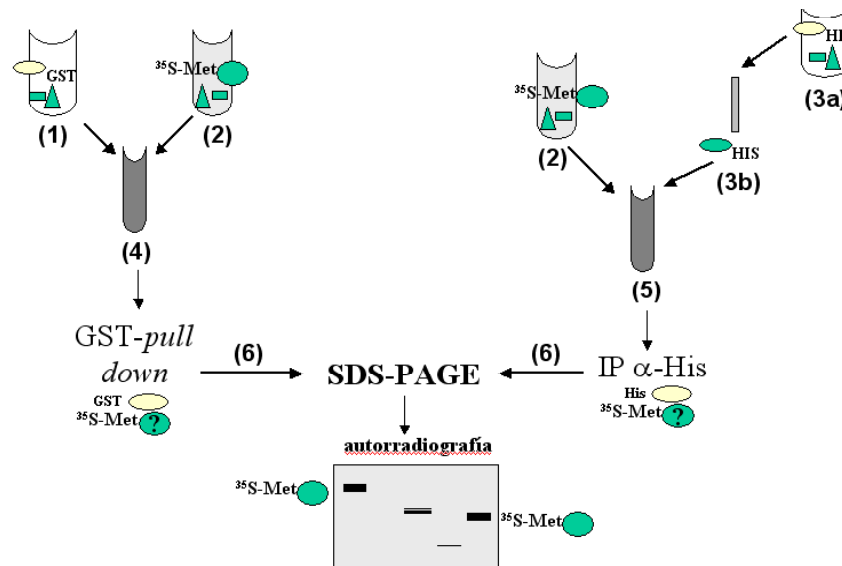
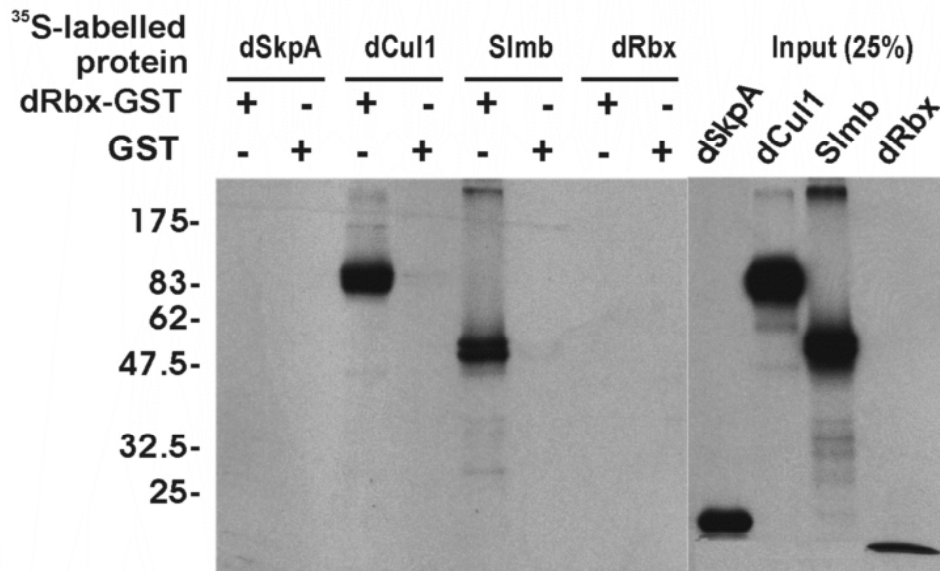


Fig. 15: Ensayos de interacción *in vitro*. Los extractos conteniendo a cada una de las proteínas de fusión a GST (1) se combinaron con los productos de IVTT (2), conteniendo las proteínas marcadas con ³⁵S-Metionina. Las fracciones se mezclaron y se dejaron interaccionar (4) para someterlas luego a *GST-pull down*. El producto presente en el precipitado se analizó por SDS-PAGE seguido de autorradiografía, para detectar la presencia de las proteínas marcadas con ³⁵S (6). Por otro lado, las proteínas de fusión a His fueron purificadas en columnas de ácido imidoacético-sefarosa a partir de los extractos bacterianos (3a). La fracción concentrada en la proteína de fusión (3b) se mezcló con el producto de IVTT (2), se dejó interaccionar por algunas horas (5) y se sometió luego a SDS-PAGE, seguido de autorradiografía (6).

A



B

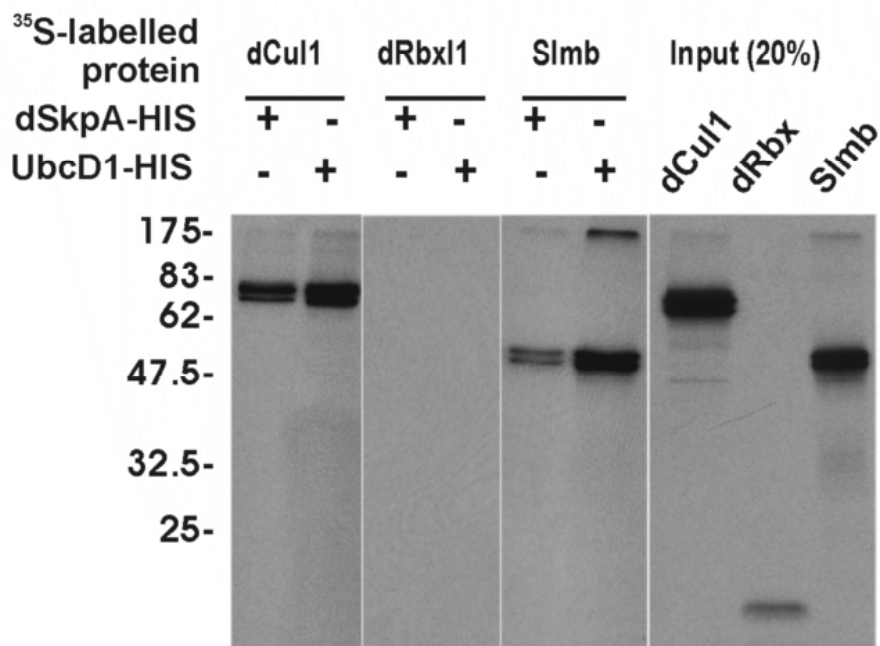


Figura 16: Resultado de los ensayos de interacción *in vitro*, analizados por SDS-PGE y revelados por autorradiografía. **(A)** Ensayos de GST-pull down. Las proteínas dCul1 y Slmb, marcadas con ³⁵S-Metionina interactúan positivamente con la proteína Rbx1-GST, pero no con el péptido control GST. Contrariamente, dSkpA y dRbx1 no están presentes en el precipitado, sugiriendo que no existe interacción entre dRbx1 y dichas proteínas. **(B)** Ensayos de co-inmunoprecipitación. dCul1 y Slmb co-inmunoprecipitan con dSkpA-His y con UbcD1-His, evidenciando que son capaces de unirse a ambas proteínas. No pudo detectarse interacción de dRbx1 con dSkp1, ni con la enzima UbcD1, confirmando el resultado observado en **(A)**. Sobre la derecha de cada autorradiografía se muestra que todas las proteínas se expresaron y se marcaron correctamente con ³⁵S en el sistema de reticulocitos, si bien dRbx1 no se marcó con alta eficiencia (la siembra corresponde a un 20-25% de la cantidad utilizada en el ensayo de interacción).

Discusión

- **Las subunidades del complejo SCF Skp1, Rbx1 y Cul1 están conservadas en *Drosophila* e interaccionan físicamente**

Las búsquedas realizadas en bases de datos del BDGP nos permitieron identificar a los componentes del núcleo invariante de los complejos SCF de *Drosophila*, las proteínas dSkpA, dCul1 y dRbx1. Si bien encontramos 7 homólogos de la proteína Skp1, 7 miembros de la familia Cullina y 3 proteínas RING-H2 homólogas a Rbx1, sólo uno de los candidatos de cada grupo presentó un porcentaje de identidad significativamente mayor al resto al compararse con la proteína humana, la de *C.elegans* y la de *S.cerevisiae*, sugiriendo que estas proteínas se encuentran altamente conservadas en los organismos eucariotas.

Utilizando el sistema del Doble Híbrido de levaduras y ensayos de interacción *in vitro*, pudimos determinar que dSkpA interacciona con la proteína F-box Slmb y que puede también unirse a dCul1. Estos resultados son consistentes con los reportados en levaduras y en humanos, donde se encontró que Skp1 se une directamente a Cdc53/hCul1, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* [72, 79] y que también interacciona con distintas proteínas que presentan el motivo F-box, como Cdc4, Grr1, CiclinaF [72] y el ortólogo humano de Slmb, β -TrCP [99, 144]. Encontramos, además, que dSkpA no interacciona con dCul3 [81], reforzando la idea de que dSkpA reconoce específicamente a Cul1 dentro de la familia Cullina.

Durante el desarrollo de esta tesis, poco después de publicar nuestros resultados [145], las proteínas dSkpA y dCul1 fueron caracterizadas genéticamente e involucradas en la vía de degradación mediada por los complejos SCF, demostrándose que dCul1 puede revertir el fenotipo de arresto celular en las levaduras mutantes termosensibles *cdc53^{ts}*

[146]. Asimismo, se encontró que dCul1, junto a dSkpA y a Slmb, es requerida para modular la respuesta inmune dependiente de Relish, uno de los homólogos de NFκB de *Drosophila* [147]. Confirmando la participación de dCul1 en los complejos SCF, recientemente se reportó que esta proteína, junto con otra proteína F-box de *Drosophila*, Archipelago, está directamente involucrada en la degradación de CiclinaE [148, 149]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, junto a los reportados por otros grupos, refuerzan la hipótesis de que las proteínas de *Drosophila* identificadas, dSkpA y dCul1, son los ortólogos de las proteínas humanas Skp1 y Cul1, respectivamente.

Mediante ensayos de interacción *in vitro*, pudimos determinar que dRbx1 interacciona con dCul1 y con Slmb, pero que no se une a dSkpA. Nuevamente, estos resultados son consistentes con los datos reportados en otros sistemas: en humanos, se demostró que hRbx1 es capaz de unirse a hCul1 [77], mientras que en levaduras se encontró que Hrt1/Rbx1 interacciona con Cdc53/Cul1 y con la proteína F-box Cdc4, pero que no puede unirse a Skp1 [76, 77]. En un trabajo realizado en colaboración con la Dra. Susana Silberstein (Universidad de San Martín), pudimos demostrar que la proteína Rbx1 de *Drosophila* es capaz de revertir la letalidad y el fenotipo de arresto celular, asociado a la pérdida de función de Hrt1/Rbx1 en células de levadura [145]. Utilizando la técnica de disrupción génica por PCR [150], Silberstein generó la línea deficiente *Δhrt1*, que causó la inviabilidad de las células mutantes. Para intentar la complementación de estas mutantes, el ortólogo putativo de *Drosophila*, *drbx1*, fue clonado en un vector de expresión de levaduras inducible por galactosa y reprimible por glucosa. Luego de transfectar este plásmido en levaduras mutantes *Δhrt1*, observamos que las células recuperaron la viabilidad al inducirse la expresión de dRbx1 en un medio de cultivo suplementado con galactosa (Fig. 17A). Más interesante aún, cuando las mutantes *Δhrt1* que fueron transformadas con el vector que expresaba dRbx1, se transfirieron de un medio rico en galactosa a uno suplementado con glucosa, las levaduras detuvieron su crecimiento y adquirieron el fenotipo de arresto en fase G1, característico de las mutantes *scf* (Fig. 17B)[68, 70, 151]. Finalmente, estudios genéticos recientes realizados por el grupo de R..J. Duronio, demostraron que la proteína de *Drosophila* dRbx1 (también llamada Roc1a) es esencial para la adecuada proliferación celular [152]. Asimismo, encontraron que la pérdida de función de dRbx1 en el disco imaginal de ala resulta en la acumulación del factor de transcripción Cubitus Interruptus, de manera similar a lo que ocurre en las células mutantes para Slmb [128, 152]. Nuevamente, los resultados obtenidos en esta tesis, junto al

trabajo realizado por otros grupos, demuestran que la proteína identificada como dRbx1 es el homólogo funcional de Rbx1/Hrt1 en *Drosophila* y ponen en evidencia el alto grado de conservación de esta proteína en organismos eucariotas.

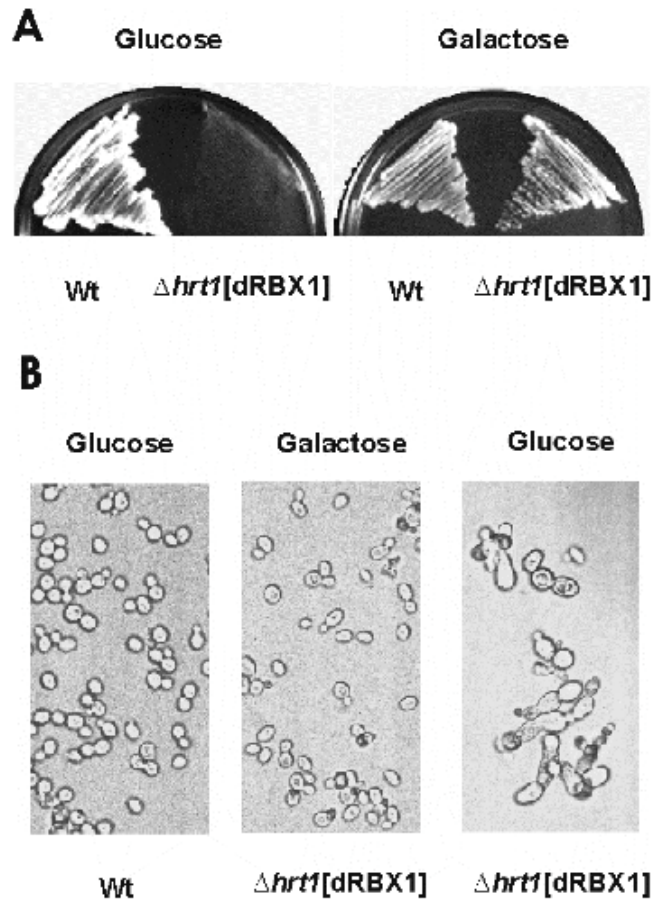


Figura 17: Experimento de complementación en levaduras. **(A)** La expresión dRbx1, inducida por galactosa, rescató la letalidad asociada a la delección del gen *hrt1* en *S.cerevisiae* ($\Delta hrt1$). **(B)** Cuando las células complementadas, creciendo en un medio suplementado con galactosa, se transfirieron a un medio con glucosa, se observó arresto en fase G1 del ciclo celular (las levaduras gemantes no se pueden dividir) [145]. A la izquierda de cada panel se muestra que la cepa salvaje (WT) es capaz de crecer normalmente en el medio de cultivo suplementado con glucosa (Fig. tomada de Bocca *et al.* [145]).

- **Los componentes del complejo SCF interactúan específicamente con la enzima E2, UbcD1**

Los estudios de interacción realizados con la enzima E2 conjugadora de ubiquitina, UbcD1, revelaron que esta proteína se une a dCul1 y a Slmb y que también interacciona con la proteína dCul3. La enzima UbcD1 de *Drosophila* fue inicialmente identificada por homología de secuencias con las proteínas de levaduras Ubc4 y Ubc5 [138] e involucrada

luego en el proceso de segregación cromosómica, durante la meiosis [29]. El análisis de la secuencia de UbcD1 reveló que esta proteína presenta también una alta homología con enzimas de la familia UbcH5 (95% de identidad) y con la proteína de levaduras Cdc34, ambas asociadas a los complejos SCF [29, 153]. Unos años más tarde, se describió la primera y única interacción de UbcD1 con una RING-E3 ligasa monomérica, la proteína inhibidora de la apoptosis, DIAP1 [154]. En este trabajo de tesis presentamos la primera evidencia de que UbcD1 actuaría en la cascada de ubiquitinación mediada por los complejos SCF. Asimismo, la interacción detectada con dCul3, sugiere que UbcD1 podría estar además involucrada en la cascada de ubiquitinación mediada por un complejo similar al SCF, que incluiría a este miembro de familia de las cullinas [155].

Contrariamente, las enzimas E2 UbcD6 y UbcD10 no interaccionaron con ninguna de las proteínas del complejo SCF en los ensayos de Doble Híbrido, aún cuando los mismos fueron realizados en condiciones de alta sensibilidad. Resultados similares se reportaron en levaduras, donde se vio que Rad6, el homólogo de UbcD6, actúa en procesos mediados por las RING-E3 ligasas monoméricas, Ubr1 y Rad18 [153, 156], pero no forma parte de la cascada de ubiquitinación de los complejos SCF. De manera similar, la enzima homóloga a UbcD10, UbcH7 [139], ha sido involucrada en distintos procesos mediados por HECT-E3 ligasas [157, 158] y RING-E3 ligasas monoméricas [159, 160], pero nunca fue relacionada con los complejos SCF. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este trabajo y a los reportados en la literatura, sugerimos que las enzimas UbcD6 y UbcD10 de *Drosophila* tampoco estarían involucradas en la cascada de ubiquitinación mediada por los complejos SCF. Realizando búsquedas en bases de datos, encontramos al menos cuatro proteínas E2 en *Drosophila*, cuya función no ha sido aún caracterizada (UbcD2, UbcD3, UbcD4 y UbcD9). Algunas de ellas guardan homología con UbcH5, aunque con un porcentaje de identidad menor que el observado para UbcD1 (entre el 32% y el 66%). Teniendo en cuenta que la interacción entre las enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina y las E3 ligasas parece guardar cierta especificidad, pero que al mismo tiempo un mismo complejo SCF puede unirse a más de una enzima E2 para catalizar la ubiquitinación de diferentes sustratos [161], queda por determinar si alguna otra de las enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina codificadas en el genoma de *Drosophila* está involucrada en la cascada de ubiquitinación mediada por los complejos SCF.

- **Modelo propuesto para el complejo SCF^{Slmb} de *Drosophila***

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de interacción en el sistema del Doble Híbrido de levaduras y a los resultados observados en los experimentos de interacción *in vitro*, postulamos un modelo en el cual la proteína dCul1 se uniría a dRbx1 y a dSkpA, las cuales a su vez mediarían la unión de la proteína F-box, Slmb (Fig.18). Al mismo tiempo, dCul1 y Slmb reclutarían a la enzima E2 UbcD1 al complejo SCF (Fig. 18). En este contexto, la enzima E2 aportaría la ubiquitina activada y la proteína F-box reclutaría al sustrato que va a ser ubiquitinado.

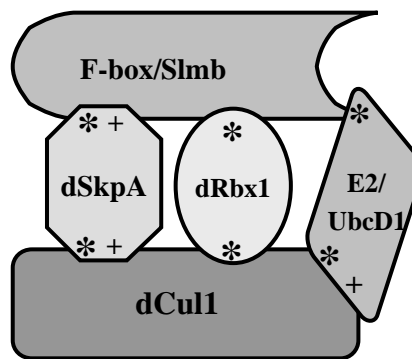


Figura 18: Modelo propuesto para el complejo SCF^{Slmb} de *Drosophila*, en base a las interacciones detectadas en los ensayos de Doble Híbrido (+) y en los experimentos *in vitro* (*). dSkpA y dRbx1 interactúan con dCul1 y con la proteína F-box, Slmb, pero no se unen entre sí de manera directa. La enzima E2 es reclutada al complejo SCF a través de dCul1 y de la proteína F-box, Slmb.

- **Modelo actual de los complejos SCF**

Luego de haber publicado nuestros resultados [145], Zheng y colaboradores reportaron por primera vez la cristalización de un complejo SCF [162]. En este trabajo, los autores describieron en gran detalle la estructura global del complejo humano SCF^{Skp2}, como así también, la estructura particular de cada una de las proteínas que lo componen. Asimismo, la estructura resuelta permite determinar cuáles son los dominios involucrados en las interacciones entre las distintas subunidades del complejo [163]. La estructura cristalográfica obtenida muestra que la Cullin1 funciona como andamio estructural del complejo SCF; la forma alargada de esta proteína permite que en el extremo C-terminal se ancle la subunidad catalítica Rbx1 y que en el C-terminal se una Skp1, la cual a su vez recluta a la proteína con motivo F-box (Fig. 19A). Los autores utilizaron resultados de estructuras resueltas previamente para armar un modelo que incluye a la proteína F-box

Skp2 completa (en el trabajo reportado utilizan sólo la región N-terminal de esta proteína) y a la enzima E2, unida al dominio RING de Rbx1 [55, 164]. Con esta versión “ampliada”, postulan que la estructura ensamblada sobre Cull1 permite el posicionamiento óptimo del sustrato (unido a la proteína con F-box) en el sitio activo de la enzima E2 (ubicada sobre Rbx1), de modo tal que la transferencia eficiente de la molécula de ubiquitina pueda tener lugar (Fig. 19A).

El mapa de interacciones presentado en este trabajo de tesis se ajusta al modelo general de los complejos SCF reportado por Zheng y col., aunque presenta algunas diferencias (Fig. 19 A,B). Una de ellas es la falta de interacción entre dRbx1 y UbcD1. Este resultado es llamativo, ya que en distintos trabajos se ha reportado que el motivo RING de las E3 ligasas, representado en los complejos SCF por la subunidad Rbx1, está directamente involucrado en la interacción con la enzima E2. Es posible que el bajo nivel de expresión que obtuvimos para dRbx1 en el sistema de reticulocitos de conejo (ver Fig.16B) haya sido una limitante experimental al momento de intentar detectar la interacción con UbcD1. Cabe destacar que la interacción entre dRbx1 y UbcD1 sólo fue estudiada por inmunoprecipitación, a causa de los falsos positivos obtenidos para dRbx1 en el sistema de Doble Híbrido de levaduras. Por otro lado, el modelo de Zheng y col. no muestra interacción directa de la enzima E2 con Cull1 ni con la proteína F-box (Fig. 19A), mientras que los ensayos realizados en este trabajo de tesis sugieren que UbcD1 puede unirse tanto a dCull1 como a Slmb. Nuestros resultados son consistentes con las observaciones realizadas en levaduras, donde se encontró que Cdc53/Cull1 y la proteína F-box, Cdc4, se unen específicamente a la región C-terminal de la enzima E2 conjugadora de ubiquitina, Cdc34 [165]. Asimismo, se sabe que la neddilación de Cull1 aumenta la afinidad de unión de la enzima E2 al complejo SCF, sugiriendo que podría existir algún tipo de interacción directa entre Cull1 y la enzima E2. Debe tenerse en cuenta que el modelo “ampliado” de Zheng y col., infiere la unión de la proteína E2 al complejo SCF, a partir del cristal obtenido para la RING-E3 ligasa monomérica c-Cbl, unida a la enzima conjugadora de ubiquitina UbcH7 [55]. Por lo tanto, las interacciones entre Cull1 y UbcD1 encontradas en este trabajo de tesis no quedan descartadas. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que muchas enzimas E2 tienen dominios N- o C- terminales que le otorgan especificidad en el reconocimiento de las enzimas E3. Si esta unión estuviera mediada solamente por el motivo RING-H2 de las E3, dicha especificidad no debería existir. Necesariamente, regiones adicionales (u otras subunidades) de las enzimas E3 deben estar involucradas en la interacción con las enzimas E2.

Finalmente, otra diferencia encontrada entre nuestro modelo y el de Zheng y col es la interacción entre dRbx1 y la proteína F-box, Slmb. La estructura del complejo SCF^{Skp2} obtenido a partir del cristal muestra que no existiría interacción directa entre estas dos proteínas, sino que ocurriría un acercamiento transiente durante la transferencia de la ubiquitina al sustrato. Es posible que la interacción entre dRbx1 y Slmb, detectada en los ensayos de GST-pull down, no refleje una unión directa sino que haya sido mediada por algún factor presente en el extracto de reticulocitos. Cabe aclarar que si bien los estudios realizados en el sistema de Doble Híbrido de levaduras y los ensayos *in vitro* nos permitieron evidenciar la interacción entre distintos pares de proteínas, estos métodos no nos permiten asegurar que las interacciones ocurren de igual manera *in vivo*.

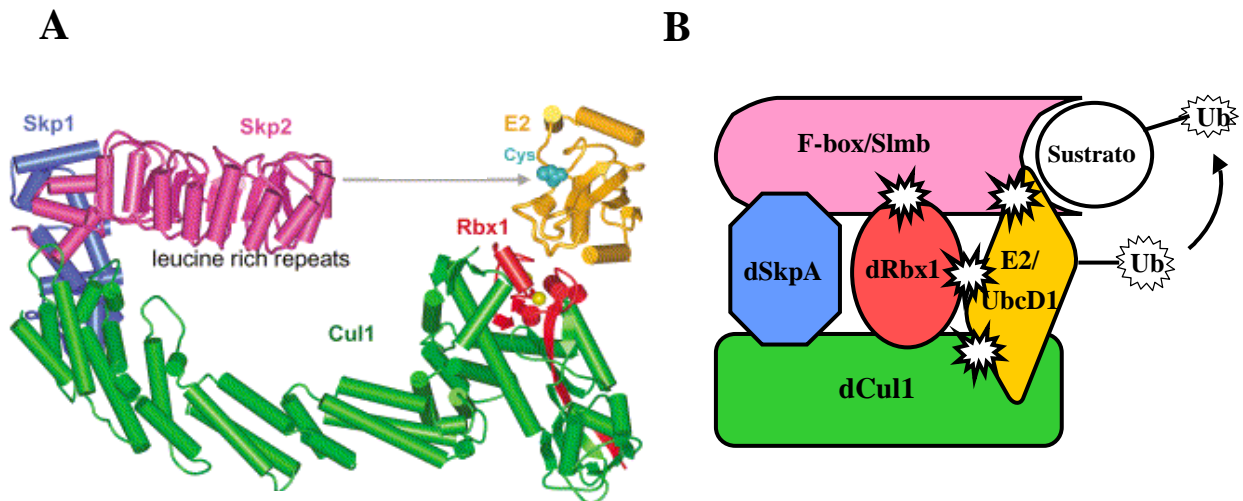


Figura 21: Estructura del complejo SCF. (A) Modelo “ampliado” del complejo SCF^{Skp2} unido a la enzima E2, construido a partir de estructuras cristalográficas obtenidas por Zheng y col. [55, 162, 164]. La proteína Cul1 (en verde) funciona como andamio estructural, uniéndose a través de sus dominios N- y C- terminal a Skp1 (en azul) y a Rbx1 (en rojo), respectivamente. Estas proteínas reclutan, a su vez, a la subunidad con motivo F-box (en rosa) y a la enzima conjugadora de ubiquitina, E2 (en naranja) hacia el núcleo del complejo SCF. Esta conformación permite el posicionamiento del sustrato en el sitio activo de la enzima E2 (Cys, representada en turquesa) y permite que se lleve a cabo la transferencia directa de la molécula de ubiquitina desde la E2 al sustrato. (B) Síntesis de las interacciones halladas para el complejo SCF^{Slmb} de *Drosophila* en este trabajo de tesis. Con una estrella se marcan las diferencias entre nuestro modelo y la estructura cristalográfica reportada por Zheng y col.

Conclusiones

En este primer capítulo de la Tesis hemos identificado por primera vez a las proteínas que componen el núcleo invariante de los complejos SCF de *Drosophila*, dSkpA, dCul1 y dRbx1. Mediante estudios de interacción en el sistema del Doble Híbrido de levaduras y ensayos de interacción *in vitro*, entre proteínas recombinantes expresadas en bacterias y proteínas radiomarcadas sintetizadas en el sistema de reticulocitos de conejo, encontramos que dSkpA y dRbx1 se unen a dCul1 y a la proteína F-box, Slmb, las cuales a la vez, reclutan a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina, UbcD1, al complejo SCF. Asimismo, estudios genéticos de complementación de levaduras, realizados en colaboración con la Dra. Susana Silberstein, confirmaron que la proteína dRbx1 de *Drosophila* es el homólogo funcional de la proteína Rbx1/Hrt1 de *S.cerevisiae*. En conjunto, los resultados obtenidos en la primer etapa de este trabajo de tesis, sumados a evidencias genéticas aportadas por otros grupos, confirman la función de dSkpA, dCul1 y dRbx1 como componentes de los complejos SCF de *Drosophila*.

III- CAPITULO II

Estudio de la función del complejo SCF^{Slimb} en la ovogénesis de *Drosophila melanogaster*

1. Slimb, una proteína con motivo F-box

A mediados de los años 90, Jin Jiang y Gary Struhl llevaron a cabo un *screening* genético, en búsqueda de mutaciones recesivas capaces de alterar el desarrollo de la mosca adulta [128]. Producto de esta búsqueda, identificaron un nuevo gen al que llamaron *slimb* (por *supernumerary limbs*), cuya pérdida de función resulta en la formación de apéndices ectópicos en el adulto. Análisis realizados en discos imaginales mostraron que la pérdida de función de *slimb* provoca la expresión ectópica de *decapentaplegic (dpp)* y de Wingless/Wnt (Wg), lo que conduce al establecimiento de un eje extra de pata o de ala. Estudios por inmunofluorescencia revelaron que la pérdida de función de *slimb* provoca la estabilización de Cubitus interruptus/Gli (Ci), principal efector de la vía de transducción de señales Hedgehog (Hh) y que este factor de transcripción induce la expresión ectópica de Dpp y de Wg. Por otra parte, análisis por *western blot* permitieron determinar que la forma de Ci acumulada en los clones *slimb* corresponde a la variante “larga” de la proteína (Ci-155), responsable de activar la transcripción génica [166]. Consistente con esto, los fenotipos observados en los discos imaginales mutantes para *slimb*, fueron similares a los obtenidos luego de sobre-expresar Hh y a los exhibidos por los mutantes de un elemento negativo de esta vía, la quinasa PKA [167]. Utilizando un segundo alelo mutante de *slimb*, *slimb*^{P1493}, Jiang y Struhl observaron nuevos fenotipos asociados a la activación ectópica de la vía Wg que no habían sido observados anteriormente y encontraron que dichos fenotipos eran causados por la estabilización autónoma de célula del factor de transcripción y efector de la vía Wg, Armadillo/ β -catenina (Arm). Simultáneamente, el grupo de Tian Xu realizaba un *screening* genético para identificar mutaciones recesivas que causaran hiperproliferación celular [168]. Con esta estrategia, Theodosiou y col. identificaron un nuevo gen, al que llamaron *shiva* (re-denominado luego *slimb*), cuya pérdida de función

provocaba la expresión ectópica de los elementos reporteros de respuesta a Hh, *wg-LacZ* y *dpp-LacZ*, en el disco imaginal de pata. Ambos grupos clonaron y analizaron la secuencia de *slmb*, encontrando que la proteína incluye los motivos F-box y WD40 y que tiene alta homología con la proteína F-box de *S. cerevisiae*, Cdc4. En base a estas evidencias, postularon que Slmb actuaría como regulador negativo de las vías de Hh y Wg, formando parte de la maquinaria de ubiquitinación y degradación proteasomal. Jiang y Struhl demostraron, además, que la degradación de Ci y Arm ocurre en aquellos lugares donde las vías Hh y Wg no están activadas y propusieron que Slmb reconocería a Ci y a Arm sólo en ausencia de señal, cuando estos factores han sido fosforilados por las quinasas PKA y GSK3 β , respectivamente. Poco tiempo después, se identificó el ortólogo humano de Slmb, β TrCP (β -Transducin repeats-Containing Protein), formando parte de un complejo SCF con actividad de ubiquitín ligasa sobre β -catenina e I κ B [99].

Durante los últimos cinco años, se publicaron numerosos reportes que involucraron a Slmb en distintos procesos fisiológicos. Se encontró que Slmb regula la duplicación de centrosomas en neuroblastos larvales [169], que es necesario para reprimir la respuesta inmune dependiente de Relish [170], que participa en ritmos circadianos regulando los niveles de Period y Timeless [171, 172], que controla la división celular a través de la eliminación del inhibidor Emi1 durante la anafase [102] y que media la degradación del factor de transcripción E2F durante la fase S del ciclo celular [173]. Como se ha descrito para otras proteínas F-box, Slmb no reconoce un único sustrato, sino que aparentemente regula un grupo pequeño de proteínas. Con el objeto de identificar nuevos sustratos y procesos biológicos en los que participa la proteína F-box Slmb, nos propusimos estudiar su función en el desarrollo, utilizando el ovario de *Drosophila* como modelo experimental.

2. El ovario de *Drosophila* como sistema modelo

El ovario de *Drosophila* representa un excelente modelo para llevar a cabo la caracterización funcional y fisiológica de una proteína, ya que no sólo se conoce sobre su biología, sino que además se han descrito muchas de las vías de transducción de señales involucradas en las distintas etapas de la ovogénesis. Asimismo, existe una amplia variedad de líneas transgénicas que permiten la sobre-expresión de genes involucrados en el desarrollo del ovocito, así como también de líneas *enhancer trap* y anticuerpos que permiten marcar de manera específica a diferentes sub-poblaciones celulares del ovario.

Finalmente, las técnicas de disección, de tinción, de hibridización *in situ* de RNA y el análisis de los preparados al microscopio, pueden hacerse en forma sencilla. Describiremos, a continuación, las principales etapas involucradas en el desarrollo del ovocito de *Drosophila*.

3. La ovogénesis de *Drosophila melanogaster*

El ovario de *Drosophila* está compuesto por 16 a 20 **ovariolas**, cada una de las cuales es un arreglo lineal de **folículos** en estadios progresivos del desarrollo (Fig. 20A,B). El folículo es la unidad fisiológica en la cual se desarrolla el ovocito y está formado por dos linajes celulares: el germinal, que da origen a las gametas, y el somático, que forma el epitelio responsable de transmitir la información espacial al ovocito, de proveerlo de vitelo y de secretar la cubierta proteica (corion) del huevo maduro [174, 175]. La ovogénesis de *Drosophila* se divide en 14 etapas o estadios, en base a las características morfológicas que va adquiriendo el folículo durante su desarrollo (Fig. 20C). El tiempo de maduración del ovocito es de aproximadamente 10 días a 25°C, dependiendo además del estado nutricional y de la edad de la hembra. Completado el desarrollo, el ovocito maduro se desprende de la ovariola, atraviesa el oviducto y se fecunda al pasar junto a la espermateca (Fig. 20A). El huevo que deposita la hembra está cubierto por un corion proteico que lo protege de la desecación y le otorga resistencia a las condiciones adversas del medio ambiente (se describe más adelante).

3.1 Primeras etapas de la ovogénesis: el germario

Como hemos mencionado, el folículo es la unidad discreta en donde se produce la maduración del ovocito. Los folículos se ensamblan en el **germario**, una pequeña estructura situada en el extremo anterior de cada ovariola (Fig. 20C), en donde residen las células madre de las líneas germinal y somática. El germario se divide en tres regiones morfológicas: I, IIA/B y III (Fig. 21A). En la región I se encuentra el “nicho fisiológico” que alberga a dos o tres células madre de la línea germinal (CMG). Este nicho es mantenido por dos tipos de células somáticas quiescentes, las células del **filamento terminal** y las células del **capuchón (cap)**, que secretan los factores necesarios para que las células madre permanezcan indiferenciadas [176, 177].

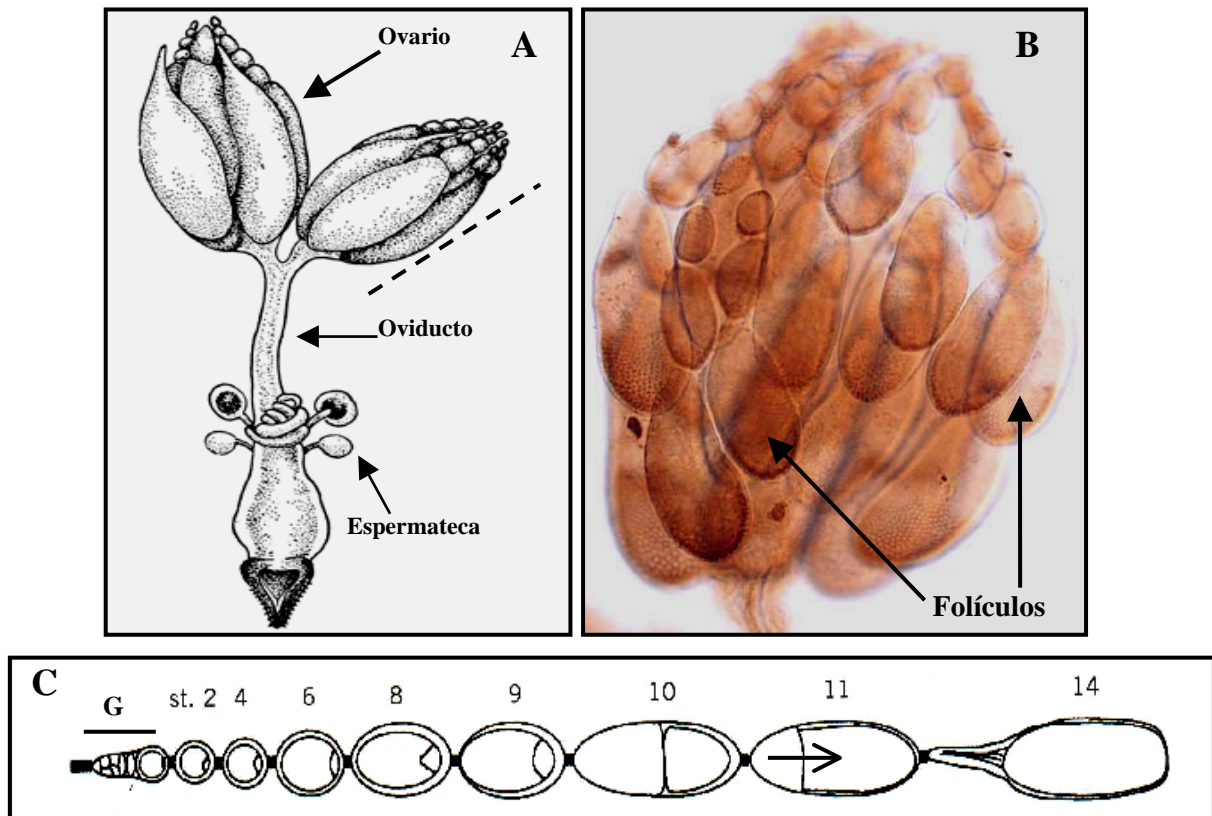


Figura 20: El ovario de *Drosophila*. (A) Los ovarios están formados por unidades llamadas ovarioles (se indican con línea de puntos), compuestas a su vez por varios folículos en estadios progresivos del desarrollo. Finalizada la ovogénesis, el huevo se desprende de la ovariola, atraviesa el oviducto y se fecunda al pasar junto a la espermateca. (B) Fotografía de un ovario, en donde se distinguen los distintos folículos que componen cada ovariola. (C) Dibujo de una ovariola en la que se esquematizan las distintas etapas de la ovogénesis. En el extremo anterior se encuentra el germario (G), estructura en la cual se ensamblan los diferentes folículos. A medida que avanzan en el desarrollo, los folículos van incrementando su tamaño. A partir del estadio 6 puede distinguirse el vitelo del ovocito (etapas vitelogénicas). Entre los estadios 8 y 10, el ovocito incrementa rápidamente su tamaño, llegando a ocupar la mitad del folículo. Entre los estadios 11 y 13, las células nodrizas vierten el contenido de sus citoplasmas al interior del ovocito (flecha), muriendo luego por apoptosis. En el estadio 14, el ovocito ocupa completamente el folículo.

El proceso de ovogénesis comienza cuando la CMG se divide asimétricamente, en dirección antero-posterior, generando dos células hijas: una que permanece como célula madre y otra que se diferencia como cistoblasto. El cistoblasto lleva a cabo cuatro divisiones mitóticas con citoquinesis incompleta y da origen a un **cisto** de 16 células que permanecen interconectadas por grandes canales citoplasmáticos, denominados **canales circulares o canales ring**. Sólo una de las dos células que tiene cuatro canales *ring* va a diferenciarse como ovocito, mientras que las otras 15 asumirán destino de células nodrizas (ver Fig. 21B) [178]. Las CMG se dividen lenta, pero constantemente y generan cistoblastos que se ubican en las regiones I y IIA del germario (Fig. 21A). En estas regiones, la separación entre ellos es mantenida por un tercer tipo de células somáticas

quiescentes, llamadas **células de cubierta**. Estas células forman la pared de la zona más anterior del germario y emiten prolongaciones citoplasmáticas que se intercalan entre los cistos en desarrollo, asegurando que los mismos queden separados unos de otros (Fig. 21A) [179].

El cisto continúa desplazándose hacia la región posterior del germario, mientras ocurren cambios en su morfología. Al llegar al límite entre las regiones IIA y IIB, el cisto adopta apariencia de disco plano, ocupando todo el ancho del germario (Fig. 21A). En este lugar, las células madre del linaje somático/folicular (CMF) que se encuentran en activa división, dan origen a células foliculares indiferenciadas, que comienzan a migrar envolviendo al cisto (Fig. 21A). Al alcanzar la región III del germario, el cisto ha retomado su forma esférica, el ovocito se sitúa en su parte posterior y las células foliculares rodean completamente al cisto, formando un epitelio continuo. Cuando el folículo abandona el germario, se han diferenciado tres sub-poblaciones de células foliculares: 5 a 8 células del “tallo”, que separan a cada folículo de su folículo adyacente; dos pares de células polares situadas a ambos extremos del folículo y un epitelio folicular, que envuelve completamente al cisto (se describe más adelante, Fig.21A). Este momento se define como el estadio 1 de la ovogénesis.

3.2 El proceso de encapsulación

La encapsulación del cisto por parte del epitelio folicular involucra tres procesos fundamentales: 1) la proliferación de las células foliculares, 2) la migración de estas células sobre el cisto y 3) la diferenciación de las células interfoliculares que separan a un folículo de su folículo adyacente. Fallas en cualquiera de estos tres procesos conducen al desarrollo de folículos que contienen un número anormal de células germinales, o que se fusionan con el folículo vecino.

Como se ha mencionado, la proliferación de las células foliculares comienza en el germario, con la división de las CMF que residen en el límite entre las regiones IIA y IIB. Dicha proliferación es regulada principalmente por la vía Hedgehog (Hh) y requiere de los componentes Patched (Ptc, receptor de Hh) y Ci, para transducir la señal [180, 181]. Hh se expresa selectivamente en las células cap y en las células del filamento terminal y actúa sobre las CMF, que comienzan a dividirse originando células precursoras indiferenciadas. Se ha reportado que la pérdida de función de *hh* provoca el arresto de la división de las

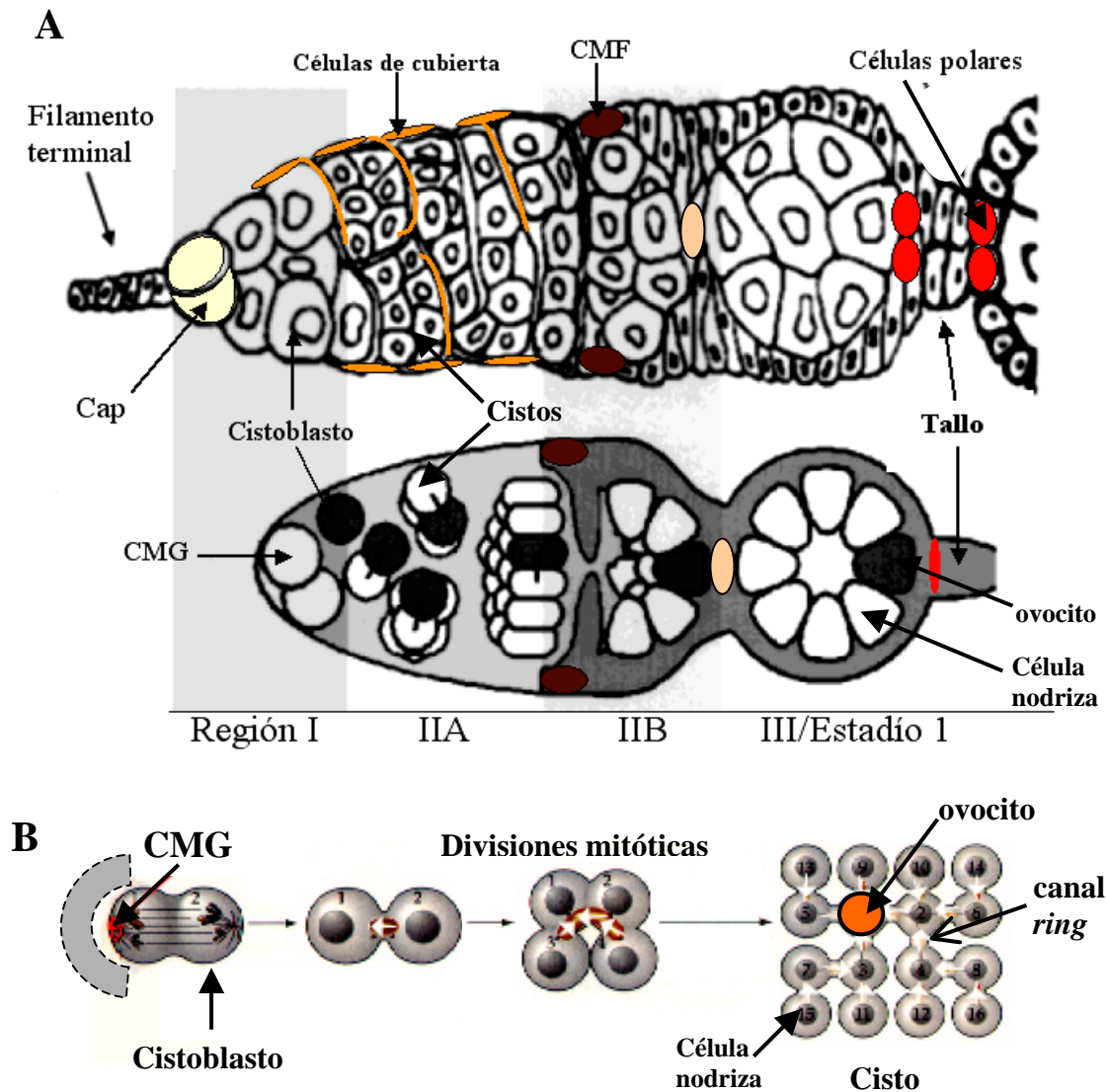


Fig. 21: El germinario de *Drosophila* (A) Esquema del germinario, en el que se distinguen tres regiones morfológicas. I, IIA/B y III. En la región I, la célula madre germinal (CMG) se divide, originando una nueva célula madre y cistoblasto que comenzará a diferenciarse. El nicho fisiológico de la CMG es mantenido por las células del filamento terminal y por las células del capuchón (cap). En la región IIA, los **cistoblastos** se dividen, originando **cistos** de 16 células germinales que permanecen interconectadas por grandes canales citoplasmáticos. La separación entre ellos es mantenida inicialmente por las células **somáticas de cubierta**, que emiten proyecciones citoplasmáticas que se intercalan entre los cistos. Al llegar a la región IIB, el cisto se ha aplanado como un disco y ocupa todo el ancho del germinario. En ese lugar se encuentran las células madre somáticas (CMF) dividiéndose activamente, generando células foliculares indiferenciadas. Conforme el cisto se desplaza posteriormente, las células foliculares (pintadas de gris) migran sobre él hasta envolverlo. Al mismo tiempo, en la región IIB, un grupo de células foliculares deja de dividirse (se muestran en naranja) para dar origen al linaje precursor de las células polares y las células del tallo. Al llegar a la región III, el cisto ha retomado su forma esférica, el ovocito se dispone en el extremo posterior y las células foliculares rodean completamente al cisto. Al emerger del germinario, ya se han diferenciado tres sub-poblaciones de células foliculares: dos pares de células polares (en rojo), 5 a 8 células del tallo que separan un cisto del cisto vecino, y un epitelio folicular, que envuelve al cisto. En ese momento, se define el estadio 1 de la ovogénesis (Fig. adaptada de Dobens *et. al.*, 2000). (B) Generación del cisto. La CMG se divide asimétricamente, generando una nueva CMG que permanece en el nicho fisiológico (representado como un semicírculo gris) y un **cistoblasto**. El cistoblasto lleva a cabo cuatro rondas de mitosis con citoquinesis incompleta, generando un **cisto** de 16 células que quedan unidas por grandes canales citoplasmáticos (canales *ring*). Sólo una de las dos células que presentan cuatro canales *ring* va a desarrollarse como **ovocito** (en rojo), mientras que las otras 15 células asumirán el destino de **células nodrizas**.

células foliculares del germario [181], mientras que la sobre-expresión de Hh o la generación de clones mutantes *ptc* en el linaje somático produce un incremento dramático de la cantidad de células foliculares en división [180, 181]. Por otro lado, se ha reportado que la vía Notch también está involucrada en la proliferación de las CMF, activándose a partir de la interacción entre el linaje germinal y el linaje somático, durante el proceso de encapsulación del cisto [182].

La primera ronda de diferenciación del linaje folicular ocurre tempranamente en el germario, cuando un pequeño grupo de células foliculares deja de dividirse y da lugar al linaje precursor de **las células polares** y **las células del tallo**. En este proceso, también están involucradas las vías Hh y Notch [181-186]: se demostró que la hiperactivación de la vía Hh en el germario provoca la diferenciación de células polares ectópicas y la desaparición de marcadores específicos de células del tallo [181], a través de un mecanismo mediado por el factor de transcripción, Eyes Absent [184]. A su vez, la generación temprana de clones mutantes *notch* o de su modulador *fringe* en el linaje somático, como así también la depleción del ligando Delta de la línea germinal, mantienen a las células foliculares en estado indiferenciado, impidiendo que se formen tanto las células polares como las células del tallo [183, 187]. El resto de las células foliculares continúa dividiéndose y constituye el **epitelio folicular**, que permanecerá aún indiferenciado (ver Fig. 26).

Se ha demostrado que la especificación de estas tres sub-poblaciones foliculares en el germario es esencial para que el proceso de encapsulación ocurra adecuadamente: mutaciones que causan una menor proliferación de las células foliculares, como así también aquellas que impiden la diferenciación de las células polares o de las del tallo, llevan a la formación de folículos compuestos o parcialmente fusionados, en los que varios cistos se encuentran encerrados en un mismo epitelio folicular [181, 188-190]. Por otra parte, la proliferación excesiva del linaje somático también provoca defectos en la encapsulación del cisto, ya que interfiere con la normal interacción entre el linaje germinal y el linaje somático [181].

En resumen, para que el proceso de encapsulación ocurra normalmente, se requiere tanto la proliferación adecuada de las células foliculares del germario, como la diferenciación normal de las células polares y las células del tallo.

3.3 Desarrollo del linaje germinal

Una vez que el folículo se ha ensamblado, las células germinales del cisto inician un programa de desarrollo que involucra una constante interacción con el epitelio folicular. Al abandonar el germario, el núcleo del ovocito, que hasta ese momento estaba transcripcionalmente activo, arresta la expresión génica y entra en meiosis, permaneciendo quiescente hasta el final del desarrollo. Por el contrario, entre los estadios 1 y 6 de la ovogénesis, las células nodrizas llevan a cabo cinco rondas de replicación endocíclica del ADN sin segregación de las cromátidas hermanas, incrementando notablemente el tamaño de sus núcleos (se generan núcleos politénicos) [191]. Dado que la función de las células nodrizas es proveer al ovocito de proteínas y mRNAs, que serán requeridos para el desarrollo del futuro embrión, la endorreplicación del genoma permite una alta tasa de expresión génica y facilita la producción de gran cantidad de nutrientes. Por otro lado, los estadios 1 a 6 del desarrollo transcurren sin aumento notable del volumen del cisto y sin acumulación evidente de vitelo en el ovocito, razón por la cual se los conoce como “estadios pre-vitelogénicos”.

A partir del estadio 6, el tamaño del folículo comienza a aumentar rápidamente. Las células nodrizas sintetizan proteínas y mRNAs que son transportados a través de los canales *ring* al interior del ovocito, en un proceso dependiente del citoesqueleto [192, 193]. Al mismo tiempo, los cromosomas de las células nodrizas se descondensan y llevan a cabo otras seis rondas de replicación endocíclica en las que sólo se duplican las regiones de eucromatina, convirtiéndose así en células poliploides (transición de politenia a poliploidía) [194]. Entre los estadios 8 y 10, el ovocito acumula la mayor cantidad de vitelo, incorporando proteínas, gránulos de carbohidratos y gotas de lípidos, que provienen principalmente del cuerpo graso y de la hemolinfa de la hembra. A su vez, una cantidad importante de “vitelogeninas” son sintetizadas por las células foliculares e incorporadas por el ovocito a través de vesículas endocíticas [195, 196]. En el estadio 10 de la ovogénesis, el folículo ha incrementado dramáticamente su tamaño y el ovocito ocupa la mitad del volumen del cisto.

A partir de ese momento, entre los estadios 11 y 13, las células nodrizas dejan de replicar su genoma y desencadenan una cascada de eventos que finalizan en su muerte por apoptosis. Esta cascada comienza con la ruptura de la membrana nuclear, continuando con la permeabilización de la membrana plasmática, el rearrreglo del citoesqueleto de actina y el rápido vertido del contenido del citoplasma en el interior del ovocito a través de los

canales *ring* (proceso de “dumping”). Este evento conduce a una segunda fase de incremento rápido del volumen del vitelo del ovocito [197]. Se ha reportado que la pérdida de función de los reguladores del ciclo celular E2F1 y Dp inhibe tanto el proceso de dumping como la apoptosis de las células nodrizas, sugiriendo que ambos procesos se encuentran acoplados [198]. Como consecuencia de estos defectos, el ovocito no acumula suficiente cantidad de vitelo, generándose de este modo huevos con un tamaño mucho menor al salvaje [198, 199]. En los últimos estadios del desarrollo (13-14), el proceso de dumping se ha completado y los núcleos de las células nodrizas han desaparecido. En este momento, las células foliculares depositan una cubierta proteica alrededor del ovocito, completando con este evento el proceso de maduración del huevo (se describe luego).

3.4 Desarrollo y diferenciación del linaje somático-folicular

Al mismo tiempo que la línea germinal se desarrolla, las células del linaje somático llevan a cabo sucesivas rondas de diferenciación, dando lugar a distintas sub-poblaciones foliculares con características particulares. A continuación, se describen dichos eventos de diferenciación (resumido en Fig. 26).

3.4.1 Diferenciación de los dominios terminales del epitelio folicular: Hemos mencionado que al salir del germario, el folículo presenta tres sub-poblaciones de células somáticas: las células del tallo, las células polares y las células del epitelio folicular⁴. Esta última sub-población somática continúa dividiéndose mitóticamente hasta el estadio 6 de la ovogénesis, formando una monocapa de 1000 células que rodean al cisto. Simultáneamente, el epitelio folicular inicia una nueva ronda de diferenciación, que definirá los primeros dominios de este epitelio [200]. Se ha demostrado que las células polares cumplen un rol esencial en este proceso, actuando como “centros organizadores” de la diferenciación [201]. Entre los estadios 4 y 5 de la ovogénesis, los dos pares de células polares situados en los extremos anterior y posterior del folículo, secretan la proteína Unpaired (Upd), ligando de la vía de señalización de JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) [202]. El ligando Upd forma un gradiente sobre las células foliculares vecinas, induciendo la activación de la vía de JAK/STAT en un dominio de 200 células, situadas alrededor de cada par de

⁴ En rigor, el epitelio folicular incluye a las células polares. A fin de simplificar las explicaciones nombramos por separado a estas dos sub-poblaciones foliculares.

células polares [203]. De esta manera quedan definidos los así llamados **dominios terminales** del epitelio folicular (Fig. 22A). El resto de las células foliculares que no recibe el ligando Upd, constituye el **dominio central** del epitelio folicular (Fig. 22A). Los dominios terminales difieren del dominio central, en cuanto a que sólo los primeros serán capaces de responder a la señal temprana de la vía del Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) [204, 205] proveniente del ovocito (se describe más adelante). A su vez, según la proximidad a la fuente de ligando, los dominios terminales van a dividirse en distintas sub-poblaciones (Fig. 22B), que asumirán diferentes destinos celulares en la próxima ronda de diferenciación del epitelio.

3.4.2 Establecimiento del eje antero-posterior del folículo: Si bien los dominios terminales anterior y posterior son en un principio equivalentes [206], la simetría se quiebra rápidamente cuando la señal de Gurken/TGF- α (Grk), proveniente del ovocito [207], activa la vía del EGFR en las células foliculares inmediatamente adyacentes, especificando cuál de estos dominios será el **dominio terminal-posterior** (Fig. 22C) [208]. Grk tiene la particularidad de ser la única proteína cuyo transcripto se sintetiza en el núcleo del ovocito; las secuencias 3' y 5' no-codificantes de su mRNA controlan la localización y traducción del transcripto, de manera que la proteína Grk queda concentrada específicamente en la periferia de la membrana nuclear del ovocito (Fig. 22C) [209, 210]. Si bien Grk se expresa desde estadios muy tempranos de la ovogénesis, las células foliculares son competentes para recibir su señal sólo cuando han adquirido el destino de dominio terminal [206]. Se ha demostrado que tanto el receptor de Grk, el EGFR [211], como distintos elementos involucrados en la transducción de su señal (ej. Ras y Raf) [212, 213] cumplen su función en el epitelio folicular. En ausencia de Grk, las células foliculares terminal-posteriores expresan marcadores de dominio terminal-anterior, como *decapentaplegic (dpp)* [208, 214]. Contrariamente, la expresión de una forma constitutivamente activa del EGFR en el epitelio folicular induce a las células terminal-anteriores a expresar marcadores de dominio terminal-posterior (ej. *pointed*) [215, 216]. De esta manera, la activación de la vía del EGFR en el epitelio folicular, inducida por la proteína de origen germinal, Grk, da lugar al establecimiento del eje antero-posterior (A/P) del folículo.

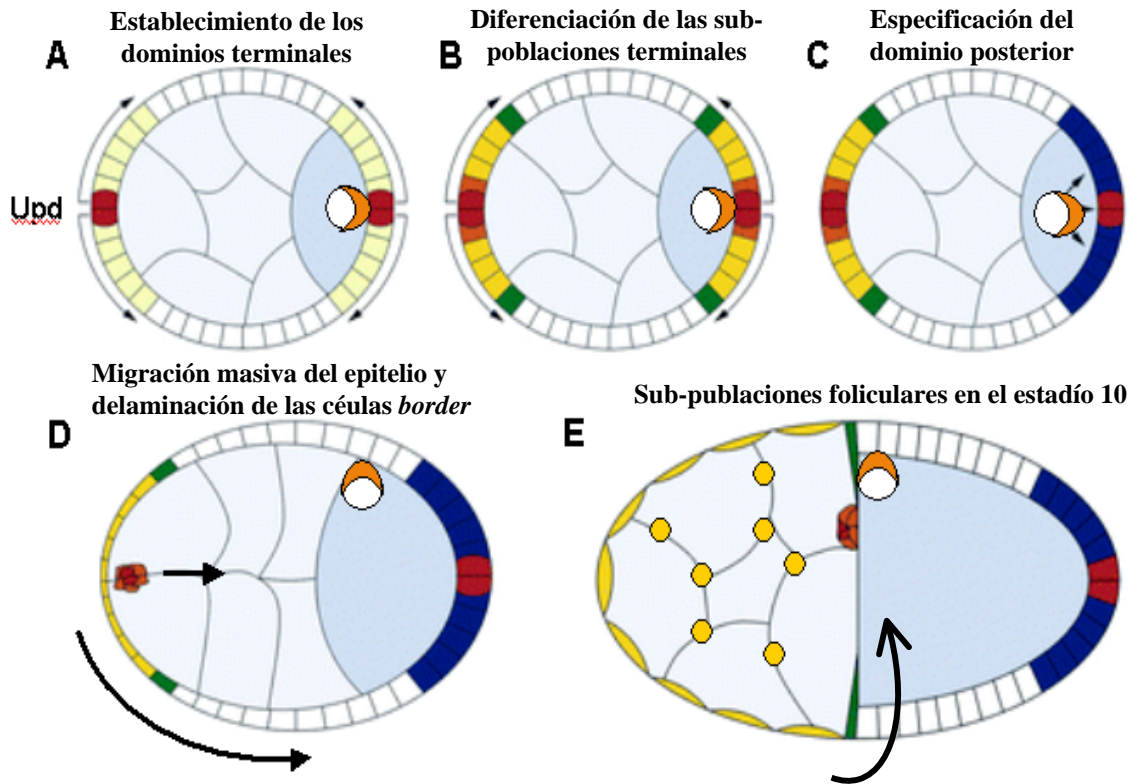


Figura 22: Establecimiento del eje antero-posterior del epitelio folicular. Representación de folículos de estadios 5-6 (**A-C**), 9 (**D**) y 10 (**E**). En cada caso se marca la posición del núcleo del ovocito (en blanco), que lleva asociada a la proteína Gurken (medialuna naranja). (**A**) En el estadio 5 de la ovogénesis, los dos pares de células polares (en rojo) situados a ambos extremos del folículo secretan el ligando Unpaired (Upd), generando un gradiente de activación de la vía de JAK/STAT en un dominio de 200 células adyacentes a cada par de células polares. De esta manera, los dominios de células que reciben ligando Upd se diferencian como **dominios terminales** (amarillo), mientras que las células que no reciben señal Upd constituyen el **dominio central** del epitelio folicular (blanco). (**B**) Según los niveles de ligando recibidos, las células de cada dominio terminal se sub-dividen en tres poblaciones (verde-amarillo-naranja). (**C**) Si bien en un principio los dos dominios terminales son equivalentes, la simetría se quiebra cuando en el estadio 6, la proteína Gurken proveniente del ovocito, activa la vía del EGFR en las células foliculares más próximas, especificando lo que será el dominio **terminal-posterior** dentro del folículo (azul). (**D**) En el estadio 8-9 de la ovogénesis, las células del dominio **terminal-anterior** llevan a cabo una segunda ronda de diferenciación, especificándose las sub-poblaciones de células *border* (en naranja), las células centrípetas (en verde) y el epitelio asociado a las nodrizas (en amarillo). Las células *border*, junto a las células polares, se delaminan del epitelio folicular y comienzan a migrar hacia la región posterior del folículo, abriéndose paso entre las células nodrizas. Al mismo tiempo, ocurre un evento de migración masiva en el epitelio folicular (flecha), lo que conduce al rearrreglo de todas las sub-poblaciones celulares dentro del folículo. (**E**) En el estadio 10 de la ovogénesis, cuando finaliza el evento de migración, el grupo de células *border* (que incluyen a las células polares) se sitúa en el extremo anterior y dorsal del ovocito, en la región alénea al núcleo del mismo. Por otro lado, las células asociadas a las nodrizas forman un epitelio fino sobre la región anterior del folículo (en amarillo) y las células centrípetas, que migraron perpendicularmente al eje del epitelio (flecha), cubren el extremo anterior del ovocito. Las células del dominio central y las del dominio terminal-posterior se compactan sobre las regiones lateral y posterior del folículo y junto con las células centrípetas constituyen el epitelio columnar que rodea al ovocito. En estadios posteriores, el epitelio columnar sintetizará la cubierta proteica del huevo (Fig. adaptada de Deneff *et al.*[217]).

3.4.3 Diferenciación de sub-poblaciones foliculares en el dominio terminal-anterior:

Habiéndose determinado el dominio terminal-posterior, el dominio terminal-anterior lleva a cabo una nueva ronda de diferenciación. En el estadio 7-8 de la ovogénesis, el gradiente de activación de la vía JAK/STAT, generado por el ligando Upd (ver sección 3.4.1), conduce a la división de este dominio en tres sub-poblaciones celulares: las 5 a 8 células más cercanas a las células polares se diferencian como **células “border”**, un segundo grupo de 40 células un poco más distantes, se diferencian como el epitelio **“asociado a las nodrizas”**. Finalmente, un tercer grupo de aproximadamente 150 células que reciben los niveles más bajos de Upd, se diferencian como **células “centrípetas”** (Fig. 22C) [203]. El grupo de células *border* recibe una alta concentración del ligando Upd y en respuesta, comienza a expresar al factor de transcripción Slow border cells (Slbo) [218]. Se ha demostrado que la aparición de células polares ectópicas en la región anterior del epitelio folicular provoca la diferenciación de grupos extra de células *border* [201, 219], mientras que la ablación de las mismas impide que las células *border* se diferencien, demostrando que las células polares son necesarias y suficientes para especificar a esta sub-población folicular [201].

En el estadio 9 de la ovogénesis, el grupo de células *border*, junto con el par de células polares, se delaminan del epitelio folicular y comienzan a migrar abriéndose paso entre las células nodrizas (Fig. 22D). Algunos aspectos de este proceso de migración han sido bien caracterizados [220]: se sabe que la expresión de Upd en las células polares sigue siendo necesaria para que la migración tenga lugar, así como también se sabe que se necesita, en las células *border*, al transductor de su señal, STAT [221], al receptor de FGF, Breathless y a la molécula de adhesión, DE-cadherina [222].

Por otro lado, la migración de las células *border* responde a señales provenientes del ovocito. En una primera etapa, el ligando PVF1 (PDGF/VEGF factor 1) proveniente del ovocito activa al receptor tirosina/quinasa PVR, (homólogo a PDGF/VEGF de mamíferos) en el grupo de células *border*, induciendo su migración hacia la región posterior del folículo [223]. Habiendo alcanzado el borde anterior del ovocito, la señal de Grk atrae a las células *border*, induciéndolas a migrar hacia la parte dorsal del folículo, a una posición aledánea al núcleo del ovocito (Fig. 22E) [224]. Alteraciones en la localización de los ligandos Grk ó PVF1, así como también la pérdida de función de los receptores EGFR ó PVR en las células *border*, provocan que las mismas migren

erráticamente o anulen completamente su migración, impidiendo que alcancen su destino final [223, 224].

Al mismo tiempo que ocurre la migración posterior de las células *border*, un evento de migración masiva tiene lugar en el epitelio folicular (Fig. 22D). Entre los estadios 9 y 10 de la ovogénesis, todas las sub-poblaciones foliculares se desplazan coordinadamente en dirección posterior, lo que provoca un cambio en la morfología y un reordenamiento de dichas sub-poblaciones dentro del folículo. En el estadio 10, cuando finaliza este evento de migración, la estructura del epitelio folicular es la siguiente (Fig. 22E): las células foliculares **asociadas a las nodrizas** forman un epitelio muy delgado que cubre la mitad anterior del folículo (donde se encuentran las células nodrizas); las **células centrípetas** han migrado en dirección perpendicular al resto del epitelio (centrípetamente) y se disponen formando una monocapa sobre la cara anterior del ovocito; las células del **dominio central** y las del **dominio terminal-posterior** forman un epitelio compacto sobre las regiones laterales y posterior del ovocito [200]. A partir de este momento, las sub-poblaciones foliculares que rodean al ovocito (centrípetas, dominio central y dominio terminal-posterior) van conformar el “**epitelio columnar**” (dada la forma característica que han adquirido estas células), que a continuación llevará a cabo una última ronda de diferenciación celular.

3.4.4 Determinación del eje dorso-ventral del folículo: Durante el estadio 6-7 de la ovogénesis, la polarización antero-posterior que ha adquirido el epitelio folicular es transmitida al ovocito. Una vez que las células foliculares del dominio terminal-posterior han activado la vía del EGFR en respuesta a Grk (ver sección 3.4.2), estas células emiten una señal reversa hacia el ovocito (cuya naturaleza no se conoce) que provoca la re-polarización de su citoesqueleto. Hasta ese momento, el centro organizador de los microtúbulos (MTOC) del ovocito estaba localizado en la región más posterior del cisto, nucleando los extremos “negativos” de los microtúbulos, lugar donde se encontraba también anclado el núcleo del ovocito (ver Fig. 22A-C). En respuesta a la señal reversa, el MTOC se desensambla y los microtúbulos se nuclean en la región anterior y lateral de la corteza del ovocito, invirtiéndose así la polaridad del citoesqueleto [225]. Al mismo tiempo, la inversión de la polaridad de los microtúbulos provoca la migración cortical del núcleo hacia la región anterior del ovocito, con el consiguiente desplazamiento de la fuente de Grk (ver Fig. 22 D,E). Como consecuencia, en el estadio 9, las células columnares más próximas al núcleo del ovocito reciben la

señal de Grk y desencadenan una nueva ronda de activación de la vía del EGFR, determinando así el **dominio dorsal** del epitelio columnar y por lo tanto, el eje dorso-ventral (D/V) del folículo (Fig. 23A). Inmediatamente después, las células del epitelio columnar secretan la membrana vitelina del huevo (ver sección 3.4.6) [226], impidiendo que Grk continúe activando al EGFR. Sin embargo, la activación de la vía iniciada por Grk en el epitelio columnar desencadena una cascada autócrina de activación del EGFR en las células del **dominio dorsal** [227], que se inicia con la expresión del gen blanco *rhomboid* (*rho*), el cual actúa como activador de la vía (Fig. 23B-C) [227, 228]. En el estadio 10 de la ovogénesis, los niveles de activación de la vía del EGFR alcanzados por las células “más dorsales” del **dominio dorsal**, inducen la transcripción de un gen llamado *argos*, que es blanco de la vía del EGFR y al mismo tiempo funciona como inhibidor de dicha vía (Fig. 23B). Argos se expresa sobre la línea media dorsal y provoca la inhibición local de la vía del EGFR, dividiendo a este dominio en dos parches que siguen expresando Rho, separados por un dominio intermedio en donde Rho no se expresa (Fig. 23B-C).

Simultáneamente, la cascada de activación del EGFR iniciada por Grk, provoca la represión de la transcripción del gen *pipe* en el dominio dorsal del epitelio columnar, de modo que su expresión queda restringida a la región ventral y lateral del epitelio columnar (Fig. 23B) [229, 230]. Pipe desencadenará una cascada enzimática en las células foliculares ventrales, cuya función última será transmitir la polaridad dorso-ventral del folículo, al futuro embrión en desarrollo [231].

Al mismo tiempo que la vía del EGFR se activa en el dominio dorsal del epitelio columnar, la vía de Dpp señala a estas células desde el dominio anterior del folículo. Dpp se expresa en todas las células derivadas del dominio terminal-anterior del epitelio folicular (células asociadas a nodrizas, células *border* y células centripetas) y genera un gradiente de activación de la vía sobre la región anterior del epitelio columnar (Fig. 23C). En respuesta a la interacción de las vías del EGFR y de Dpp, los dos grupos de células dorsales que siguen expresando Rho transcriben activamente el gen *Broad-Complex* (*BR-C*) [232], especificando así las células que darán origen a los apéndices dorsales del corion (Fig. 23C-D, detallado en la sección 3.6) [233].

En resumen, la segunda ronda de activación de la vía del EGFR en las células foliculares lleva a la diferenciación de los **dominios dorsal y ventral del epitelio columnar**, generando de este modo las señales que establecerán el eje D/V del futuro embrión.

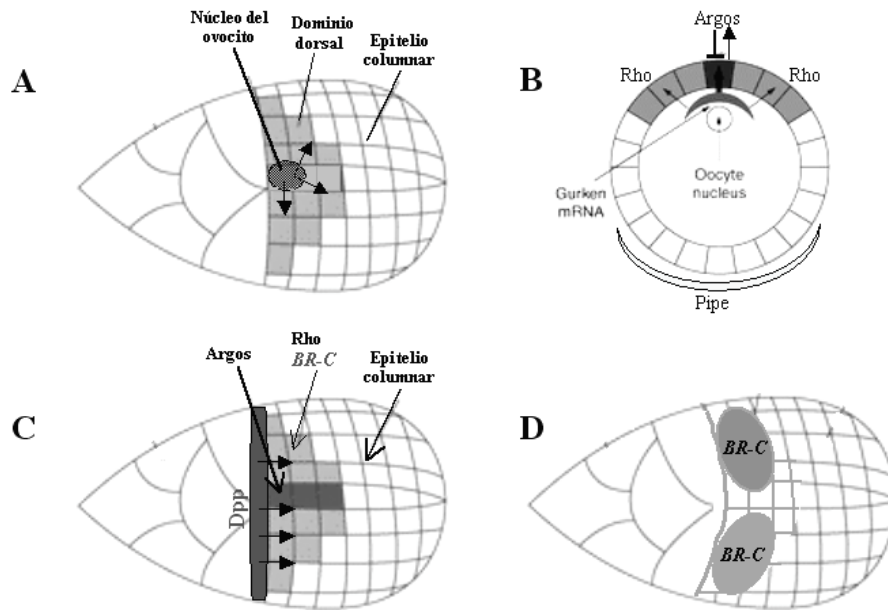


Figura 23: Establecimiento del eje dorso-ventral del epitelio folicular. **(A)** En el estadio 9-10, la proteína Grk (indicada como flechas sobre el núcleo del ovocito) inicia una segunda ronda de activación de la vía del EGFR en la región anterior del epitelio columnar, especificando así el dominio dorsal del foliculo (en gris). **(B)** La activación del EGFR provoca la expresión de Rhomboid (Rho), lo que desencadena un evento de activación autócrina del EGFR en las células del dominio dorsal. En el estadio 10, el alto grado de activación alcanzado en la región más dorsal del epitelio induce la expresión del regulador negativo de esta vía, Argos, en las células foliculares de la línea media dorsal, provocando la partición del dominio de expresión de Rho. Simultáneamente la expresión de *pipe* se reprime en el dominio dorsal, quedando restringida a la región ventro-lateral del epitelio columnar **(B)**. **(C)** Mientras Grk señala la región dorsal, el ligando Dpp genera un gradiente de activación de su vía sobre las células anteriores del epitelio columnar (indicado con flechas). La activación simultánea de las vías del EGFR y Dpp induce la transcripción del gen *BR-C* en dos parches de células dorsales, que son las que luego darán origen a los apéndices dorsales del corion **(D)**.

3.5 La cubierta del huevo

Hasta aquí hemos detallado cómo ocurre la diferenciación de las células somáticas a distintas sub-poblaciones foliculares con funciones específicas. A continuación, se describe el rol del epitelio folicular en la secreción de la cubierta proteica del huevo, que protegerá al futuro embrión en desarrollo de las condiciones hostiles del medio ambiente.

Entre los estadios 8 y 14 de la ovogénesis, el epitelio columnar que rodea al ovocito sintetiza y secreta las proteínas que van a formar parte de la cubierta del huevo. Esta cubierta debe ser lo suficientemente fuerte como para soportar las condiciones adversas del medio ambiente, a la vez que impide la pérdida de agua y permite el intercambio de gases con el exterior [226]. La cubierta del huevo comprende básicamente tres capas: 1) una **membrana vitelina**, que se encuentra en contacto directo con el ovocito, 2) una **capa coriónica interna** y 3) un **corion proteico**, que se divide a su vez en endocorion y exocorion, según componentes y características estructurales.

La **membrana vitelina** en el huevo maduro es una estructura rígida, capaz de mantener su forma aún si se retiran las capas más externas de la cubierta. Las proteínas que forman esta membrana comienzan a sintetizarse en el estadio 8 de la ovogénesis y a secretarse en el estadio 9, acumulándose en pequeñas vesículas. En el estadio 10, estas vesículas se fusionan rápidamente y las proteínas se unen entre sí covalentemente, formando una membrana uniforme alrededor del ovocito. La membrana vitelina refleja la polaridad antero-posterior y dorso-ventral del epitelio que la secretó: la región dorsal es más aplanada que la ventral, mientras que el extremo anterior presenta una estructura llamada micrópilo (Fig. 24A). El **micrópilo** es secretado específicamente por el grupo de **células border** y presenta un canal central pequeño por donde ingresa el espermatozoide durante la fecundación del ovocito.

Por otro lado, la **capa coriónica interna** es una membrana fina de estructura cristalina, cuya función es impedir la deshidratación del huevo a partir del momento en que el mismo es depositado en el exterior. La tercer capa, **el corion proteico**, es el componente estructural involucrado en el transporte de gases, al tiempo que otorga resistencia ante injurias mecánicas. Las proteínas que forman el corion comienzan a sintetizarse en el estadio 11 de la ovogénesis y son depositadas por las células columnares, siguiendo un estricto orden temporal. En el estadio 14, las células foliculares del epitelio columnar mueren y su impronta queda reflejada en el corion proteico (Fig.24B). A continuación, se describen las características más sobresalientes de su morfología.

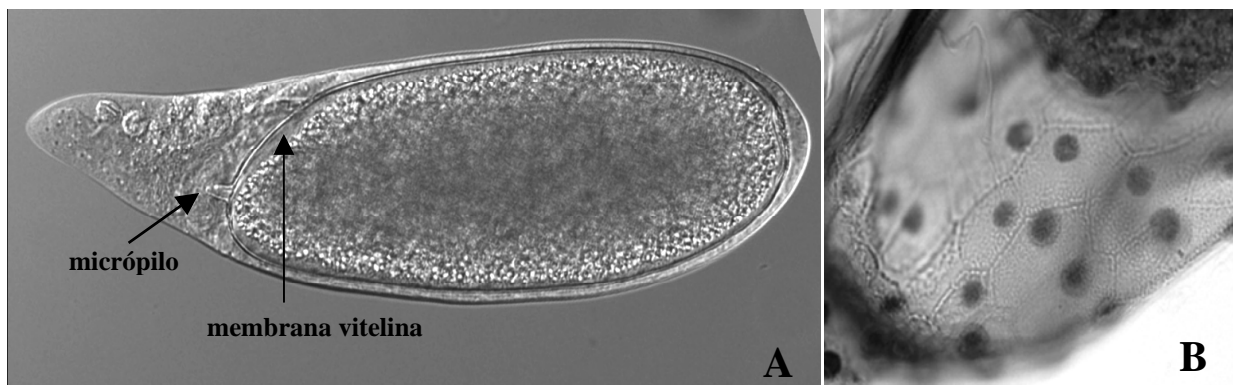


Fig. 24: La cubierta del huevo. **(A)** Folículo de estadio 12 en el que se observa la membrana vitelina que rodea al ovocito. Esta membrana es sintetizada por las células del epitelio columnar. En el extremo anterior del ovocito se observa el micrópilo, estructura por donde entrará el espermatozoide durante la fecundación. El micrópilo es generado por el grupo de células *border*. **(B)** En los últimos estadios de la ovogénesis las células foliculares secretan el corion proteico del huevo. En la microscopía se observa que el corion lleva la impronta de las células foliculares que le dieron origen (a otro plano focal se distinguen los núcleos de dichas células).

3.6 Estructura del corion

El corion proteico que cubre el huevo de *Drosophila* tiene forma ovalada; en su región dorsal y anterior, presenta un par de filamentos finos, llamados apéndices dorsales (AD), cuya estructura es altamente porosa. Los AD están situados a ambos lados de la línea media dorsal, separados por una distancia característica (Fig.25A). En la naturaleza, cuando la mosca deposita el huevo en la fruta, los AD permanecen en contacto con el exterior, permitiendo el intercambio de gases. En la región más anterior del corion se encuentra el opérculo, una estructura aplanada que forma la “tapa” por donde va a emerger la larva una vez finalizada la embriogénesis. El área del opérculo está delimitada por un collar triangular protuyente y tiene en su zona más ventral un pequeño canal que rodea al micrópilo (Fig. 25A). Finalmente, el polo posterior del corion se caracteriza por la presencia de un aerópilo (Fig. 25A, detalle), que también está involucrado en el intercambio de gases con el exterior.

Las distintas estructuras observadas en el corion reflejan patrones diferenciales de expresión génica y de síntesis proteica en las células columnares que les dieron origen. Por lo tanto, el análisis de la morfología del corion permite inferir si ocurrieron alteraciones durante la diferenciación de las distintas sub-poblaciones del epitelio folicular. Se sabe que el opérculo y el collar son secretados por las sub-población de células centrípetas del epitelio columnar (Fig. 25B). Las células centrípetas presentan altos niveles de activación de la vía de Dpp y consistente con esto, la sobre-expresión de Dpp conduce a la formación de huevos con el opérculo expandido [234]. Contrariamente, la pérdida de función de *dpp*, o de alguno de los elementos requeridos para la transducción de su señal, provoca el desarrollo de huevos cuyo corion no presenta opérculo [234].

Por otro lado, como se mencionó más arriba, los AD del corion son sintetizados por dos grupos de células columnares que se especifican luego del refinamiento de la señal del EGFR en el dominio dorso-anterior del epitelio columnar (Fig. 25B, ver sección 3.4.4) [232]. Esta sub-población de células expresa el gen *Broad-Complex (BR-C)* en respuesta a la activación simultánea de las vías del EGFR y de Dpp [233, 234], de modo que la alteración de cualquiera de estas dos vías provoca defectos en la morfología de los AD.

Finalmente, el aerópilo del corion es depositado por las células del dominio terminal-posterior del epitelio folicular, de modo que la ausencia de aerópilo suele evidenciar

errores en la diferenciación de esta sub-población folicular y por lo tanto, fallas en la determinación del eje antero-posterior del folículo (Fig. 25B, ver sección 3.4.2).

En resumen, dado que el corion proteico lleva la impronta del epitelio folicular que le dio origen, el análisis de la estructura del corion brinda información acerca de los eventos de diferenciación ocurridos en el linaje folicular del ovario.

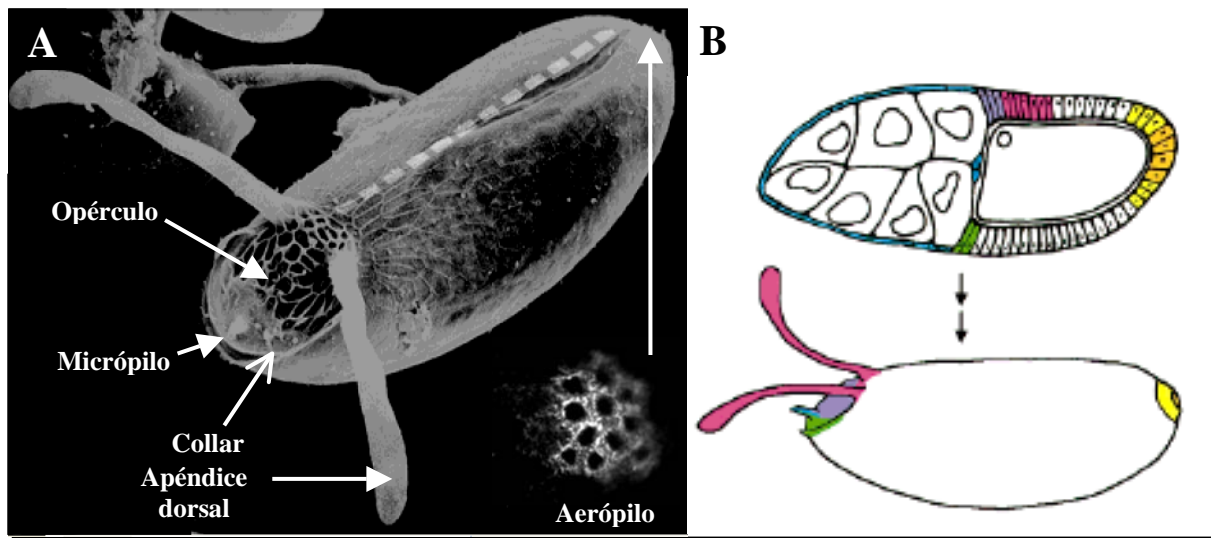
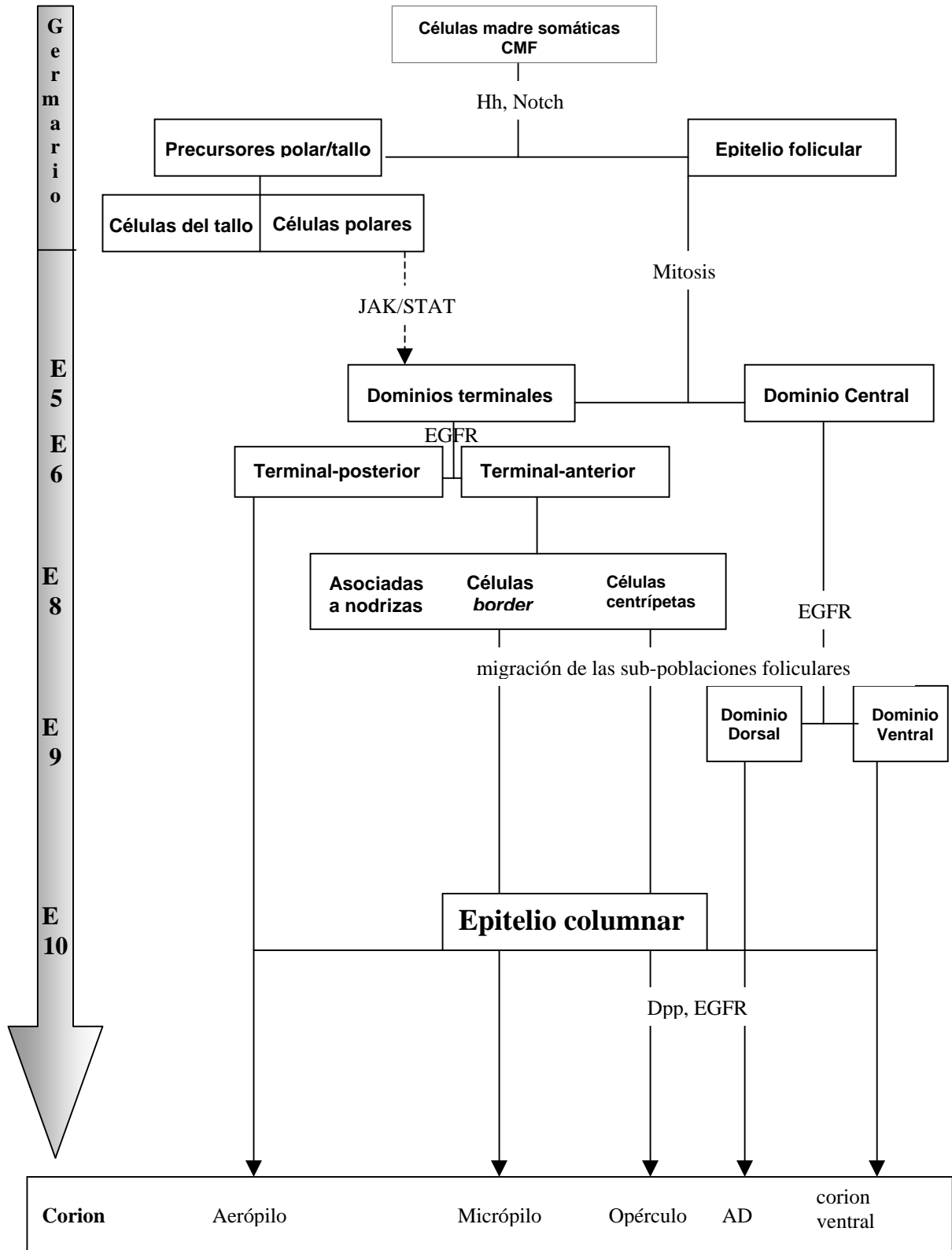


Figura 25: Estructura del corion. El huevo de *Drosophila* está cubierto por el corion proteico cuya morfología es característica. **(A)** La región más anterior del corion presenta el opérculo, rodeado por un collar protuyente. El opérculo forma la “tapa” por donde emergerá la futura larva. En la parte ventral del opérculo se distingue el canal que rodea el micrópilo. La región dorso-ventral del corion se caracteriza por la presencia de un par de filamentos respiratorios, llamados apéndices dorsales (AD). Los AD se sitúan a ambos lados de la línea media dorsal y están separados por un espacio intermedio. La región posterior del corion presenta un aerópilo de estructura característica, también con funciones respiratorias. **(B)** La morfología del corion refleja el patrón del epitelio folicular que le dio origen. El opérculo y el collar son depositados por las células centripetas del epitelio columnar (verde y violeta), mientras que el micrópilo es secretado por el grupo de células *borde* (azul). Los AD se originan a partir de dos parches de células dorsales del epitelio columnar. El aerópilo, situado en el extremo posterior del corion, es depositado por las células del dominio posterior del epitelio folicular (Fig. adaptada de Dobens *et al* [200])

3.7 Resumen de la ovogénesis de *Drosophila*

El ovocito de *Drosophila* se desarrolla dentro de una estructura discreta llamada folículo, formada por células de origen germinal y somático. Cada folículo presenta 16 células germinales (un ovocito y quince células nodrizas), rodeados por una monocapa de epitelio folicular de origen somático. Las células foliculares sufren sucesivas rondas de diferenciación, dando origen a distintas sub-poblaciones con características particulares, cada una de las cuales cumple funciones específicas durante el desarrollo del ovocito (ver Fig. 26). La diferenciación del epitelio folicular involucra el desarrollo coordinado y la constante interacción con el linaje germinal (ej. a través de Grk), así como también eventos de señalización local dentro del mismo epitelio folicular (ej. a través de las vías de JAK/STAT y de Dpp) y la migración concertada de las distintas sub-poblaciones foliculares. Se han descrito numerosas vías de señalización requeridas para la diferenciación del epitelio folicular. Entre ellas, la vía Hh cumple un rol central en la proliferación y diferenciación de las células somáticas y en la especificación de los precursores de las células polares y las células del tallo. Por otro lado, distintas rondas de activación de la vía del EGFR conducen al establecimiento de los ejes A/P y D/V del epitelio folicular. En la ovogénesis media, la vía del EGFR actúa concertadamente con la vía de Dpp para especificar las poblaciones foliculares que darán origen a las diferentes estructuras del corion (opérculo y apéndices dorsales). Las células foliculares dejan su impronta sobre el corion proteico, de modo que a partir de su estructura, puede inferirse la organización final del epitelio folicular. En base a los conocimientos acumulados, el ovario de *Drosophila* representa un excelente modelo para caracterizar fisiológicamente la función de un gen de interés.

Fig. 26: Síntesis del desarrollo del linaje somático del ovario. En el esquema se indica el origen de cada una de las sub-poblaciones foliculares, así como también los principales procesos y vías de señalización involucradas en las sucesivas rondas de diferenciación. La flecha indica el estadio (E) en el que ocurre cada uno de los eventos (no está a escala). En el último estadio de la ovogénesis las distintas sub-poblaciones columnares dan origen a estructuras particulares del corion proteico.



Objetivos

El objetivo de esta segunda etapa de la Tesis consistió en el estudio de la función del complejo SCF^{Slimb} en el desarrollo del ovocito de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos:

- Estudiar la función de la proteína F-box, Slimb en el desarrollo del linaje germinal.
- Estudiar la función de Slimb en la diferenciación del linaje somático-folicular.
- Identificar nuevos sustratos o vías de señalización reguladas por Slimb en el ovario.
- Analizar la función de Slimb como componente F-box de un complejo SCF.

Resultados

1. Alelos mutantes *slmb*

En este trabajo utilizamos tres alelos mutantes del gen *slmb* para estudiar el efecto de su pérdida de función durante la ovogénesis: *slmb*¹, reportado como alelo hipomórfico y *slmb*² y *slmb*⁰⁰²⁹⁵ (también llamado *slmb*^{P1493}), que habían sido descritos como alelos nulos [128]. *slmb*¹ y *slmb*² fueron generados por mutagénesis química con Etil Metil Sulfonato (EMS), mientras que la mutación *slmb*⁰⁰²⁹⁵ fue inducida por la inserción de un elemento P-LacZ en la región 5' no codificante del gen, 182 nucleótidos río arriba del sitio de iniciación de la traducción (Fig.27). Los tres alelos mutantes son letales en homocigosis y pueden rescatarse por expresión del transgén *Tubα1-slmb*, que lleva la secuencia codificante de Slmb bajo el control del promotor constitutivo de la Tubulina α1 [128], confirmando que la letalidad se debe específicamente a la pérdida de función de *slmb*.

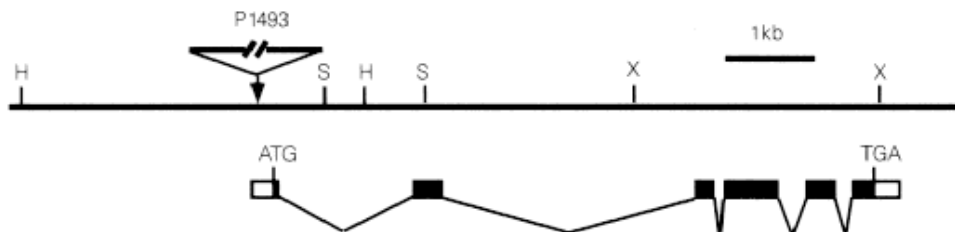


Figura 27: Esquema del gen *slmb*. En la parte superior se indica el sitio de inserción del elemento P1493, causante de la mutación *slmb*⁰⁰²⁹⁵. El esquema inferior indica el sitio de inicio (ATG) y de finalización (TGA) de la traducción, así como las regiones correspondientes a exones (rectángulos) y a intrones (líneas). Se observa que el elemento P se encuentra río arriba del ATG, posiblemente afectando la región regulatoria 5' del gen.

2. Patrón de expresión de *slmb*

A fin de investigar en qué estadios del desarrollo y en qué tipos celulares se expresa *slmb*, llevamos a cabo experimentos de hibridización *in situ* de RNA sobre ovarios de moscas salvajes (Canton-S). Para realizar este análisis, diseñamos una sonda complementaria al mRNA de *slmb* y una sonda de igual sentido, la cual fue usada como control negativo del ensayo. En estos estudios, no pudimos ver diferencias entre el patrón de la sonda específica y la sonda control, observándose en ambos casos una marca débil y ubicua (no se muestra). A pesar de repetir el experimento utilizando diferentes protocolos, no logramos detectar el mRNA de *slmb* con esta técnica, probablemente a causa de que sus niveles de expresión son muy bajos. Durante el estudio de la línea mutante *slmb*⁰⁰²⁹⁵, encontramos que el elemento *P-LacZ*, causante de dicha mutación, funcionaba como *enhancer trap* (ver Apéndice). El sitio de inserción de este elemento (Fig. 27) sugirió que la expresión de *LacZ* está regulada por el promotor de *slmb* y que por lo tanto, refleja su patrón de transcripción. Como puede apreciarse en la Figura 28, la línea *slmb*⁰⁰²⁹⁵ reveló un patrón de expresión dinámico durante la ovogénesis: en el linaje germinal, la expresión se detectó desde estadios muy tempranos (región I del germario), manteniéndose hasta el final del desarrollo (Fig. 28A-C). Por otro lado, la expresión de *LacZ* pareció estar ausente del linaje somático, desde el germario hasta el estadio 8 de la ovogénesis (Fig. 28B-D). En el estadio 9, la marca comenzó a detectarse a bajos niveles en el dominio posterior del epitelio folicular, tornándose muy intensa a partir del estadio 10, en todas las células foliculares que rodean el ovocito (Fig. 28E,F). En folículos de estadio 11 pudo observarse que dos grupos de células dorso-anteriores, presumiblemente las que dan origen a los apéndices dorsales, presentaban una expresión más fuerte que el resto del epitelio (Fig. 28G), sugiriendo que *slmb* podría participar en la morfogénesis de los apéndices dorsales.

3. Estudios de pérdida de función en ovarios mutantes *slimb*.

Dado que el patrón de expresión de la línea reportera *slmb*⁰⁰²⁹⁵ reveló que Slmb se expresa en el ovario, tanto en la línea germinal como en el epitelio folicular, decidimos investigar qué funciones cumple Slmb durante el desarrollo del ovocito. Para tal fin, comenzamos estudiando el efecto que produce su pérdida de función en las distintas etapas de la ovogénesis. Dado que los tres alelos de *slmb* resultan letales en homocigosis,

recurrimos a la técnica de generación de clones, utilizando el método de la Flipasa/FRT (FLP/FRT) [235], para obtener ovarios “mosaico” *slmb*^{1,2 o 00295}, a partir de hembras heterocigotas para dichas mutaciones (ver Apéndice). Para caracterizar el rol que cumple Slmb en los distintos linajes celulares del ovario, analizamos dos tipos de clones: **clones de línea germinal**, generados por el método *FLP/Ovo*^D [236, 237] y **clones de linaje somático**, inducidos por el sistema *e22C-Gal4, UAS-flipasa* [238]. Todos los análisis se realizaron utilizando ovarios de hembras jóvenes (entre 5 y 12 días luego de eclosionadas), ya que la incidencia de defectos en el desarrollo aumenta progresivamente con la edad, aún en moscas salvajes. Los ovarios con clones mutantes *slmb*¹, *slmb*² y *slmb*⁰⁰²⁹⁵ presentaron gran diversidad de fenotipos anómalos, con distinto grado de penetrancia (se describen más abajo). El alelo *slmb*⁰⁰²⁹⁵ presentó la mayor incidencia de anomalías, pero los clones mutantes se obtuvieron con baja frecuencia, probablemente a causa de su baja viabilidad celular. Un efecto similar fue observado por Jiang y Struhl, quienes encontraron que los clones mutantes *slmb*⁰⁰²⁹⁵, inducidos en estadios larvales, no persistían en el tejido adulto [128]. Por este motivo, decidimos utilizar los alelos *slmb*¹ y *slmb*² para realizar la mayor parte de los experimentos de esta tesis.

3.1 Slmb en el desarrollo del linaje germinal

3.1.1 Morfología de los ovarios mutantes *slmb*

Para investigar un posible rol de Slmb en el desarrollo del linaje germinal, comenzamos analizando la morfología de las ovariolas en las que se indujeron clones germinales *slmb*. Realizando tinciones con DAPI (marcador de DNA/núcleos), observamos que el 17,4% de los folículos mutantes presentaba diversos fenotipos anómalos (N=483), comparado con el 0,6% que ocurrieron en las ovariolas de hembras salvajes (N=996). Dichos fenotipos incluyeron un 3.7% de cistos con signos claros de degeneración y fragmentación nuclear (Fig. 29A-C), sugiriendo la existencia de apoptosis. Tinciones de TUNEL realizadas sobre estas ovariolas confirmaron que las células germinales estaban muriendo por apoptosis en estadios prematuros del desarrollo (no se muestra). Llamativamente, un segundo fenotipo observado consistió en la falta de apoptosis, en estadios de la ovogénesis en los que ésta debería ocurrir. Entre los estadios 11 y 13, las células nodrizas vierten el contenido de su citoplasma dentro del ovocito a través de sus canales *ring* y posteriormente mueren por apoptosis. En muchos folículos mutantes *slmb*,

las células nodrizas permanecieron intactas en estadios avanzados del desarrollo, aún cuando el ovocito se encontraba cubierto por el corion proteico, indicando que se hallaba en el estadio final de desarrollo (Fig. 29D). Dado que las células nodrizas no completaron normalmente el proceso de dumping, los ovocitos contenidos en dichos folículos no acumularon suficiente cantidad de vitelo y resultaron muy pequeños (se muestra en Fig. 33A). Otro fenotipo observado consistentemente fue el de folículos con cantidad anormal de células germinales: alrededor del 9.9% de los cistos presentaron un número mayor a 16 células (generalmente 32, Fig. 29E-F), mientras que el 1,7% presentó un número menor (entre 2 y 8 células, Fig. 29G). Por otro lado, el 2,9% de los folículos tenían células nodrizas con núcleos de tamaño heterogéneo, poniendo en evidencia fallas en el proceso de endorreplicación del genoma de estas células (Fig. 29H-I). En algunos casos, el tamaño anómalo de los núcleos se correlacionó con la existencia de aparentes defectos en las divisiones mitóticas: cistos con sólo dos células germinales presentaron núcleos de gran tamaño, mientras que aquéllos con número excesivo de células nodrizas presentaron núcleos de tamaño más pequeños a lo esperado (Fig. 29J-K). En conjunto, los fenotipos descritos sugieren que la pérdida de función de *slmb* en el linaje germinal alteraría el programa de muerte por apoptosis durante la ovogénesis y la progresión normal del ciclo celular, interfiriendo con la transición de mitosis a endorreplicación.

3.1.2 División mitótica en cistos mutantes *slmb*

Los fenotipos descritos en el punto anterior sugirieron que *Slmb* podría estar regulando la división mitótica del cisto. A fin de comprobar esta hipótesis, analizamos en mayor detalle los folículos que presentaban un número alterado de células germinales. Entre los folículos que presentaron más de 16 células, pudimos distinguir dos categorías: aquéllos con un solo ovocito y más de 15 células nodrizas (16 de 38 casos analizados) y aquéllos con más de un ovocito (generalmente dos) y exceso de células nodrizas (22 de 38 casos analizados). *A priori*, existen dos razones por las cuales un folículo podría tener un número anormal de células germinales: **1)** por defectos en el programa de **división mitótica del cisto**, que ejecuta una ronda más o una ronda menos de división celular ó **2)** por defectos en el proceso de **encapsulación**, lo que provocaría que más de un cisto quede rodeado de un único epitelio folicular. Para discriminar cuál de estas dos razones era la causante de los fenotipos observados en los clones germinales *slmb*, estudiamos el patrón de canales *ring* de los ovocitos contenidos en folículos con número alterado de células

germinales. Normalmente, las cuatro rondas mitóticas que tienen lugar en el cisto dan origen a cuatro canales sobre la superficie del ovocito, que lo conectan con cuatro células nodrizas adyacentes (Fig. 21B y 30A). Si ocurriese una ronda adicional de división celular, deberíamos observar la aparición de un quinto canal *ring* en el ovocito, mientras que un número de ciclos inferior al normal, resultará en la formación de menos de cuatro canales sobre la superficie del mismo (1 a 3) [239]. Utilizando Falloidina fluoresceinada para marcar los canales *ring*, que son ricos en actina, observamos que todos los folículos supernumerarios que presentaban un solo ovocito tenían cinco canales *ring* sobre la superficie del mismo (16/16, Fig. 30B). Por el contrario, en los folículos que tenían más de un ovocito, observamos siempre un número normal de canales *ring* en cada uno de ellos (22/22 Fig. 30C,D), sugiriendo que las rondas mitóticas ocurrieron normalmente en esos cistos. Estos resultados demuestran que los fenotipos observados en los clones *slmb* se debieron a dos fenómenos independientes: en el caso de los folículos supernumerarios con **un solo ovocito**, la presencia de células nodrizas adicionales se debió a la **desregulación de las mitosis** del cisto. Consistente con esto, los folículos con menos de 15 células nodrizas (N=8), presentaron un número de canales *ring* que siempre fue coherente con el número de divisiones mitóticas que ocurrieron (dos células=un canal, cuatro células=dos canales, etc.; Fig. 30E). Contrariamente, en el caso de los folículos supernumerarios que presentaron **más de un ovocito**, el exceso de células germinales se debió a **defectos de encapsulación**, en donde las células correspondientes a diferentes cistos quedaron rodeadas por un mismo epitelio folicular. Nuestra interpretación es que este último fenotipo fue causado por la generación "colateral" de clones mutantes en el linaje somático⁵ y no por la pérdida de función de *slmb* en la línea germinal. Las observaciones descritas confirman, por lo tanto, que en la línea germinal *Slmb* está involucrado en la regulación de las mitosis durante el desarrollo del cisto.

3.1.3 Estudio de reguladores del ciclo celular en clones mutantes *slmb*

Habiendo demostrado que la pérdida de función de *slmb* conduce a la desregulación del ciclo celular, decidimos investigar si distintos factores que se sabe que regulan la mitosis y la endorreplicación del cisto se encontraban alterados en los clones mutantes

⁵ Para generar clones por el método *Ovo*^D se utiliza una flipasa inducible por shock térmico (*Hs-Flp*) y por lo tanto, los clones mutantes se producen tanto en la línea germinal como en la somática. Sin embargo, sólo pueden identificarse unequivocamente los clones de línea germinal, por existencia de **vitelo** en el ovocito.

slmb. Ha sido reportado que la proteína Dp, que forma heterodímeros con proteínas de la familia E2F, participa en procesos esenciales de la ovogénesis. La pérdida de función de *Dp* en la línea germinal provoca una ronda adicional de división mitótica en el cisto, dando lugar a folículos con exceso de células nodrizas [199]. Asimismo, Dp es esencial para que las células nodrizas endorrepliquen normalmente su genoma y para que lleven a cabo el programa de apoptosis [198]. Por otro lado, se demostró que el factor de transcripción E2F1, que funciona como activador transcripcional formando un dímero con Dp, es desestabilizado por el complejo SCF^{Slmb} en discos imaginales de ala, durante la transición G1/S del ciclo celular [173]. El segundo miembro de la familia de E2F en *Drosophila*, E2F2, también forma heterodímeros con Dp y se une a las mismas secuencias de DNA reconocidas por E2F1, pero actúa como represor transcripcional de sus genes blanco [240]. E2F2 es requerida durante la ovogénesis de *Drosophila* para que ocurra normalmente la transición de endorreplicación genómica a amplificación génica, en las células del epitelio folicular [241]. Finalmente, se sabe que CiclinaE (CycE) cumple un rol central en la regulación del ciclo celular del cisto [242], presentando altos niveles de expresión en los cistos que se están dividiendo en el germario. Durante la endorreplicación del genoma de las células nodrizas, la expresión de CycE es menor y sus niveles comienzan a oscilar [149, 243].

Teniendo en cuenta estos datos de la literatura, decidimos realizar experimentos de *western blot* para analizar si los niveles de las proteínas Dp, E2F1, E2F2 y CycE, se hallaban alterados en los clones mutantes *slmb* de línea germinal. Como puede observarse en la Figura 30F, los niveles de E2F1 y CycE no variaron con respecto a los observados en los extractos salvajes, mientras que los niveles de E2F2 y Dp resultaron significativamente más bajos en los ovarios mutantes *slmb*². Por lo tanto, nuestros resultados muestran que, a diferencia de lo que ocurre en discos imaginales de ala, la proteína E2F1 no sería blanco de Slmb en el ovario. Por otro lado, los fenotipos de pérdida de función de *slmb* en la línea germinal resultaron altamente coincidentes con los reportados para la pérdida de función de *Dp* en la línea germinal [199]: en ambos casos los cistos mutantes llevan a cabo una ronda adicional de división mitótica y presentan alteraciones en el programa de muerte por apoptosis de las células nodrizas. Consistente con esta observación, los niveles de Dp disminuyen en los clones germinales *slmb*, sugiriendo que los fenotipos anómalos de los mutantes *slmb* y de los mutantes *Dp* podrían estar causados por mecanismos similares. Sin embargo, es importante notar que la regulación que ocurre sobre Dp no es directa: si tenemos en cuenta que Slmb debería promover la ubiquitinación y degradación

proteasomal de sus proteínas blanco, se espera que ante la pérdida de función de *slmb*, los sustratos directos no sean ubiquitinados ni degradados y en consecuencia aumenten sus niveles. Dado que tanto Dp como el factor de transcripción E2F2 presentaron niveles menores a los normales en los clones mutantes *slmb*, sugerimos que el mecanismo de regulación que opera sobre estas proteínas es indirecto y proponemos que algún otro factor, aún no identificado, es el que se estabiliza en los clones mutantes *slmb* y reprime la expresión de Dp y E2F2 (ver discusión).

3.2 Slimb en el desarrollo del linaje somático-folicular

3.2.1 Fenotipos de pérdida de función de *slmb*

Habiendo caracterizado el rol de Slmb en el desarrollo del linaje germinal, decidimos estudiar su función en el epitelio folicular durante la ovogénesis. Para tal fin, indujimos clones mutantes específicamente en el linaje somático y analizamos los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb*. Es importante aclarar que los clones generados en las células foliculares no siempre abarcan todo el epitelio folicular, sino que suelen formar parches mutantes de tamaño variable. Los fenotipos anómalos observados en estos ensayos fueron variados, haciéndose evidentes desde estadios muy tempranos de la ovogénesis. Encontramos que frecuentemente, la morfología del germario resultó alterada tras la pérdida de función de *slmb*. En ovarios salvajes, la región IIA/B del germario presenta un solo cisto con forma de disco, que ocupa todo el ancho del germario (Fig. 31A). Este arreglo morfológico es importante para que las células foliculares que se están dividiendo, tomen contacto con el cisto y puedan migrar sobre él para encapsularlo. Como se muestra en la Figura 31B, muchos de los germarios con clones mutantes *slmb* presentaron más de un cisto ubicado en las regiones IIA, IIB y/o III, alterándose así la adecuada interacción cisto-soma, necesaria para una correcta encapsulación. Consistente con esto, observamos severos defectos de encapsulación en estadios más avanzados del desarrollo, en donde muchos folículos presentaron dos o tres cistos rodeados por un mismo epitelio folicular (generalmente dos ovocitos y 30 células nodrizas, Fig. 31C). Asimismo, observamos que la morfología general de muchos folículos estaba alterada (Fig. 31C,E, comparado con Fig. 29E) y que los ovocitos se encontraban frecuentemente deslocalizados dentro del folículo (Fig. 31F,G), probablemente también a causa de una incorrecta interacción entre los linajes germinal y somático.

Por otro lado, las ovariolas con clones mutantes *slmb* presentaron frecuentemente morfología aberrante, caracterizada por la ausencia de células del tallo separando a los folículos adyacentes (Fig. 31 H-J). Recientemente, Torres y col., demostraron que la localización posterior del ovocito dentro del folículo se determina en el germario y depende de la correcta formación del tallo interfolicular que separa al cisto que se está encapsulando del cisto vecino próximo posterior (Fig. 31K) [244]. Para determinar una posible correlación entre la deslocalización del ovocito y la falta de células del tallo, analizamos folículos mutantes *slmb* con el ovocito mal posicionado. En 9 de los 15 folículos analizados, observamos ausencia de tallo interfolicular posterior (Fig. 31 G); sin embargo en los 6 casos restantes, el tallo interfolicular posterior estaba correctamente formado (Fig. 31F), sugiriendo que la deslocalización del ovocito se debió a una causa diferente. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Slmb es requerido tempranamente en el linaje somático para la correcta morfogénesis del germario, para el proceso de encapsulación del cisto, para la formación de los tallos interfoliculares y para el normal posicionamiento del ovocito dentro del folículo.

3.2.2. Slmb en la diferenciación del epitelio folicular

La ausencia de células del tallo en las ovariolas con clones *slmb* sugirió que podría estar alterada la diferenciación de las distintas sub-poblaciones foliculares. En ovariolas salvajes, las células foliculares indiferenciadas del germario expresan altos niveles de FasciclinaIII (FasIII). En el estadio 2-3 de la ovogénesis, el patrón de FasIII queda restringido a los dos pares de células polares ubicados en los extremos anterior y posterior del folículo, desapareciendo rápidamente de las células del tallo y del resto del epitelio folicular (Fig. 32A). A fin de estudiar si las células foliculares se diferencian normalmente tras la pérdida de función de *slmb*, analizamos inicialmente el patrón de expresión de FasIII en ovariolas con clones *slmb*. Encontramos que la pérdida de función de *slmb* en el linaje somático provocó alteraciones en la expresión de FasIII, observándose grandes parches de células con expresión positiva en estadios donde FasIII debería estar ausente (Fig. 32B,C). Cuando marcamos los clones mutantes *slmb* con la proteína verde fluorescente (GFP), observamos una correlación directa entre la pérdida de función de *slmb* y la expresión ectópica de FasIII, indicando que el efecto observado es autónomo de célula (Fig. 32C-E). Al mismo tiempo, notamos que algunos de los folículos con clones *slmb* presentaban células aisladas que expresaban FasIII, con una intensidad mayor a la

observada en los grandes parches mutantes (Fig. 32C), sugiriendo que se podrían estar diferenciando células polares ectópicas. Dado que FasIII no es un marcador específico de células polares [182], decidimos utilizar la línea reportera *PZ80* [245] para investigar si los clones mutantes *smb* realmente presentaban células polares adicionales. Como se muestra en la Fig. 32F-H, en ovarios salvajes, *PZ80* da lugar a la expresión de β -galactosidasa exclusivamente en los pares de células polares anterior y posterior del folículo. Cuando analizamos la expresión de este marcador en folículos con clones mutantes *smb* observamos la existencia de una célula o un par de células polares adicionales (Fig. 32I), confirmando que la pérdida de función de *smb* provoca la diferenciación de células polares ectópicas. También en este caso, la marcación positiva de los clones mutantes *smb* con la GFP nos permitió confirmar que el desarrollo de células polares ectópicas se debió a un mecanismo autónomo de célula (Fig. 32J,K).

Se ha demostrado que las células polares anteriores son necesarias y suficientes para inducir a sus células foliculares adyacentes a asumir el destino de células *border* [201]. Dado que muchos folículos con clones *smb* diferenciaron células polares ectópicas en el dominio anterior del epitelio folicular, quisimos investigar si también se estaban diferenciando grupos ectópicos de células *border*. Para tal fin, utilizamos la línea reportera *slow border cells-LacZ (slbo-LacZ)*, que expresa a la β -galactosidasa específicamente en el grupo de células *border* del folículo [219, 246, 247]. En la Figura 32, puede observarse el patrón de expresión de *slbo-LacZ* en moscas salvajes: en el estadio 9 de la ovogénesis, *LacZ* se detecta en un grupo de 5 a 8 células anteriores, que se delaminan del epitelio folicular y comienzan a migrar posteriormente hacia el ovocito, abriéndose paso entre las células nodrizas (Fig. 32L). En el estadio 10, el grupo de células *border* (que incluye al par de células polares), ha alcanzado el extremo anterior del ovocito (Fig. Fig. 32M). Nuevamente, incorporando el elemento *slbo-LacZ* en el genoma de moscas heterocigotas *smb*² pudimos confirmar nuestra predicción. El análisis de folículos con clones mutantes *smb* reveló la existencia de grupos adicionales de células *border*, diferenciadas a partir de las células polares ectópicas generadas (Fig. 32N). Llamativamente, observamos que tanto las células polares como las células *border* ectópicas fueron incapaces de migrar normalmente, permaneciendo en la parte anterior del folículo o quedando deslocalizadas entre las células nodrizas (Fig. 32N,O). Este resultado sugirió que la función de *Smb* sería además necesaria para que se lleve a cabo normalmente el proceso de migración del grupo de células polares y *border*.

En conjunto, estos resultados demuestran que la pérdida de función de *slmb* impide la correcta diferenciación de las células foliculares, provocando en algunos casos la pérdida de células del tallo o la diferenciación de células polares ectópicas, las cuales a su vez inducen la diferenciación de grupos ectópicos de células *border*.

3.3 Defectos en la morfogénesis del corion

Analizando los huevos depositados por hembras cuyos ovarios eran “mosaico”⁶ para *slmb* (de ahora en adelante, “huevos mutantes *slmb*”), observamos la aparición de diversas anomalías en la morfología del corion. Como se describió anteriormente, los huevos salvajes están cubiertos por un corion proteico, que presenta un par de filamentos en la región dorso-anterior (apéndices dorsales), separados por un espacio intermedio en la zona más dorsal (Fig. 33A,B). Entre los huevos mutantes *slmb*, observamos algunos de menor tamaño, huevos con estructura general anómala y una alta proporción de huevos con severas alteraciones en la posición y/o morfología de los apéndices dorsales (AD) (Fig. 33A-M)). Dada la variabilidad morfológica observada en los AD, dividimos estos fenotipos en distintos grupos. El primer grupo incluyó huevos con fenotipos dorsalizados, caracterizados por la presencia de AD expandidos lateralmente o rodeando toda la circunferencia anterior del huevo (Fig. 33C,D) [227, 248]. El segundo grupo incluyó huevos con AD ectópicos o ramificados y huevos en los que se observó deposición de material de AD en la región inter-apéndice (Fig. E-G); el tercer grupo consistió en huevos aparentemente ventralizados [227, 249], con AD parcial o totalmente fusionados, restringidos a la región más dorsal del corion (Fig. 33H,I). Finalmente, la cuarta categoría incluyó huevos con el opérculo ligeramente expandido y los AD desplazados posteriormente y coriones con AD muy reducidos o ausentes (Fig. 33J-M).

Para determinar si estas anomalías fueron causadas por la pérdida de función de *slmb* en el linaje germinal o por la generación de clones mutantes en el epitelio folicular, indujimos la formación de clones somáticos con el elemento *e22C-flipasa* y comparamos los fenotipos obtenidos con los fenotipos que se generaron por el método *Hs-Flp/Ovo^D*. Observamos que la pérdida de función de *slmb* en las células foliculares produjo severas anomalías en la morfología de los AD, similares a las descritas más arriba. Por otro lado, los clones *slmb* de línea germinal generaron un 8% (*slmb*², N=902) o un 40% (*slmb*⁰⁰²⁹⁵,

⁶ Hembras en las que se indujo la generación de clones mutantes *slmb* utilizando la flipasa ubicua, inducible por shock térmico, *Hs-Flp*

N=150) de huevos más pequeños, típicamente asociados a defectos en el proceso de dumping (Fig. 33A). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la pérdida de función de *slmb* en las células foliculares conduce a defectos en la morfogénesis del corion, mientras que los clones generados en la línea germinal provocan fenotipos asociados a defectos en los procesos de dumping y apoptosis de las células nodrizas (ver sección 3.1).

4. Rol de Slmb en la regulación de distintas vías de señalización intracelular

Habiendo caracterizado la diversidad de anomalías que provoca la pérdida de función de *slmb* en el linaje somático, nos preguntamos cuáles serían los factores que se alteran ante la falta de Slmb, siendo responsables de provocar los fenotipos observados. Para contestar esta pregunta, comenzamos investigando qué proteínas o vías de señalización, cuya función fue reportada en el ovario, podían provocar fenotipos similares a los encontrados en nuestros mutantes. Evidencias de distintos laboratorios demostraron que la vía de Hedgehog (Hh) es esencial para la proliferación de las células somáticas del germario [180], de modo que la sobre-expresión de Hh provoca la división descontrolada de estas células, conduciendo a defectos en la diferenciación de las distintas subpoblaciones foliculares [186, 250]. Por otra parte, se reportó que las vías del EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) y de Decapentaplegic (Dpp) son requeridas para la diferenciación del epitelio folicular, cumpliendo un rol central en la morfogénesis de los apéndices dorsales [233]. Finalmente, como se mencionó más arriba, Slmb regula negativamente a los efectores de las vías de Hh y Wg, Ci y Arm, respectivamente, en discos imaginales de pata y de ala [128, 168]. En base a estas evidencias decidimos analizar si las vías de Hh, Wg, EGFR y Dpp, se encuentran reguladas por Slmb, durante la ovogénesis.

4.1 Análisis de interacciones génicas entre *slmb* y distintas vías de transducción de señales

Para comenzar con este análisis, realizamos experimentos en búsqueda de interacciones génicas dominantes⁷ entre mutantes *slmb* y mutantes de distintos genes

⁷ se refiere a la posibilidad de detectar un fenotipo identificable, al utilizar una sola copia mutante de cada uno de los genes testeados. Las interacciones pueden analizarse también combinando la sobre-expresión de

involucrados en las vías candidatas. Esta técnica permite analizar gran cantidad de interacciones en forma rápida, utilizando el criterio de aparición de un fenotipo anómalo en el individuo doble heterocigota correspondiente, o la exacerbación de un fenotipo que ya existía en alguno de los parentales simple-heterocigotas. Para analizar las distintas interacciones, realizamos cruzamientos entre moscas de las líneas *slmb*^{1, 2 ó 00295} y moscas mutantes para diferentes elementos de las vías de Hh (*ptc*, *pka*), EGFR (*grk*, *put*, *fsK10*) y Dpp (*dpp*, *sax*, *tkv*, *dad*, *sog*, *mad*, *med*) (los alelos se detallan en materiales y métodos). En la F1, seleccionamos hembras doble-heterocigotas para todas las combinaciones a analizar, las cuales fueron cruzadas con machos salvajes en vasos de ovipuesta. Los huevos depositados fueron recolectados para analizar la morfología de sus AD⁸. En una segunda etapa, se utilizó un segundo criterio de análisis basado en tinciones con DAPI de las ovariolas de las hembras doble-heterocigotas. De este modo, se esperaban poder detectar las anomalías que no estuvieran reflejadas en la morfología del corion (ej. defectos de encapsulación o la degeneración de los cistos).

En la mayoría de las interacciones analizadas, observamos que la morfología del corion no sufrió alteraciones, en comparación con los huevos salvajes (N > 500). Sin embargo, en el caso de la interacción *grk*^{HK}/*slmb*² encontramos que el 30,5% de los huevos depositados por las hembras doble-heterocigotas presentó AD fusionados (N=685), mientras que solamente el 16,4% (N=1147) y 1% (N=875) de los huevos provenientes de hembras simple-heterocigotas *grk*^{HK} o *slmb*², respectivamente, presentaron dicho fenotipo. Por lo tanto, este resultado mostró que existe interacción entre Slmb y Grk, sugiriendo un efecto regulatorio de Slmb sobre la vía del EGFR. Por otro lado, al análisis morfológico de las ovariolas de las hembras doble-mutantes *grk*^{HK}/*slmb*², no reveló defectos evidentes. En resumen, utilizando esta estrategia obtuvimos una primera evidencia de que Slmb sería necesario para la morfogénesis de los AD, probablemente a través de la regulación de la vía del EGFR.

Si bien los resultados de interacciones génicas positivas pueden utilizarse como evidencia de que las funciones de dos proteínas están relacionadas, los resultados de interacción negativa no son informativos, ya que la presencia de una sola dosis de cada gen en muchos casos es suficiente para mantener el fenotipo salvaje. Por esta razón, decidimos continuar con el estudio de las vías candidatas, utilizando una estrategia diferente. Dado

uno o ambos genes en estudio, partiendo de la suposición que el efecto que producen ambos va en el mismo sentido.

⁸ debe tenerse en cuenta que el corion es producido por el epitelio folicular en el ovario de la hembra, y que por lo tanto, el fenotipo es independiente del macho utilizado en el cruzamiento.

que la pérdida de función de *slmb* debería resultar en la estabilización de los factores que normalmente son llevados a degradación por el complejo SCF^{Slmb}, los fenotipos anómalos observados en nuestros mutantes deberían recapitularse al sobre-expresar la proteína sustrato o al hiperactivar la vía de señalización regulada por Slmb. Siguiendo este razonamiento, llevamos a cabo dos estudios paralelos: 1) hiperactivamos las distintas vías candidatas utilizando el sistema de sobre-expresión Gal4/UAS (ver Apéndice [251]) y luego analizamos si los fenotipos generados reproducían los fenotipos observados en ovarios mutantes *slmb* y/o 2) estudiamos el patrón de expresión de genes reporteros u otros marcadores moleculares de las vías candidatas en folículos con clones mutantes *slmb*. A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las vías analizadas.

4.2 La vía de Hedgehog

La activación de la vía Hh comienza cuando el ligando Hh, se une al receptor Patched (Ptc), el cual normalmente se encuentra inhibiendo la actividad de la proteína de transmembrana Smoothened (Smo). En presencia de Hh, Ptc cesa la represión sobre Smo, conduciendo a la estabilización de la variante no truncada del factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci-155) y a la consecuente expresión de los genes blanco de la vía [252, 253]. En ausencia de señal, la quinasa PKA fosforila a Ci y dicha fosforilación permite que Ci sea ubiquitinado y clivado en el proteasoma, generando la variante corta Ci-75, que actúa como represora transcripcional.

A) Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía Hh en el ovario: La sobre-expresión de Hh utilizando los elementos *UAS-hh/Hs-Gal4*, provocó un incremento dramático en la proliferación de las células foliculares, aún en condiciones débiles de inducción (10 minutos a 37°C), reproduciendo los resultados reportados por otros grupos [181, 250]. Las células en exceso se situaron entre folículos vecinos, formando largos tallos de células indiferenciadas, evidenciadas por la expresión de FasIII (Fig. 34A,B). En estas ovariolas observamos además defectos de encapsulación, observándose dos folículos total o parcialmente fusionados y deslocalización del ovocito dentro del cisto (Fig. 34C-E). Cuando el transgén *UAS-hh* se indujo con los elementos *T155-Gal4* y *CY2-Gal4* (ambos confieren expresión en el epitelio columnar a partir del estadio 9-10), observamos que las ovariolas se desarrollaron normalmente, sugiriendo que la hiperactivación tardía de Hh no tiene efecto sobre el desarrollo del folículo. Los fenotipos observados por sobre-expresión

temprana de Hh fueron fenocopiados cuando en su lugar, se sobre-expresó al efector de la vía, Ci, utilizando los elementos *Hs-Gal4/UAS-Ci.PKA* (una versión estable de Ci, que tiene mutados los sitios fosforilables por PKA) y *tubulina-Ci (tub-Ci)*, que confiere expresión constitutiva del factor de transcripción. Sin embargo, la penetrancia de los fenotipos fue mucho menor en estos casos, observándose baja hiper-proliferación celular y mayor proporción de ovariolas sin defectos evidentes (no se muestra). Por otro lado, la sobre-expresión de *UAS-Ci.PKA* mediada por *T155-Gal4* provocó defectos leves en la morfología del corion, observándose un 5% de huevos con AD ligeramente fusionados en la base (N=234, Fig. 34F). Cuando analizamos los huevos depositados por hembras que llevaban dos copias del transgén *tub-Ci*, encontramos alrededor de un 5% de anomalías más severas en la morfología del corion, entre ellas la presencia de AD fusionados, AD cortos o de dos pares de AD, reflejando la encapsulación de más de un cisto en el mismo epitelio folicular (N=1045, Fig. 34G). Finalmente, la sobre-expresión temprana y débil de *UAS-Ci.PKA*, inducida con el elemento *e22C-Gal4*, provocó baja incidencia de hiper-proliferación celular en las ovariolas y no alcanzó a provocar anomalías en la morfología del corion. En resumen, la activación ectópica de la vía de Hh en el ovario provoca hiper-proliferación celular, defectos en el proceso de encapsulación, deslocalización de los ovocitos dentro en el folículo y defectos leves en la morfología de los AD.

Es interesante notar que si bien algunos de los fenotipos provocados por la hiperactivación de la vía de Hh fueron similares a los provocados por la pérdida de función de *smb*, otros fenotipos resultaron diferentes. La hiper-proliferación de células somáticas, observada consistentemente luego de sobre-expresar Hh, fue radicalmente distinta a lo encontrado en los clones mutantes *smb*, donde se observó ausencia, en lugar de exceso de células interfoliculares. Sin embargo, para analizar si los fenotipos de los mutantes *smb* que resultaron ser similares podían ser explicados por la activación ectópica de la vía de Hh, decidimos analizar el patrón de expresión de diferentes elementos reporteros de esta vía.

B) Análisis de marcadores moleculares de la vía Hh en clones mutantes *smb*: El gen *patched (ptc)* es blanco directo de la vía Hh y por lo tanto, el elemento *ptc-LacZ* puede utilizarse como gen reportero de la activación de esta vía [254]. Por otro lado, se sabía que los clones mutantes *ptc* generados en el epitelio folicular activan la vía Hh de manera independiente de ligando, provocando que las células foliculares continúen dividiéndose más allá del estadio 6 de la ovogénesis. Dicha desregulación puede evidenciarse realizando tinciones con el anticuerpo anti-fosfo Histona 3 (anti-pH3), que marca específicamente los

núcleos de las células foliculares que se encuentran en mitosis entre los estadios 1 y 6 (Fig. 34H) [250]. Analizando folículos con clones mutantes *slmb*, observamos que el patrón de expresión de *ptc-LacZ* no resultó alterado, restringiéndose a las **células de cubierta** del germario, como ocurre en los ovarios salvajes (Fig. 34I). Consistente con esto, en las ovariolas con clones *slmb* no encontramos alteraciones en la señal del anticuerpo anti-pH3 (no se muestra). Estos resultados, sumados a las diferencias fenotípicas observadas entre los ovarios mutantes *slmb* y aquéllos que sobre-expresaron Hh, sugieren que a diferencia de lo que ocurre en discos imaginales, la vía de Hh no estaría regulada por Slmb en el ovario.

4.3 La vía Wingless

Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía Wg en el ovario: Teniendo en cuenta que Slmb regula a la vía Wg en discos imaginales de pata y de ala, promoviendo la degradación del factor de transcripción Armadillo/ β -catenina (Arm), decidimos investigar si los defectos provocados por la pérdida de función de *slmb* en el ovario podían reproducirse activando ectopicamente la vía Wg. Para tal fin, utilizamos los transgenes *UAS-wg* y *UAS-arm* y dirigimos su expresión con los elementos *e22C-Gal4* y *Hs-Gal4*. Luego de probar diferentes condiciones y tiempos de inducción, observamos que la hiperactivación de la vía Wg no provocó anomalías en el desarrollo del folículo, aún en condiciones extremas de sobre-expresión, ensayadas con el elemento *Hs-Gal4* (1 hora a 38°, dos veces por día). Consistente con ello, los huevos depositados por estas hembras resultaron indistinguibles de los depositados por hembras salvajes (no se muestra). Estos resultados sugieren que los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb* en el ovario no serían causados por la hiperactivación de la vía Wg.

4.4 La vía del EGFR

Hemos mencionado de qué manera la vía del EGFR controla la diferenciación dorso-ventral del epitelio folicular y la determinación de los grupos de células que van a formar los AD [232, 233]. Por otro lado, se ha estudiado en detalle el efecto que provocan las alteraciones de esta vía en la morfogénesis del corion: la activación ectópica del EGFR provoca fenotipos dorsalizados, que se caracterizan por tener los AD expandidos lateralmente, o formando un anillo completo en el extremo anterior del huevo. Por el

contrario, la disminución de la actividad del EGFR provoca la ventralización del epitelio folicular, con la consecuente generación de huevos sin AD o con AD fusionados y restringidos a la parte más dorsal del corion [227, 230, 248, 255]. Considerando que observamos interacciones génicas dominantes entre *grk* y *slmb* y dada la similitud entre algunos de los fenotipos de AD observados en mutantes *slmb* y aquéllos provocados por la alteración de la vía del EGFR, decidimos investigar si dicha vía se encontraba desregulada en los clones mutantes *slmb*.

A) Análisis de marcadores moleculares de la vía del EGFR en clones mutantes *slmb*: Para tal fin, utilizamos dos genes reporteros: **1)** *kekkon-LacZ*, que se expresa en respuesta a la activación del EGFR, inicialmente en el dominio terminal-posterior del folículo, entre los estadios 6–7 y más tarde, en la zona antero-dorsal del epitelio folicular, a partir del estadio 9-10 de la ovogénesis (Fig. 35A) y **2)** el marcador *pipe-LacZ*, expresado en los estadios 9-10 en un patrón complementario al de *kekkon*, en el dominio ventral y lateral del epitelio columnar (Fig. 35C). Analizando estos genes reporteros en clones mutantes *slmb*, observamos que el patrón de expresión de *kekkon-LacZ* no resultó alterado (no se muestra). Aún en folículos supernumerarios con más de un ovocito, observamos la activación normal de este reportero en los dominios posterior (estadios 6-7) o antero-dorsal (estadios 9-10) del epitelio folicular, en relación a cada uno de los ovocitos (Fig. 35B). De igual manera, el patrón de *pipe-LacZ* pudo observarse siempre restringido al dominio ventral de los folículos mutantes *slmb*, aún en aquéllos que presentaron morfología claramente anormal (Fig. 35D). Estos resultados demuestran que la expresión de *kekkon* y de *pipe* no se desregula en los clones mutantes *slmb* y que por lo tanto, la activación de la vía del EGFR no resulta alterada.

Dado que la vía del EGFR se activa en el epitelio folicular en respuesta a la señal primaria de Grk proveniente del ovocito, decidimos investigar si los fenotipos de AD observados en los clones mutantes *slmb* obedecían a alteraciones en la expresión o en la localización subcelular de la proteína Grk. [227]. Utilizando un anticuerpo anti-Grk, observamos que en los clones *slmb* de **línea germinal** los niveles y la localización de esta proteína fueron normales, concentrándose siempre alrededor del núcleo del ovocito (Fig. 35E). También en este caso, aún los folículos mutantes *slmb* que presentaron más de un ovocito exhibieron siempre un patrón normal de expresión y de localización perinuclear de Grk (Fig. 35F). En conjunto, estos experimentos sugieren que Slmb no regularía a la vía del EGFR en ninguno de los linajes celulares del ovario. A partir de estos resultados,

proponemos que la interacción génica detectada entre *grk* y *slmb*, posiblemente reflejó un mecanismo indirecto, poniendo en evidencia una función regulatoria de Slmb sobre otro factor que colabora con la vía del EGFR, en la determinación de las sub-poblaciones foliculares que van a dar origen a los AD del corion (ver sección siguiente).

4.5 La vía de Decapentaplegic

En base a los resultados obtenidos para la vía del EGFR, teniendo en cuenta que la vía de Dpp está involucrada en la morfogénesis del corion y habiendo observado que la pérdida de función de *slmb* provoca fenotipos de expansión del opérculo similares a los reportados para la sobre-expresión de Dpp [233, 234], decidimos analizar esta vía candidata. Si bien la regulación de la vía de Dpp es relativamente compleja, en este punto resultará útil hacer un resumen de la organización de esta cascada de señalización. La activación de la vía comienza cuando el factor secretado, Dpp, se une al receptor de tipo I, Thickveins (Tkv) (o Saxophone⁹), induciendo la formación de un complejo heterodimérico con el receptor de tipo II, Punt (Put) [256]. En ese complejo, Punt fosforila a Tkv en su dominio intracelular, estimulando de este modo su actividad de serina/treonina quinasa. Como consecuencia de esto, Tkv fosforila a la proteína Smad regulatoria (R-Smad), Mothers against Dpp (Mad) [257], permitiendo que la misma forme un heterodímero con la proteína co-Smad, Medea (Med). El complejo fosfo-Mad/Med se transloca al núcleo y e induce o reprime la transcripción de sus genes blanco (Fig. 36) [258]. La regulación de la vía de Dpp involucra un amplio repertorio de co-activadores y co-represores que permiten la expresión diferencial de distintos genes blanco. Entre los elementos negativos de esta vía se encuentran la Smad Inhibitoria (I-Smad) Daughters against Dpp (Dad) [259], que se une al receptor de tipo I activado, impidiendo la fosforilación de Mad y su posterior translocación al núcleo; la proteína represora Brinker, que compite con los Smads en el reconocimiento de elementos regulatorios en los genes blanco [260] y Short gastrulation (Sog), un péptido secretado que se une al ligando Dpp, suprimiendo su actividad biológica [261]. Se ha demostrado que *dad* es un gen blanco de la vía de Dpp, generándose así un mecanismo de retroalimentación negativa que modula la activación de esta vía ante una exposición prolongada al ligando [259].

⁹ Si bien se ha demostrado el requerimiento absoluto de Tkv para la transducción de la señal de Dpp, Saxophone parece tener un efecto sinérgico de activación de la vía, a través del reconocimiento de otros ligandos de la superfamilia TGF- β , las proteínas Screw y Gbb-60A.

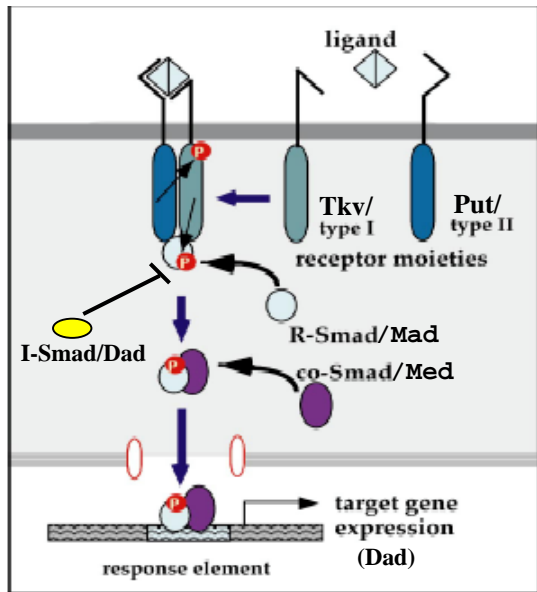


Figura36: Organización de la cascada de señalización de Dpp/TGF- β . La vía se activa cuando el ligando, Dpp, se une al receptor de tipo I, Tkv, induciendo su dimerización con el receptor de tipo II, Put. Put fosforila el dominio C-terminal de Tkv, induciendo su actividad de serina/treonina quinasa sobre la R-Smad/Mad. Una vez fosforilada, Mad se une a la co-Smad, Medea y juntas se translocan al núcleo para activar o reprimir la transcripción. La Smad inhibitoria, Dad, actúa como elemento negativo de la vía, uniéndose al receptor Tkv fosforilado, e impidiendo así que Mad se fosforile. *dad*, a su vez, es gen blanco de la vía de Dpp.

A fin de analizar si Slmb está involucrado en la regulación de la vía de Dpp en el ovario, comenzamos por estudiar en detalle los fenotipos provocados por la hiperactivación de esta vía.

A) Fenotipos resultantes de la hiperactivación de la vía de Dpp en el ovario: Los estudios de hiperactivación de la vía de Dpp se llevaron a cabo utilizando diferentes combinaciones de transgenes *Gal4* y *UAS*, que nos permitieron obtener niveles variables de sobre-expresión. Mientras que a 25°C todas las combinaciones del elemento *UAS-Dpp* resultaron letales en estadios pre-imaginales (antes de la eclosión del adulto), a 18°C algunos de los cruzamientos fueron viables, de modo que pudimos obtener hembras para analizar el fenotipo de sus ovariolas y la morfología de los huevos depositados (Tabla 3). Encontramos que las hembras que sobre-expresaron altos niveles de Dpp produjeron huevos sin AD y con el opérculo notablemente expandido, consistente con lo reportado previamente (Fig. 37A,B, Tabla 3) [233, 234]. En las ovariolas de estas hembras observamos germarios con gran cantidad de células madre germinales y/o cistoblastos [176], como así también la presencia de múltiples cistos encapsulados en un mismo epitelio folicular (Fig. 37C). Sorprendentemente, cuando sobre-expresamos Dpp a niveles mas bajos, encontramos huevos con una gran variabilidad en la morfología de los AD, que fueron similares a los observados en los estudios de pérdida de función de *slmb* (Tabla 3). Estos fenotipos incluyeron huevos con un solo filamento dorsal, huevos con AD fusionados o ramificados, huevos con AD expandidos -en algunos casos rodeando la circunferencia anterior del corion- y huevos con AD muy reducidos o ausentes (Fig.37D-

H). Algunos de estos fenotipos, fueron observados también luego de sobre-expresar otros elementos positivos de la vía de Dpp, como la proteína co-Smad/Medea y una forma constitutivamente activa del receptor de tipo I, Tkv (no se muestra). En busca de evidencias adicionales de que la hiperactivación débil de la vía de Dpp genera defectos en la morfología de los AD, analizamos los huevos depositados por hembras heterocigotas mutantes para los elementos negativos de la vía, *sog* y *dad* [259, 262, 263]. En ambos casos, encontramos huevos con AD reducidos, aunque en este caso la penetrancia del fenotipo fue bastante menor (Tabla 3, Fig. 37I-K).

Cuando analizamos las ovariolas de hembras sometidas a las mismas condiciones de hiperactivación débil de la vía de Dpp, encontramos una gama de fenotipos anómalos similares a los observados en las ovariolas con clones mutantes *slmb*, aunque con una penetrancia algo mas baja. Estos fenotipos incluyeron defectos en la morfología del germario, folículos con mas de 16 células germinales, ovocitos deslocalizados y ausencia de células del tallo separando folículos adyacentes (Fig. 37L-N). En resumen, los experimentos aquí descriptos sugieren que la hiperactivación **débil** de la vía de Dpp, induce anomalías similares a las provocadas por la pérdida de función de *slmb* en el ovario.

B) Interacción entre Slmb y la vía de Dpp: Habiendo encontrado que la hiperactivación débil de la vía de Dpp fenocopia los defectos del corion provocados por la pérdida de función de *slmb*, nos propusimos investigar si existía un efecto regulatorio de Slmb sobre esta vía. Para tal fin, decidimos analizar si sobre-expresando la proteína Slmb, era posible revertir el fenotipo extremo de expansión del opérculo, provocado por la hiperactivación fuerte de la vía de Dpp. Observamos que la expresión simultánea de *UAS-Dpp* y *UAS-Slmb*, con el elemento *CY2-Gal4*, produjo la completa reversión del fenotipo de opérculo expandido, en el 100% de los casos analizados (N=376). La expresión simultánea de *UAS-Dpp* y del transgén control *UAS-EGFP* no revirtió el fenotipo de opérculo expandido, confirmando que el efecto se debió específicamente a la sobre-expresión de Slmb. Este resultado nuevamente sugiere que Slmb actúa como regulador negativo de la vía de Dpp en las células foliculares del ovario.

Tabla 3: Fenotipos de corion provocados por distintos niveles de hiperactivación de la vía de Dpp. Todos los cruzamientos Gal4/UAS se crecieron a 18°C, para obtener adultos viables.

Genotipo Materno	Fenotipo del corion (n ≥ 120)
<i>Hs-Gal4</i> (fuerte)/+; <i>UAS-dpp</i> (débil)/+	No sobrevivieron adultos
<i>Hs-Gal4</i> (débil)/+; <i>UAS-dpp</i> (fuerte)/+	89% de huevos con opérculo expandido y apéndices dorsales (AD) reducidos o ausentes (Fig. 37A)
<i>CY2-Gal4</i> /+; <i>UAS-dpp</i> (débil)/+	80% de huevos con opérculo expandido y AD reducidos (Fig. 37B)
<i>T155-Gal4</i> /+; <i>UAS-dpp</i> (débil)/+	76% de huevos con opérculo expandido y AD reducidos o mal formados. Los fenotipos fueron mas leves que los obtenidos con el elemento <i>CY2-Gal4</i>
<i>Hs-Gal4</i> (débil)/ <i>UAS-dpp</i> (débil)	38% de huevos con fenotipos variables, incluyendo AD ventralizados, AD fusionados y deposición material de AD.
<i>e22C-Gal4</i> / <i>UAS-dpp</i> (débil)	17% de los huevos con AD anómalos, incluyendo AD ramificados, fusionados y expandidos.
<i>Hs-Gal4</i> (débil)/ <i>UAS-dpp</i> (débil)	29% de los huevos con material ectópico de AD depositada en la base, con AD pequeños o con AD mal formados.
<i>Hs-Gal4</i> (débil)/ <i>UAS-medea</i>	25% de los huevos con opérculo ligeramente expandido y con AD reducidos o ausentes.
<i>sog</i> ^{U2} /+	9% de los huevos de huevos con AD parcial o totalmente fusionados, con AD pequeños o material ectópico de AD depositado en la base.
<i>dad</i> ^{1E4} /+	3% de los huevos con AD pequeños o material ectópico de AD depositado en la base
<i>CY2-Gal4</i> / <i>UAS-slmb</i> ; +/+	100% de los huevos con fenotipo salvaje
<i>CY2-Gal4</i> / <i>UAS-slmb</i> ; <i>UAS-dpp</i> (débil)/+	100% de los huevos con fenotipo salvaje

Teniendo en cuenta estas evidencias, decidimos analizar si la interacción positiva detectada entre *slmb* y *grk* en los ensayos de interacciones génicas podía estar reflejando en realidad, una interacción entre *slmb* y la vía Dpp. Para tal fin, generamos hembras doble heterocigotas para *grk* y el elemento negativo de la vía de Dpp, *sog*. Cuando analizamos los huevos depositados por las hembras doble heterocigotas *grk*^{HK}/*sog*^{U2}, encontramos que el fenotipo de apéndices fusionados fue de un 57,3% (N=921), comparado con el 16,4% (N=1147) y el 7% (N=994) observado en los huevos depositados por hembras simple

heterocigotas *grk^{HK}* y *sog^{U2}*, respectivamente. En conjunto, estos resultados sugieren que Slmb actuaría como regulador negativo de la vía de Dpp, contribuyendo junto con la vía del EGFR a la morfogénesis de los AD del corion.

C) Análisis de marcadores moleculares de la vía de Dpp en clones mutantes *slmb*:

Para estudiar de manera directa el efecto regulatorio que tiene Slmb sobre la vía de Dpp en el ovario de *Drosophila*, decidimos analizar el patrón de expresión de distintos elementos reporteros de esta vía, en clones mutantes *slmb*. A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de ellos:

C.1) Análisis de la expresión de Dpp en clones mutantes *slmb*: Inicialmente analizamos la expresión de la línea *enhancer trap dpp¹²³⁷⁹*, que expresa a la β-galactosidasa en las células del ovario donde la proteína Dpp es sintetizada [234]. En ovariolas salvajes, el reportero *dpp¹²³⁷⁹* comienza a expresarse en el estadio 8 de la ovogénesis, en las células del dominio terminal-anterior del epitelio folicular. A partir del estadio 10, la expresión se observa en todas las células derivadas de ese dominio, que incluye a las células centrípetas, las células *border* y las células asociadas a las nodrizas (Fig. 38A). Analizando este mismo reportero en ovariolas con clones mutantes *slmb*, observamos que el patrón de expresión de *LacZ* fue normal, restringiéndose siempre a las células del dominio anterior del folículo (no se muestra), sugiriendo que Slmb no regularía la expresión del ligando Dpp en el epitelio folicular.

C.2) Análisis de la expresión de *Broad-Complex*: Ha sido reportado que la transcripción de la isoforma *Z1* del gen *Broad-Complex (BR-C)* se induce en el epitelio folicular en el estadio 8-9 de la ovogénesis, en respuesta a la activación simultánea de las vías de Dpp y del EGFR [232, 233]. En el estadio 10, la transcripción de *BR-C* se restringe específicamente a dos grupos de células foliculares situadas en la región anterior y dorsal del epitelio, que son las que luego darán origen a los AD (Fig. 38B). Teniendo en cuenta que *BR-C* puede ser utilizado como gen reportero de la vía de Dpp en el ovario, analizamos su expresión por hibridización *in situ* de RNA en folículos mutantes *slmb*. Como se muestra en la Fig. 38C-E, la pérdida de función de *slmb* provocó alteraciones en la transcripción de *BR-C*, observándose folículos en los que su dominio de expresión se encontró expandido, como así también folículos con expresión de *BR-C* disminuida o discontinua. La variabilidad observada en el patrón de *BR-C* se

correlacionó con la diversidad morfológica de los AD que exhibieron los huevos mutantes *slmb*. Puesto que la expresión de *BR-C* permite analizar la vía de Dpp sólo en aquellos dominios donde la vía del EGFR está activada, decidimos utilizar un segundo elemento reportero para obtener más información.

C.3) Análisis de la expresión de *dad-LacZ*: Se ha reportado que la línea *dad*¹⁸⁸³ funciona como *enhancer trap* del gen *dad* en discos imaginales de ala y por lo tanto, puede utilizarse como reportero de activación de la vía de Dpp [259, 264]. Dado que la expresión de *dad*¹⁸⁸³ no había sido completamente caracterizada en la ovogénesis [264], comenzamos estudiando su patrón de expresión en ovarios de moscas salvajes. Observamos que la expresión de *dad-LacZ* comenzó en el estadio 8 de la ovogénesis, en las células anteriores del epitelio folicular, haciéndose mas evidente en el estadio 9, cuando estas células comienzan a desplazarse hacia la región posterior del folículo (Fig. 38F,G). En el estadio 10, *dad-LacZ* se expresó intensamente en las células centrípetas, situadas en el extremo anterior del ovocito, como así también en las células foliculares asociadas a las nodrizas (Fig. 38G). La expresión de este reportero fue coincidente con la reportada para el ligando Dpp y para el patrón de activación de la vía, sugiriendo que *dad*¹⁸⁸³ actúa como reportero de la vía de Dpp también en el ovario.

A continuación, analizamos si el patrón de expresión de *dad*¹⁸⁸³ se encontraba alterado en ovariolas con clones mutantes *slmb*. Dado que los loci *dad* y *slmb* están situados en el brazo derecho del cromosoma 3, tuvimos que recombinar ambos elementos con la secuencia FRT82B¹⁰ para generar cromosomas que nos permitieran obtener clones mutantes *slmb*², que llevaran también el reportero *dad*¹⁸⁸³ (el esquema de cruzamientos realizados para lograr esta línea recombinante se describe en el Apéndice). Analizando ovariolas con clones mutantes *slmb*, encontramos una alta proporción de folículos en los cuales el patrón de expresión de *dad-LacZ* estaba alterado. Una primer categoría fenotípica consistió en folículos que activaron ectópicamente este gen reportero: algunos folículos presentaron expresión ubicua de *LacZ* en estadios tempranos del desarrollo (5-6, Fig. 38H), situación que nunca se observa en ovariolas salvajes. Asimismo, encontramos folículos en los que la expresión de *LacZ* se expandió hacia el dominio posterior del epitelio, o se activó ectópicamente

¹⁰ Este elemento FRT está situado en la región 82B, brazo derecho de cromosoma 3, donde se encuentran *slmb* y *dad*

en pequeños grupos de células columnares, situadas detrás de la hilera de células centrípetas (Fig. 38I,J), expresión que tampoco se observa en los folículos salvajes.

Para determinar si la expresión ectópica de *dad-LacZ* dependía de la pérdida de función de *slmb* de un modo autónomo de célula, marcamos positivamente a los clones mutantes con GFP. En estos experimentos, observamos que la inducción de *dad-LacZ* coincidió con la expresión de GFP, sugiriendo que Slmb controla negativamente a la vía de Dpp a través de un mecanismo autónomo de célula (Fig. 38J,K). Llamativamente, cuando se generaron pequeños clones mutantes *slmb* lejanos al dominio de expresión de Dpp, no se observó activación ectópica de *dad-LacZ*, sugiriendo que la pérdida de función de *slmb* no sería suficiente para activar ectopicamente la vía de Dpp sino que sería necesario que el clon mutante esté próximo a la fuente del ligando (no se muestra).

Una segunda categoría de fenotipos observados incluyó folículos con un número aumentado de células foliculares que expresaban el reportero *dad-LacZ*, pero que se encontraban restringidas al dominio anterior del epitelio (Fig. 38L). Por otro lado, algunos folículos con el ovocito deslocalizado presentaron también el dominio de expresión de *dad-LacZ* desplazado, debido a que la polaridad del epitelio folicular resultó alterada (Fig. 38M). Si bien estos folículos no presentaron un patrón normal de expresión del gen reportero, consideramos que las alteraciones observadas probablemente no se debieron a defectos primarios en la activación de la vía de Dpp, sino que reflejaron defectos previos en la diferenciación del epitelio folicular o en el establecimiento del eje antero-posterior del folículo (ver discusión).

C.4) Análisis del patrón de expresión de Medea en clones mutantes *slmb*: En base a las evidencias obtenidas a favor de que Slmb funcionaría como regulador negativo de la vía de Dpp en el ovario, intentamos identificar los factores responsables del encendido ectópico de los genes de respuesta a Dpp. Se acepta clásicamente que las proteínas R-Smad Mad/Smad2,3 son las que se regulan por fosforilación durante la transducción de la señal de Dpp/TGF- β , mientras que la proteína co-Smad Medea/Smad4, no sufre modificaciones en respuesta a la señal, sino que activa la vía simplemente formando un dímero con la R-Smad fosforilada [265]. Sin embargo, actualmente, existen evidencias que sugieren que la proteína co-Smad Smad4 podría también fosforilarse o modificarse en repuesta a la activación de la vía, aunque el rol de dicha fosforilación no ha sido dilucidado [115, 266]. Por otro lado, en una publicación

reciente se reportó que la proteína Smad4, puede ser reconocida y ubiquitinada por el homólogo de Slmb en humanos, β -TrCP [115]. En base a estos datos de la literatura, decidimos investigar cuál era el patrón de expresión de Medea (Med) durante la ovogénesis de *Drosophila*. Inicialmente estudiamos su expresión en ovarios salvajes, ya que la misma no había sido caracterizada. En ensayos de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo anti-Med (gentilmente cedido por L.Raftery), observamos que Med presenta un patrón similar al de Dpp y al de *dad*¹⁸⁸³. Su expresión inicial se detecta débilmente en el estadio 8 de la ovogénesis, en las células foliculares del dominio terminal-anterior; en el estadio 9, Med se observa en las células terminal-anteriores que han comenzado a desplazarse posteriormente en el folículo (Fig. 38N). En el estadio 10, todas las sub-poblaciones derivadas del dominio terminal-anterior (células asociadas a las nodrizas, células centrípetas y células *border*) presentan altos niveles nucleares de Med, mientras que el resto de las células columnares que cubren el ovocito, muestran niveles mas bajos de esta proteína, también con localización nuclear (Fig. 38O).

A continuación, investigamos cuál era el patrón de expresión de Med en las ovariolas con clones mutantes *slmb*. Cuando los clones mutantes *slmb* se formaron en las células columnares que rodean al ovocito, pudimos detectar un claro aumento en la intensidad de Med, si bien los niveles resultaron ligeramente inferiores a los observados en las células centrípetas (Fig. 38P). Para investigar si este efecto era autónomo de célula, marcamos los clones mutantes *slmb* con GFP y pudimos comprobar que la estabilización de Med se correlacionaba con la expresión de GFP y por lo tanto, con la pérdida de función de *slmb* (Fig. 38Q-R). La estabilización de Med se observó tanto en clones cercanos al dominio celular que expresa Dpp, como en clones mas pequeños y alejados de la fuente del ligando, sugiriendo que el mecanismo es independiente de la activación de la vía. En conjunto, las evidencias obtenidas sugieren fuertemente que Med es un posible sustrato directo de Slmb en las células del epitelio folicular.

D) Resumen de las interacciones observadas entre Slmb y la vía de Dpp: nuestros resultados dieron lugar a cinco líneas independientes de evidencia que sugieren que Slmb es un regulador negativo de la vía de Dpp en el ovario: 1) Los fenotipos de corion provocados por la pérdida de función de *slmb* en el linaje folicular pueden fenocopiarse hiperactivando, de manera débil, a la vía de Dpp; 2) El fenotipo de

expansión del opérculo, causado por la sobre-expresión fuerte de Dpp en el epitelio folicular, puede revertirse sobre-expresando simultáneamente a Slmb; 3) La pérdida de función de *slmb* en el epitelio folicular provoca la desregulación transcripcional del gen reportero de la vía de Dpp, *BR-C*; 4) El elemento reportero de la vía de Dpp, *dad-LacZ* (*dad*¹⁸⁸³), se expresa ectópicamente en folículos con clones mutantes *slmb*, cuando los mismos se han formado en zonas cercanas a las células que secretan al ligando Dpp y 5) La proteína co-Smad, Medea, se acumula de forma autónoma de célula en los clones mutantes *slmb*.

Basándonos en estos resultados, proponemos que la proteína F-box, Slmb, actúa como regulador negativo de la vía de Dpp en la ovogénesis, promoviendo la degradación de la proteína co-Smad, Medea, durante la diferenciación del epitelio folicular. Dado que la pérdida de función de *slmb* no resultó suficiente para activar la expresión del reportero *dad*¹⁸⁸³ en los clones alejados de la fuente de Dpp, proponemos que la estabilización de Medea sensibiliza a las células mutantes, de modo que con bajos niveles del ligando Dpp estas células son capaces de activar ectópicamente la transcripción de distintos genes blanco de la vía.

5. Interacción de Slmb con componentes y reguladores de los complejos SCF

Los experimentos descriptos hasta aquí permiten definir la participación de Slmb en distintas etapas de la ovogénesis. Sin embargo, no presentamos aún evidencias que sugieran que esta proteína ejerce su función como subunidad F-box de un complejo SCF. Si este fuera el caso, mutaciones de otros componentes del complejo SCF o de factores involucrados en su regulación deberían provocar fenotipos coincidentes con los observados tras la pérdida de función de *slmb*. Para investigar si la función de Slmb en el ovario realmente involucra la participación del complejo SCF, generamos clones homocigotas *dCull1*¹⁰⁴⁹⁴, utilizando una flipasa cuya expresión se induce por shock térmico (*Hs-Flp*), obteniendo clones mutantes tanto en el linaje germinal como en la línea somática. Los fenotipos resultantes de la pérdida de función de *dCull1* fueron analizados en ovariolas teñidas con DAPI, donde encontramos una alta proporción de anomalías que fueron semejantes a las observadas en los clones mutantes *slmb*. Estos fenotipos incluyeron folículos con severos defectos de encapsulación (folículos con dos o más ovocitos y exceso de células nodrizas), ausencia de tallos interfoliculares, defectos en las mitosis del cisto (exceso o defecto de células germinales en folículos con un solo ovocito), y tamaño

heterogéneo de los núcleos de las células nodrizas (Fig. 39A,B). Previamente, se había reportado que los clones *dCul1* de línea germinal, presentan también otros defectos, como el completo arresto de la división mitótica del cisto, que desarrolla un gran núcleo poliploide en la región IIB del germario [149]. Si bien estos fenotipos no se observaron en los clones mutantes *slmb*, la diferencia puede deberse a que dCul1 forma parte de distintos complejos SCF y por lo tanto, regula la función de sustratos adicionales. Podemos concluir, por lo tanto, que la pérdida de función de un segundo componente de los complejos SCF, la proteína dCul1, provoca fenotipos coincidentes con los observados tras la pérdida de función de *slmb*.

Teniendo en cuenta estas evidencias y con el objeto de investigar si Slmb forma parte de un complejo SCF *in vivo*, analizamos interacciones génicas dominantes en ovarios de moscas doble heterocigotas para *slmb* y distintos alelos mutantes *dCul1*. Tanto las ovariolas de estas hembras, como el fenotipo de los huevos depositados fueron indistinguibles de los salvajes (no se muestra), indicando que una sola dosis de ambos genes es suficiente para el normal desarrollo del folículo. Como segunda estrategia, para hacer más sensible nuestro sistema de análisis, generamos clones homocigotas para *slmb*², que al mismo tiempo eran heterocigotas para *dCul1*¹²⁷⁶⁴. En estos ovarios analizamos tanto la diversidad como la penetrancia de los distintos fenotipos provocados¹¹. Observamos que los defectos de encapsulación aumentaron de 9.9% en ovarios *slmb*²/*slmb*² (N=483) a 32.1% en ovarios *dCul1*¹²⁷⁶⁴/+; *slmb*²/*slmb*² (N=156). Otros defectos menos penetrantes observados en los clones mutantes *slmb* también se incrementaron en los doble mutantes, aunque en una proporción menor (Tabla 4). Asimismo, observamos que los ovarios *dCul1*¹²⁷⁶⁴/+; *slmb*²/*slmb*² frecuentemente presentaron fenotipos más extremos a los observados en los homocigotas *slmb*², tales como la encapsulación de varios cistos en el mismo epitelio folicular y fenotipos que no habían sido observados previamente, como germarios “tumerosos” conteniendo gran cantidad de CMG y cistoblastos en desarrollo (Fig.39C). Estos nuevos fenotipos observados ponen en evidencia que la función llevada a cabo por Slmb resulta aún más alterada tras la pérdida simultánea de la función de dCul1. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que Slmb formaría parte de un complejo SCF en el ovario.

Por otro lado, se sabe que el signalosoma COP9 (CSN) es un complejo multiproteico, homólogo a la subunidad 19S del proteasoma, que está involucrado en el

¹¹ Los clones fueron generados utilizando una flipasa inducible por heat shock, lo que produjo clones en ambos linajes celulares.

control de la estabilidad de numerosos factores celulares [267, 268]. Ha sido reportado que el signalosoma media la de-neddilación de la proteína Cull1, regulando así la actividad de los complejos SCF [269]. Por otro lado, se ha demostrado que mutaciones que afectan las subunidades CSN4 y CSN5 del signalosoma causan defectos muy similares a los encontrados en los mutantes *slmb*, como por ejemplo, alteraciones en la morfología del corion y folículos con número anormal de células germinales [149, 270]. En búsqueda de nuevas evidencias que involucren a Slmb en un complejo SCF, analizamos interacciones génicas dominantes entre *slmb* y mutantes para las subunidades CSN4 o CSN5 del signalosoma. Nuevamente en este caso, las ovariolas de las hembras doble-heterocigotas fueron indistinguibles de las ovariolas salvajes, demostrando que una sola dosis de cada uno de los genes es suficiente para llevar a cabo normalmente sus funciones. Decidimos entonces utilizar la misma estrategia de “sensibilización del sistema” descrita para dCull1. Analizando ovariolas de hembras en las que se indujeron clones mutantes *slmb*, que fueron a la vez heterocigotas para CSN5, observamos que los defectos de encapsulación aumentaron del 9.9% observado en los homocigotas *slmb*²/*slmb*² (N=483) al 25.4%, cuando los ovarios fueron CSN5^{L4032/+}; *slmb*²/*slmb*² (N=130). También en este caso, otros fenotipos anómalos aumentaron su penetrancia (Tabla 4), así como también su severidad (no se muestra). Estos resultados demostraron que también existe interacción entre Slmb y el signalosoma COP9. Por lo tanto, habiendo detectado interacciones positivas entre Slmb y dCull1, como así también entre Slmb y CSN5, proponemos que Slmb ejerce su función como parte de un complejo SCF durante la ovogénesis de *Drosophila*.

Tabla 4: Penetrancia de los fenotipos anómalos observados en los ovarios mutantes *slmb* y en los ovarios que fueron simultáneamente heterocigotas mutantes para *dCull1* o para CSN5.

Genotipo	<i>slmb</i> ² / <i>slmb</i> ² (N=483)	CSN5 ^{L4032/+} ; <i>slmb</i> ² / <i>slmb</i> ² (N=120)	<i>dCull1</i> ^{12764/+} ; <i>slmb</i> ² / <i>slmb</i> ² (N=156)
Folículos con mas de 16 células germinales	9,9%	25,4%	32,1%
Cistos con menos de 16 células germinales	1,7%	5%	3,2%
Apoptosis prematura	3,7%	10%	7%
Heterogeneidad nuclear de las nodrizas	2,9%	3,5%	4,5%

Figuras

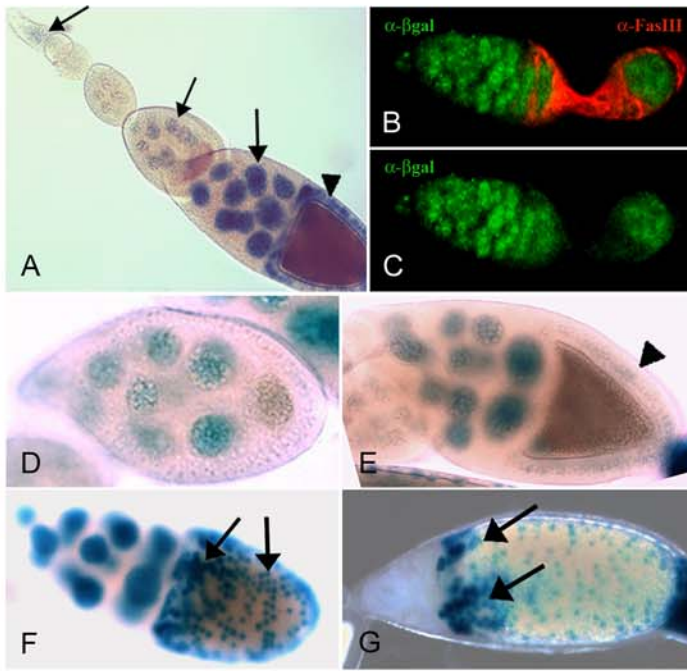


Figura 28

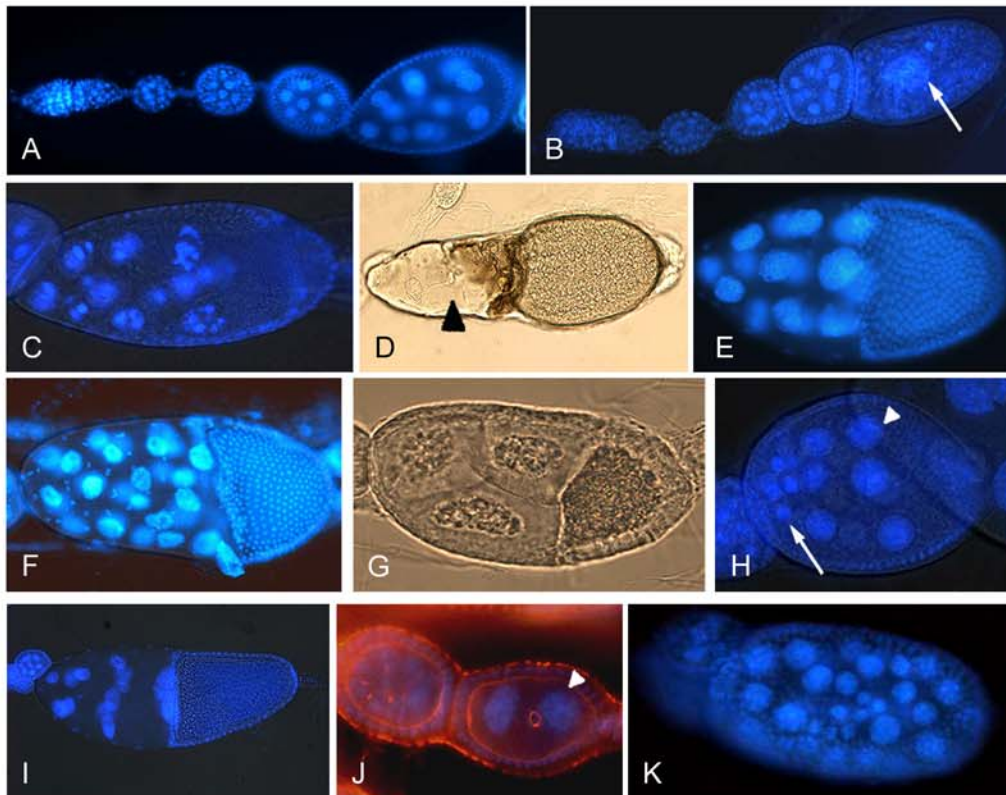


Figura 29

Figura 28. Patrón de expresión de *slmb* en el ovario. Ovarios de hembras de la línea *enhancer trap slmb*⁰⁰²⁹⁵ fueron analizados por tinción con X-gal o con anticuerpos anti-βgalactosidasa (β-gal) para evidenciar la expresión de *LacZ*. **(A)** Ovariola mostrando que *LacZ* se expresa desde estadios tempranos en las células germinales, continuando su expresión hasta el final de la ovogénesis (flechas). En las células foliculares, la expresión de *slmb*⁰⁰²⁹⁵ comienza a partir de la ovogénesis media (cabeza de flecha). **(B,C)** Imagen de microscopía confocal, mostrando que en el germario, la expresión de β-gal (en verde) aparece exclusivamente en la línea germinal y parece estar ausente de las células foliculares que expresan FasIII (en rojo). **(D-E)** La expresión de β-gal no se detecta en el epitelio folicular hasta el estadio 8 de la ovogénesis, comenzando a aparecer débilmente a partir del estadio 9 (**E**, cabeza de flecha). **(F)** En el estadio 10 de la ovogénesis, las células columnares que rodean al ovocito expresan altos niveles de β-gal (flechas). **(G)** En el estadio 11, la expresión de *LacZ* se hace más intensa en los dos grupos de células antero-dorsales que darán origen a los AD (flechas).

Figura 29: Fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb* en el linaje germinal; microscopía de fluorescencia o de luz transmitida. **(A)** Tinción con DAPI de una ovariola salvaje, poniendo en evidencia los núcleos celulares. **(B)** En las ovariolas con clones mutantes *slmb*, los cistos frecuentemente degeneran (flecha) o muestran signos de fragmentación nuclear (**C**), evidenciando la muerte por apoptosis de las células nodrizas. **(D)** Contrariamente, en muchos cistos mutantes *slmb* las células nodrizas no mueren por apoptosis cuando deberían hacerlo en estadios avanzados de la ovogénesis (cabeza de flecha) y tampoco completan el proceso de dumping. El folículo mostrado es del estadio 14 de la ovogénesis, por lo que se puede observar que las células foliculares ya depositaron el corion proteico sobre el huevo. **(E)** Tinción con DAPI de un folículo salvaje de estadio 10; el cisto incluye 15 células nodrizas y un ovocito. **(F-G)** Folículos mutantes para *slmb* donde se observan cistos con el número alterado de células germinales; en algunos casos hay exceso de células nodrizas (**F**) y en otros, una cantidad de células nodrizas menor a la normal (**G**). **(H-I)** Los cistos mutantes *slmb* frecuentemente presentan un tamaño heterogéneo de los núcleos de las células nodrizas (flechas en **H**), evidenciando defectos en el proceso de endorreplicación del genoma. **(J-K)** Los defectos de endorreplicación se correlacionan a veces con fallas en las divisiones mitóticas. Cistos con menos de 15 células nodrizas presentan núcleos de tamaño mayor al esperado (**J**, cabeza de flecha), mientras que aquéllos con más de 16 células germinales (**K**) presentan núcleos de tamaño variable, algunos con tamaño menor al normal, sugiriendo defectos en la transición de mitosis a endorreplicación.

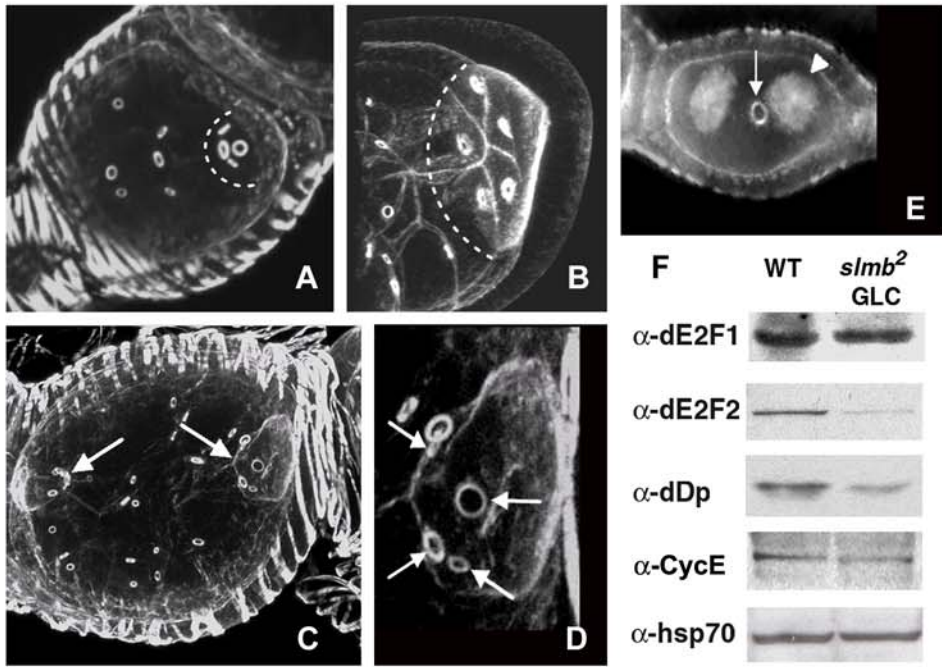


Figura 30

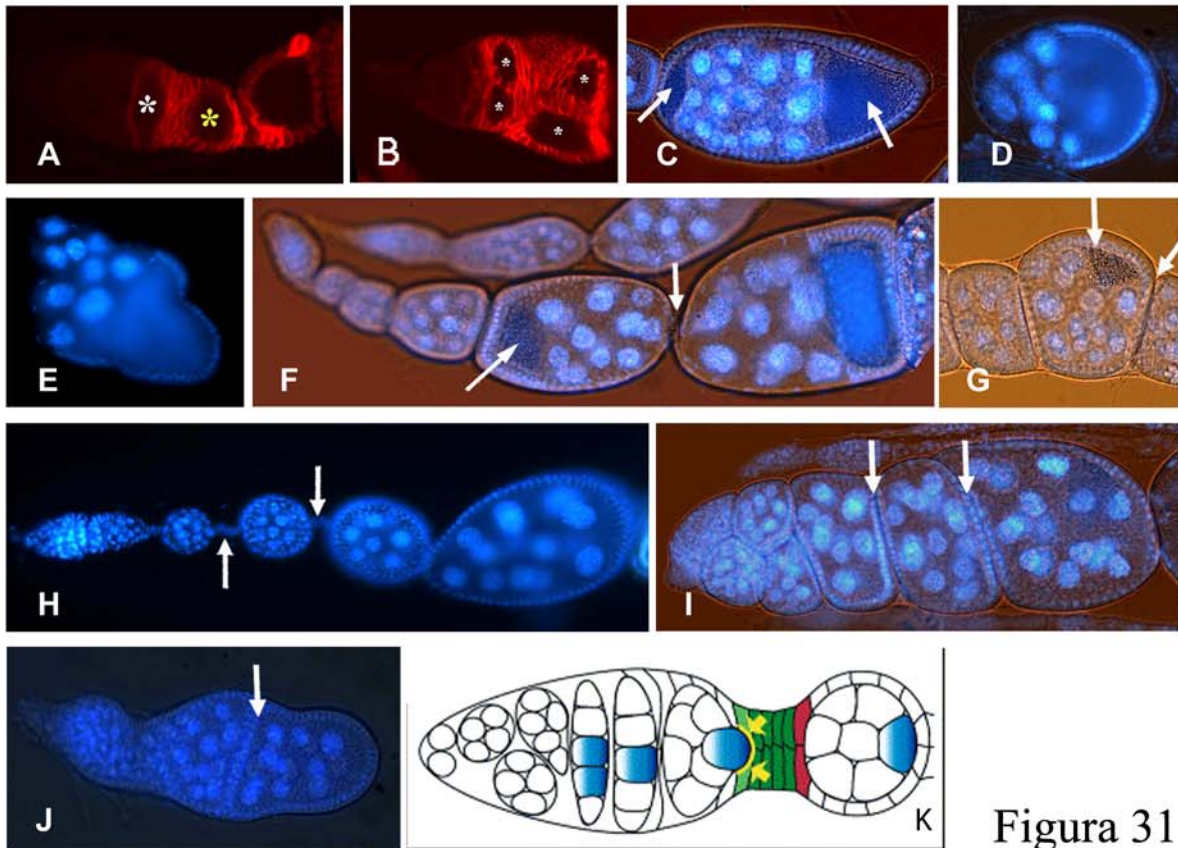


Figura 31

Fig. 30: Divisiones mitóticas en los cistos mutantes *smb*. Los folículos fueron teñidos con Falloidina fluoresceinada para marcar los canales *ring*; imágenes de microscopía confocal. **(A)** El folículo salvaje presenta cuatro canales *ring* sobre la superficie del ovocito (marcado con línea punteada), los cuales denotan que el cisto se originó a partir de cuatro divisiones mitóticas. **(B)** Los folículos mutantes *smb* que presentaron más de 15 células nodrizas y un ovocito (marcado con línea punteada), tuvieron siempre cinco canales *ring* sobre la superficie del mismo, poniendo en evidencia que en dicho cisto hubo una ronda adicional de mitosis. **(C)** Los cistos mutantes con exceso de células nodrizas y dos ovocitos (flechas) exhibieron un número normal de canales *ring* (cuatro canales) sobre cada uno de ellos, confirmando que las divisiones mitóticas en esos cistos fueron normales. **(D)** Imagen ampliada de uno de los ovocitos del folículo mostrado en el panel C. Las flechas marcan los cuatro canales *ring* sobre la superficie del ovocito. **(E)** Los folículos con un número de células germinales menor al normal (sólo dos células en este caso) presentaron también un número menor de canales *ring* (un solo canal en este cisto), indicando cuál fue la cantidad rondas mitóticas ocurridas en el cisto. **(F)** Análisis por *western blot* de extractos de ovarios salvajes y de ovarios con clones mutantes *smb*. Los niveles de las proteínas E2F1 y CycE no se alteran en los extractos provenientes de ovarios con clones *smb*, mientras que los niveles de Dp y E2F2 disminuyen en los mutantes. La proteína Hsp70 fue utilizada como control.

Figura 31: Fenotipos provocados por la pérdida de función de *smb* en el linaje somático; microscopía de fluorescencia y confocal. **(A)** germario de una ovariola salvaje teñido con anti-FasIII. La región IIA/B del germario está ocupada por un solo cisto en forma de disco (asterisco amarillo), mientras que en la región III el cisto ha retomado su forma esférica (asterisco blanco). **(B)** En los germarios mutantes *smb*, la morfología del germario está frecuentemente alterada, observándose varios cistos situados lado a lado en las regiones IIA/B o III del germario (asteriscos). **(C)** Se observan defectos de encapsulación, en donde dos cistos fueron envueltos por un mismo epitelio folicular, generándose un folículo supernumerario con dos ovocitos (flechas). **(D-E)** Los folículos con clones mutantes *smb* tienen frecuentemente una morfología general anómala, evidenciando defectos en la diferenciación del epitelio folicular. **(F-G)** La pérdida de función de *smb* en el linaje folicular provoca alteraciones en la interacción cisto-soma, lo que causa la deslocalización frecuente de los ovocitos dentro del cisto. En **(F)** se muestra un ovocito localizado en la parte anterior del folículo y en **(G)**, un ovocito localizado lateralmente. En algunos casos, los folículos con ovocito deslocalizados presentan tallo interfolicular posterior **(F, flecha)**, mientras que en otros el tallo posterior no se forma **(G, flecha)**. **(H)** Ovariola salvaje teñida con DAPI. Con flechas se marcan los tallos interfoliculares que separan a un folículo de sus folículos vecinos. **(I)** La pérdida de función de *smb* en las células foliculares provoca la pérdida de tallos interfoliculares separando los folículos (flechas). **(J)** En casos más severos, los folículos quedan fusionados y se los encuentra separados solamente por una capa de epitelio folicular (flecha). **(K)** Modelo de Torres et al., mostrando que las células del tallo anteriores de un folículo dado inducen el posicionamiento posterior del ovocito en el folículo inmediatamente anterior en el germario (Fig. adaptada de Torres *et al* [244]).

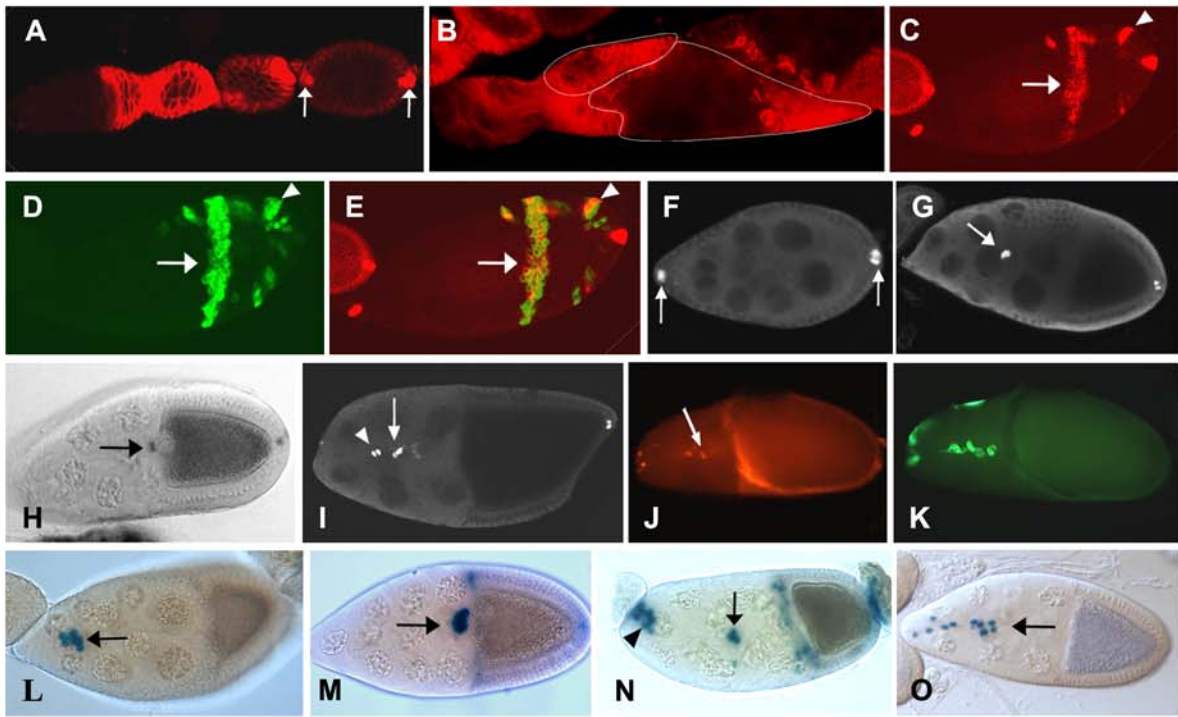


Figura 32

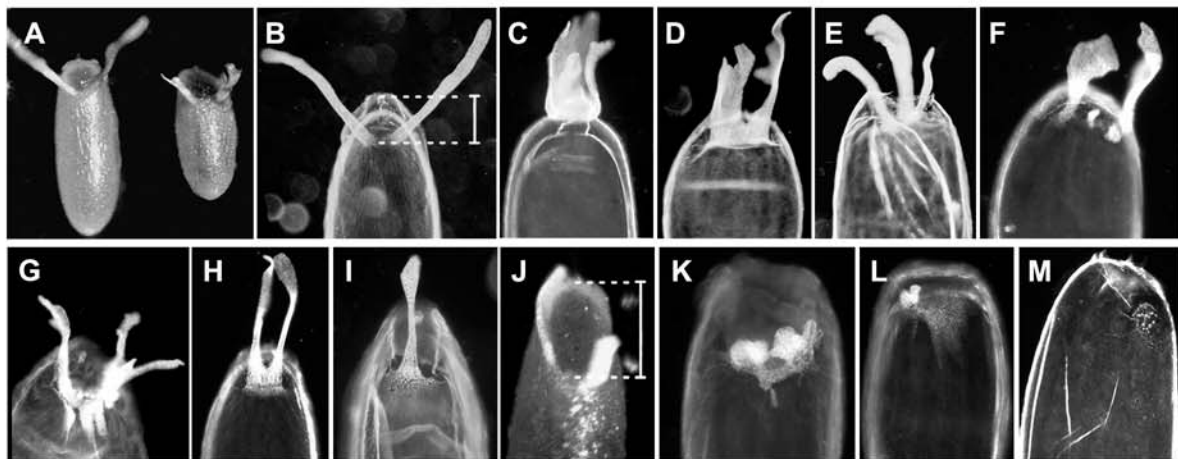


Figura 33

Figura 32: Retraso en la diferenciación celular y aparición de células polares ectópicas en folículos con clones mutantes *slmb*. **(A)** En ovariolos salvajes el patrón de expresión de FasIII (rojo), que inicialmente marca a todas las células foliculares del germario se va reduciendo hasta quedar restringido en el estadio 4 a los dos pares de células polares (flechas). **(B)** En ovariolos con clones mutantes *slmb* el patrón de FasIII no se reduce y continúa siendo amplio en estadios avanzados de la ovogénesis, sugiriendo que la diferenciación de las células foliculares se ha retrasado (el contorno de 2 folículos se marca con líneas blancas). **(C)** En los folículos de estadio 9 con clones mutantes *slmb* todavía se observan grandes grupos de células indiferenciadas expresando FasIII (flecha). **(D)** Los clones mutantes *slmb* fueron marcados positivamente con GFP; como puede observarse en los paneles **C-E**, el patrón de expresión de FasIII coincide con el patrón de GFP, indicando que la expresión ectópica de FasIII es un efecto autónomo de célula. La cabeza de flecha en **C-E** marca un par de células que expresan ectópicamente niveles elevados de FasIII, sugiriendo que podrían ser células polares adicionales. **(F-H,J)** El *enhancer trap PZ80* confiere expresión de β -galactosidasa exclusivamente en las células polares del folículo. En ovarios salvajes de estadio 8 **(F)**, los dos pares de células polares (flechas) se encuentran respectivamente en los extremos anterior y posterior del folículo. Durante el estadio 9 de la ovogénesis **(G)** el par anterior de células polares (flecha) migra posteriormente abriéndose paso entre las células nodrizas y hacia el estadio 10 **(H)** el par de células polares ya ha alcanzado el borde anterior del ovocito (flecha). **(I)** En folículos con clones mutantes *slmb* se observan frecuentemente pares de células polares ecópicas (cabeza de flecha) y tanto las células polares normales, como las ectópicas suelen retrasar su migración en sentido posterior (en la fotografía se ve un folículo de estadio 10 con las células polares todavía migrando entre las nodrizas). **(J,K)** La diferenciación de células polares ectópicas es un efecto autónomo de célula de la pérdida de función de *slmb*. La expresión de β -galactosidasa a partir de PZ80 **(J)** coincide con la expresión de GFP **(K)** que marca las células mutantes *slmb*. **(L-O)** El reportero transcripcional *slbo-LacZ* se expresa exclusivamente en las células *border*, células cuya diferenciación es inducida por el par de células polares anteriores. En folículos salvajes la migración comienza en el estadio 9 **(L, flecha)** y hacia el estadio 10 **(M)** las células *border* ya han alcanzado el borde anterior del ovocito (flecha). **(N,O)** En folículos con clones mutantes *slmb* se observan grupos de células *border* ectópicas, retrasadas en su migración en sentido posterior **(N, cabeza de flecha)**. **(O)** En algunos folículos mutantes los grupos de células *border* se disgregan (flecha) y no migran normalmente hacia la región posterior del folículo.

Figura 33: Morfología del corion de huevos mutantes *slmb* visualizados bajo lupa o por microscopía de campo oscuro. **(A)** Los huevos depositados por hembras con clones *slmb* de línea germinal (derecha) son mucho más pequeños que los depositados por hembras salvajes (izquierda). **(B)** Vista dorsal de la parte anterior de un corion salvaje, donde se observan los dos apéndices dorsales y el opérculo, cuyo tamaño se indica con una cota. **(C-M)** En huevos provenientes de folículos con clones mutantes *slmb* se observan diversas anomalías en la morfología y posición de los apéndices dorsales (AD). Dichas anomalías incluyen fenotipos dorsalizados **(C-E)**, deposición ectópica de material de AD en la región intermedia **(F)**, AD ramificados **(G)**, fenotipos ventralizados **(H,I)**, como así también, AD desplazados posteriormente **(J)**, reducidos **(K,L)** o ausentes **(M)**. Nótese que en los casos en los que los DA están desplazados posteriormente **(J)**, el opérculo aparece claramente expandido (comparar el tamaño de la cota en **J** con el de la cota en **B**).

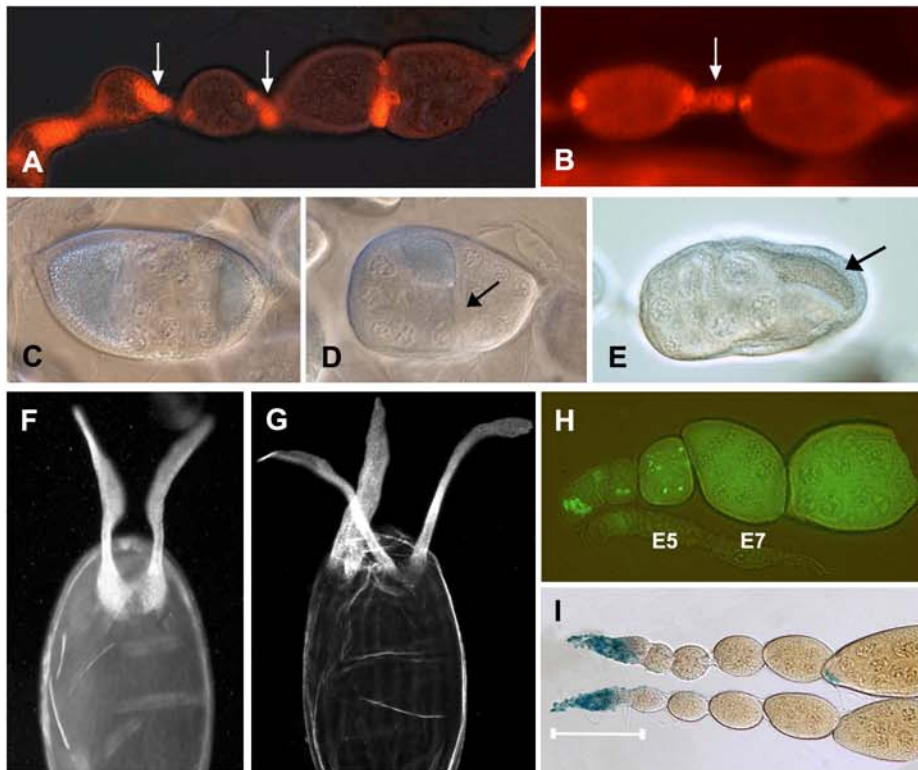


Figura 34

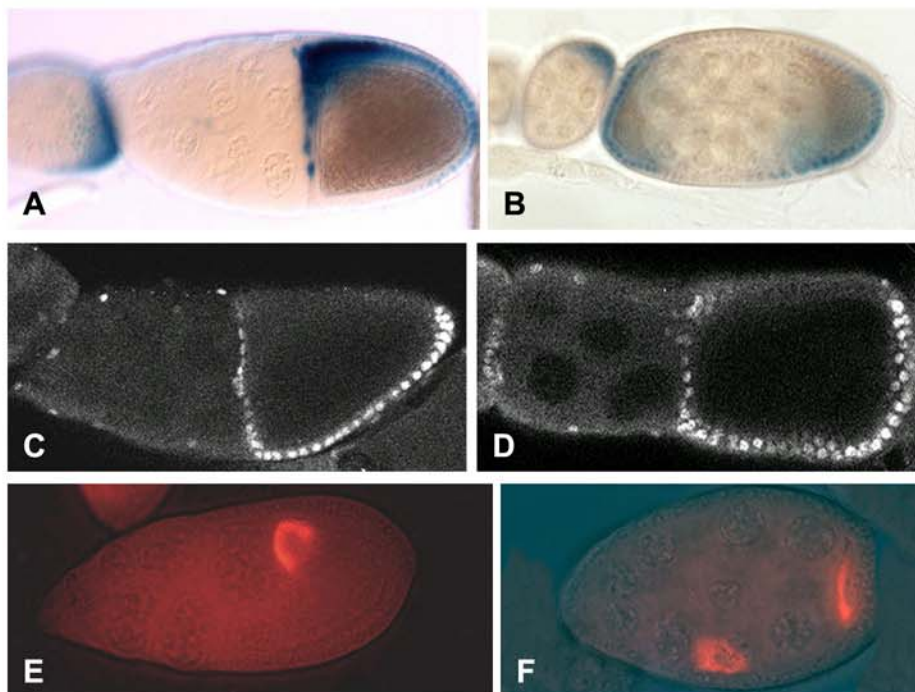


Figura 35

Figura 34: Hiperactivación de la vía Hh en el linaje folicular: **(A-B)** La sobre-expresión de Hh provocó la proliferación excesiva de células foliculares indiferenciadas que expresan FasIII (flechas), las cuales se ubicaron formando largos tallos entre los folículos adyacentes. La hiperactivación de la vía Hh provocó además defectos de encapsulación, observándose folículos supernumerarios con más de un ovocito **(C)**, folículos parcialmente fusionados, separados por una monocapa de epitelio folicular **(D)**, flecha) y folículos en los que el ovocito se encontró deslocalizado **(E)**. **(F,G)** La sobre-expresión de Ci causó defectos leves en la morfología del corion, observándose fusión de los AD en la base **(F)** y huevos con AD ectópicos, sugiriendo que dos cistos se desarrollaron dentro del mismo epitelio folicular **(G)**. En las ovariolas salvajes, las divisiones mitóticas en el epitelio folicular tienen lugar hasta el estadio 6 de la ovogénesis, como se evidencia con el marcador de mitosis anti-fosfo Histona3 **(H)**. El patrón de anti-pH3 resultó normal en los folículos con clones mutantes *slmb*, distinto a lo observado luego de hiperactivar a la vía Hh en el ovario. De igual manera, tinciones con X-gal revelan que la expresión del gen reportero de la vía Hh, *ptc-LacZ*, no se altera en los clones mutantes *slmb*, observándose siempre restringida al germario **(I)**, el germario se indica con una línea blanca).

Figura 35: La vía del EGFR no está alterada en los clones mutantes *slmb*. **(A)** En folículos salvajes de estadio 10, el reportero *kekkon-LacZ* se expresa en el dominio dorso-anterior del epitelio folicular en respuesta a la activación de la vía del EGFR. En el estadio 6, su expresión se observa en la región posterior del folículo (folículo mas joven, a la izquierda del panel). **(B)** La expresión de *kekkon-LacZ* no está alterada en folículos mutantes *slmb*, siendo normal aún en un caso como el de la fotografía, en el que un mismo folículo tiene 2 ovocitos. **(C)** El gen reportero *pipe-LacZ* se expresa en ovarios salvajes en un patrón complementario al de *kekkon*, marcando las células foliculares del dominio ventral. **(D)** La expresión de *pipe-LacZ* tampoco resultó alterada en los folículos mutantes *slmb*, ni siquiera en aquéllos como el que se muestra, que presenta defectos en la morfología general del epitelio folicular. **(E)** En folículos salvajes, la proteína Gurken se localiza junto al núcleo del ovocito y señala hacia el epitelio folicular cercano a él. **(F)** La localización perinuclear de Grk no resultó alterada en los clones mutantes *slmb* de línea germinal, ni siquiera en los folículos supernumerarios que incluían más de un ovocito.

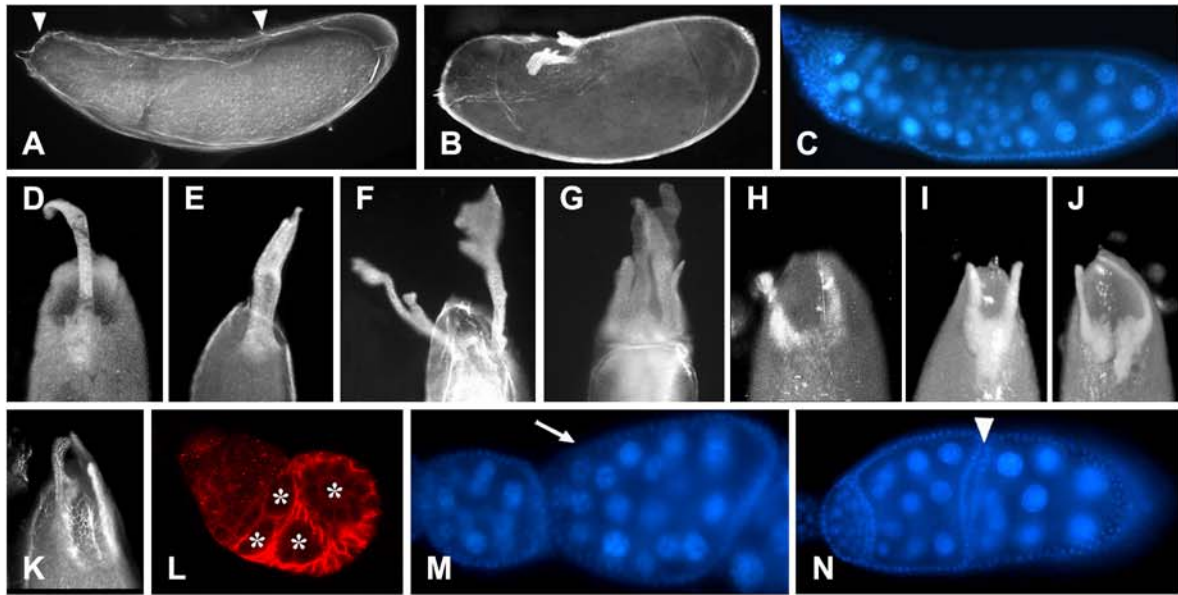


Figura 37

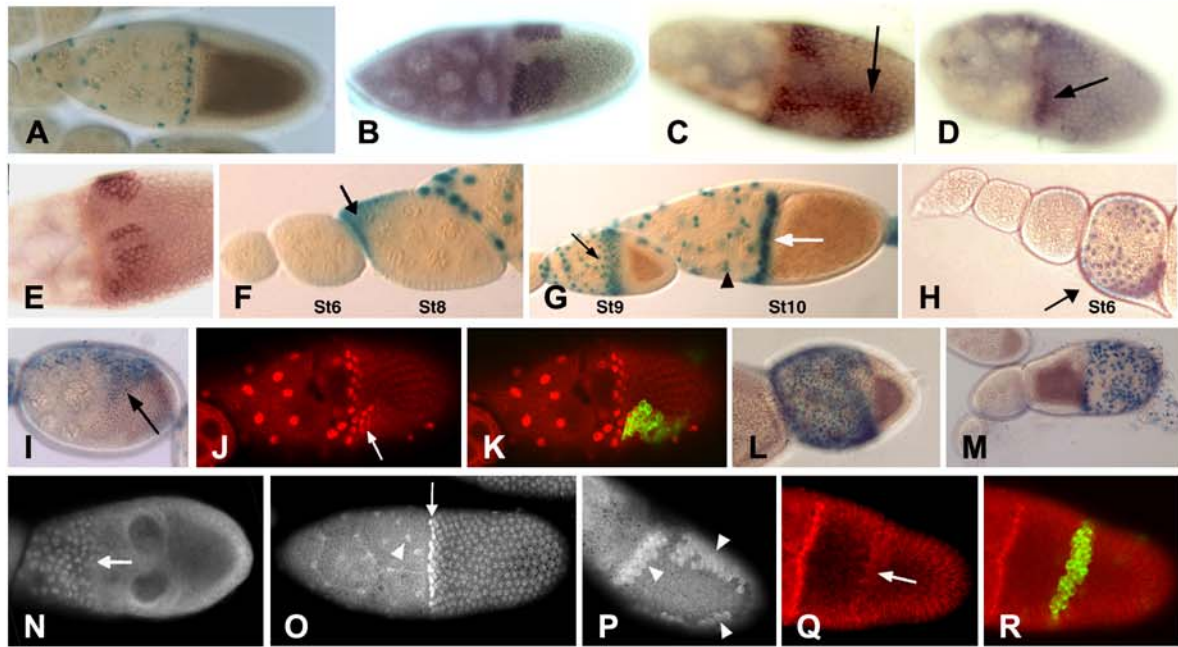


Figura 38

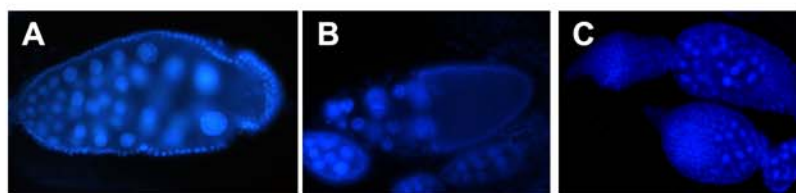


Figura 39

Figura 37: Fenotipos causados por la hiperactivación de la vía de Dpp en el linaje somático del ovario. **(A)** Altos niveles de sobre-expresión de Dpp generan huevos con el opérculo dramáticamente expandido y sin apéndices dorsales (**A**, las cabezas de flechas marcan el límite anterior y posterior del opérculo) o **(B)** con apéndices dorsales muy reducidos y desplazados posteriormente. **(C)** Las ovariolas de las hembras sometidas a altos niveles del Dpp presentan germarios tumorosos y gran cantidad de cistos encapsulados en un mismo epitelio folicular. **(D-N)** La hiperactivación débil de la vía de Dpp provoca una gran variedad de fenotipos anómalos, coincidentes con los observados en los clones mutantes *smb*. **(D-H)** Las hembras que sobre-expresan Dpp débilmente depositan huevos con gran variabilidad en la morfología de los AD, observándose un único AD fino en el centro (**D**), AD fusionados (**E**), AD expandidos y ramificados (**F**), a veces rodeando todo el extremo anterior del huevo (**G**) y AD muy reducidos (**H**). También se observaron AD dorsales reducidos en el corion de los huevos depositados por hembras heterocigotas para los genes *sog* (**I**) y *dad* (**J-K**). **(L-N)** Las hembras sometidas a sobre-expresión débil de Dpp presentaron además, alteraciones en la morfología del germario (**L**), defectos de encapsulación de los cistos, evidenciadas por la presencia de folículos supernumerarios (**M**) y falta de células del tallo separando folículos adyacentes (**N**).

Figura 38: Estudio de marcadores moleculares de la vía de Dpp en folículos con clones *smb*. **(A)** La línea reportera *dpp*¹⁰⁶³⁸ funciona como *enhancer trap* del gen *dpp* en el ovario. En folículos salvajes, la expresión de β -gal se observa en las células derivadas del dominio terminal-anterior del epitelio folicular; la expresión de *LacZ* no se encuentra alterada en los clones mutantes *smb*. **(B-E)** Patrón de expresión del gen *BR-C* detectado por hibridización *in situ* de mRNA. **(B)** En los folículos salvajes de estadio 10, *BR-C* se expresa en los dos parches de células antero-dorsales que darán origen a los AD. **(C-E)** En los folículos con clones mutantes *smb*, la transcripción de *BR-C* se altera, observándose casos en los que el dominio de expresión está expandido (**C**, flecha), mientras que en otros casos la expresión de *BR-C* se encuentra reducida (**D**, flecha) o particionada (**E**). **(F-M)** Expresión de la línea reportera *dad*¹⁸⁸³ en el ovario. En ovariolas salvajes (**F,G**), *dad-LacZ* se detecta a partir del estadio 8 de la ovogénesis, en las células anteriores del epitelio folicular, no observándose expresión en estadios mas tempranos (**F**). **(G)** En el estadio 9, *dad-LacZ* marca todas las células foliculares derivadas del dominio anterior que comienzan a migrar

posteriormente (flecha negra). En el estadio 10, la expresión es fuerte en las células centrípetas situadas en el borde anterior del ovocito (flecha blanca) y en el epitelio asociado a las células nodrizas. **(H-M)** Expresión de *dad-LacZ* en folículos con clones *slmb*. **(H)** En algunas ovariolas se observan folículos mutantes que expresan el reportero prematuramente en el estadio 6 (flecha) o que presentan una expansión posterior del dominio de expresión de *dad-LacZ* **(I, flecha)**. **(J-K)** En folículos mutantes de estadio 10 la marca ectópica de *dad-LacZ* (flecha) se detecta en grupos de células adyacentes a la hilera de células centrípetas. **(K)** La marcación positiva de los clones mutantes *slmb* con GFP pone en evidencia que la expresión ectópica de este reportero ocurre por un mecanismo autónomo de célula. **(L)** Frecuentemente, los folículos con clones *slmb* presentan un mayor número de células foliculares que expresan *dad-LacZ*, aunque estas células están siempre restringidas al dominio anterior del epitelio folicular, sugiriendo que la alteración del patrón de *dad-LacZ* refleja defectos previos en la diferenciación del epitelio folicular. **(M)** De igual manera, los folículos con el ovocito deslocalizado (anterior en este caso) también alteraron el patrón de expresión de *dad-LacZ*, respondiendo a la inversión de la polaridad del folículo. **(N-R)** Patrón de expresión de la proteína co-Smad, Medea. **(N,O)** En ovariolas salvajes, la expresión de Medea se detecta a partir del estadio 9 **(N)**, en las células foliculares anteriores que comienzan a migrar posteriormente (flecha) y en el estadio 10 **(O)** en todas las células foliculares pero con mayor intensidad en las células centrípetas (flecha). **(P,Q)** En folículos con clones mutantes *slmb* se observan grupos de células foliculares que acumulan Medea ectópica en altos niveles (cabezas de flecha en **P**; flecha en **Q**). **(R)** La marcación positiva con GFP del clon mutante mostrado en el panel **Q** muestra que la acumulación ectópica de Medea es un efecto autónomo de célula, provocado por la falta de *slmb*.

Figura. 39: Interacción de *Slmb* con componentes y reguladores de los complejos SCF. Las ovariolas fueron teñidas con DAPI para analizar su estructura. La pérdida de función de *dCull1* en el ovario de *Drosophila* dio lugar a la aparición de anomalías coincidentes con las observadas en los clones mutantes *slmb*, como por ejemplo, **(A)** defectos en el proceso de encapsulación y **(B)** tamaños heterogéneos de los núcleos de las células nodrizas. **(C)** Interacciones genéticas entre *slimb* y *dCull1*. En ovarios de hembras *slmb²/slmb²; dcull1/+* se observó tanto un incremento en la penetrancia de los fenotipos anómalos de los mutantes *slmb*, como la aparición de fenotipos que no habían sido observados en los clones mutantes *slmb* como por ej, el desarrollo de germarios tumorosos con gran incremento en el número de células germinales **(C)**.

Discusión

- **Slmb es necesario en la línea germinal y en el linaje somático del ovario para el desarrollo del ovocito de *Drosophila*.**

Los estudios genéticos realizados en este trabajo de tesis, demuestran que la proteína F-box, Slmb, es necesaria durante la ovogénesis, tanto en la línea germinal como en el linaje somático del ovario. La pérdida de función de *slmb* en el linaje germinal resulta en la desregulación de los ciclos mitóticos que dan origen al cisto, como así también en la alteración de los programas de dumping y apoptosis que llevan a cabo las células nodrizas en los últimos estadios de la ovogénesis. Por otro lado, los clones mutantes *slmb* generados en el linaje folicular provocan una variedad de anomalías, que incluyen defectos en la encapsulación del cisto, retraso de la diferenciación de las células foliculares, disrupción de la polaridad del folículo, generación de células polares ectópicas y defectos en la morfología del corion. Si bien la expresión de *slmb* no pudo detectarse por hibridización *in situ* de RNA, el patrón de expresión de la línea *enhancer trap slmb*⁰⁰²⁹⁵ sugirió que la transcripción de *slmb* es constitutiva en el linaje germinal y dinámica en las células somáticas, aumentando notoriamente a partir del estadio 10, particularmente en el epitelio columnar que rodea al ovocito (las células foliculares asociadas a las nodrizas no parecen expresar *slmb*).

Si bien la expresión de *LacZ* no se detectó en las células foliculares del germario, los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb* en linaje somático, particularmente aquéllos asociados a defectos de encapsulación, sugirieron que Slmb es requerido en las células foliculares también en el germario. Al respecto, es importante notar que si bien las líneas *enhancer trap* pueden resultar muy útiles como reporteros transcripcionales, su patrón de expresión no siempre refleja todos los aspectos de la regulación del gen endógeno.

Otro aspecto interesante de la expresión de este *enhancer trap* es que en el estadio 11 de la ovogénesis, se observó fuerte expresión en los dos parches de células que dan origen a los apéndices dorsales. Consistente con este patrón, observamos que Slmb es requerido para la especificación de los apéndices dorsales durante la morfogénesis del corion.

- **Slmb es necesario para la regulación del ciclo celular durante el desarrollo del cisto**

Los experimentos de pérdida de función de *slmb* realizados en este trabajo de tesis demostraron que esta proteína F-box es requerida en el linaje germinal para regular las divisiones mitóticas que dan origen al cisto. Asimismo, Slmb es necesaria para el proceso de endorreplicación del genoma y para que se lleven a cabo normalmente los programas de dumping y apoptosis en las células nodrizas. El mecanismo por el cual el número de divisiones mitóticas de la línea germinal se restringe a cuatro, no ha sido aún completamente clarificado. Se sabe, sin embargo, que la desregulación de los niveles de Ciclina E (CycE), factor requerido para la transición G1-S del ciclo celular, provoca alteraciones tanto en las divisiones mitóticas del cisto como en el proceso de endorreplicación del genoma de las células nodrizas. Mutantes hipomórficos de *cycE* producen una alta proporción de cistos con 8 ó con 32 células germinales y sufren alteraciones en la transición de politenia a poliploidía que ocurre normalmente en el estadio 5 de la ovogénesis [243]. Asimismo, la sobre-expresión o la estabilización de CycE conduce a la desregulación de las mitosis del cisto, a una entrada prematura en endorreplicación y a la apoptosis de las células nodrizas en estadios tempranos de la ovogénesis [149, 271]. Se conocen distintas proteínas involucradas en la regulación de los niveles de CycE; entre ellas, la enzima conjugadora de ubiquitina, UbcD1 [271, 272], las subunidades CSN4 y CSN5 del signalosoma [149] y la proteína Encore, que media la interacción de los complejos SCF con el proteasoma [271]. Si bien estas evidencias convertían *a priori* a la CycE en candidata a ser regulada por Slmb en el ovario, el análisis por *western blot* realizado en esta tesis demostró que sus niveles no están alterados en los clones germinales *slmb*, sugiriendo que CycE no sería responsable de generar los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb*. Otros grupos demostraron que Archipelago, una proteína con motivo F-box descrita recientemente en *Drosophila*, reconoce y promueve la ubiquitinación de CycE, tanto en discos imaginales, como durante la ovogénesis [149, 271, 273]. Por lo tanto, las evidencias obtenidas en esta tesis junto a lo

reportado por otros laboratorios, sugieren que el complejo SCF^{Slmb} no estaría involucrado en la degradación de CycE en el ovario de *Drosophila*.

Trabajos recientes demostraron que Slmb controla la progresión del ciclo celular en discos imaginales de ala, mediando la degradación del factor de transcripción y modulador del ciclo celular, E2F1 [173]. Asimismo, ha sido demostrado que E2F1 y otros miembros de la familia E2F de factores de transcripción, las proteínas Dp y E2F2, son requeridos durante la ovogénesis para regular las mitosis que dan origen al cisto, la transición de politenia a poliploidía, el proceso de dumping y la apoptosis de las células nodrizas [198, 199]. Los experimentos de *western blot* realizados en este trabajo de tesis revelaron que a diferencia de lo que ocurre en discos imaginales, la proteína E2F1 no se encuentra estabilizada en los ovarios con clones mutantes *slmb*. En células de mamíferos, se encontró que el complejo SCF^{Skp2} es el que media la degradación de E2F1 durante la fase S del ciclo celular [117]. Es posible que también en el ovario de *Drosophila*, E2F1 esté regulado por un complejo SCF que incluye a otra proteína con motivo F-box. Asimismo, nuestros análisis por *western blot* revelaron que los clones *slmb* de línea germinal presentan niveles reducidos de las proteínas E2F2 y Dp, sugiriendo que Slmb estaría regulando a estos factores por un mecanismo indirecto. Es interesante destacar que la disminución de Dp se correlaciona muy bien con los estudios genéticos reportados por Myster y col., quienes observaron que la pérdida de función de *Dp* en la línea germinal provoca una ronda extra de mitosis en el cisto, defectos de dumping y desregulación del programa de apoptosis de las células nodrizas [199]. Por lo tanto, la similitud entre los fenotipos observados en los clones mutantes *slmb* y los clones mutantes *Dp*, refuerza la hipótesis de que Slmb sería un regulador indirecto de los niveles de Dp en el ovario (Fig. 40).

Se ha reportado que el ortólogo humano de Slmb, β -TrCP, promueve la destrucción del regulador de ciclo celular Emi1/Rca1 [102], permitiendo la activación del complejo E3 ligasa APC/C y de este modo, la progresión de la mitosis [274, 275]. Por otro lado, se demostró que E2F1 induce la transcripción de Emi1 en células humanas [275]. Estas evidencias permiten especular que tal vez exista una relación entre la desregulación de Emi1 en el ovario y los defectos de ciclo celular observados en los clones mutantes *slmb*.

En resumen, dado que Slmb cumple un rol en el control del ciclo celular del cisto, disminuyendo indirectamente los niveles de los factores de transcripción Dp y E2F2, proponemos que la pérdida de función de *slmb* en la línea germinal alteraría la compleja red de moduladores del ciclo celular. Un análisis más detallado de la regulación de Dp y E2F2 a través de estudios bioquímicos y genéticos, así como el análisis de posibles

alteraciones en otros moduladores del ciclo celular, permitirán comprender a nivel molecular cuál es el efecto directo causado por la pérdida de función de *slmb* en la línea germinal.

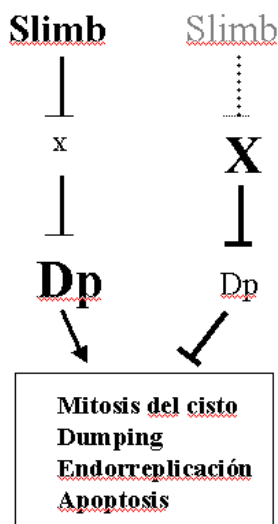


Fig. 40: Regulación indirecta de Dp por parte de Slmb. En la línea germinal, Slmb promovería la degradación de un factor desconocido (X), el cual a su vez funcionaría como regulador negativo de la expresión del factor de transcripción Dp. Niveles adecuados de Slmb, X y Dp permiten que se lleven a cabo normalmente las mitosis del cisto y los procesos de dumping, endorreplicación y apoptosis de las células nodrizas. (izquierda). Contrariamente, la pérdida de función de *slmb* en el linaje germinal resultaría en la estabilización del factor X, provocando indirectamente la disminución de los niveles de Dp. En consecuencia, los procesos de mitosis, dumping, endorreplicación y apoptosis de las células nodrizas resultan alterados (derecha).

- **Slmb es requerido en dos etapas del desarrollo del linaje somático**

Los experimentos de pérdida de función de Slmb en el linaje folicular demostraron que esta proteína cumple una función en las células foliculares, desde estadios muy tempranos de la ovogénesis. Hemos demostrado que Slmb es necesario para la correcta encapsulación del cisto y para la diferenciación de las primeras sub-poblaciones foliculares en el germario. En ovariolas salvajes, **las células de cubierta** de la región I y IIA del germario emiten prolongaciones citoplasmáticas que separan a los distintos cistos en desarrollo [179]. Utilizando la línea reportera *Patched-Gal4/UAS-GFP*, que se expresa en este grupo de células somáticas quiescentes, analizamos germarios con morfología aberrante en ovariolas mutantes *slmb*, observando que las prolongaciones citoplasmáticas de las células de cubierta se formaron normalmente (resultado no mostrado). Por lo tanto, los defectos de encapsulación causados por la pérdida de función de *slmb* no dependen de la función de las células de cubierta, sino que realmente reflejan un defecto en el comportamiento de las células foliculares del germario.

Las tinciones realizadas con el marcador de células foliculares inmaduras anti-FasIII revelaron que frecuentemente, los clones mutantes *slmb* permanecen indiferenciados en estadios avanzados del desarrollo. En algunos casos, las células mutantes *slmb* adquieren el destino de células polares, que a su vez inducen la diferenciación de grupos ectópicos de

células *border*. Asimismo, hemos encontrado que alteraciones en el programa de diferenciación de las células foliculares resultan en la ausencia de células del tallo que separan a los folículos adyacentes y en la disrupción de la interacción cisto-soma, evidenciada por la frecuente deslocalización de los ovocitos. La marcación positiva con GFP de los clones mutantes *slmb* demostró que tanto el retraso en la diferenciación, como la especificación de las células polares ectópicas, son efectos autónomos de célula, demostrando que Slmb es necesario durante los eventos tempranos de diferenciación de las células foliculares en el germario.

Entre los estadios 2 y 6 de la ovogénesis las células foliculares continúan en mitosis, al tiempo que ocurren los primeros eventos de diferenciación en el epitelio folicular: el establecimiento de los dominios terminales anterior y posterior [200]. Cuando analizamos folículos con pequeños clones mutantes *slmb*, que probablemente se formaron luego de que el mismo emergiera del germario, no observamos defectos en el refinamiento de la expresión de FasIII, como así tampoco encontramos alteraciones evidentes en la división mitótica de las células foliculares, sugiriendo que la pérdida de función de *slmb* en estadios post-germario no alteraría las primeras rondas de diferenciación del epitelio folicular. Consistente con esto, los folículos que presentaron células polares ectópicas especificaron normalmente el destino de célula *border* entre sus células foliculares adyacentes, mientras que los huevos provenientes de folículos con clones mutantes *slmb* presentaron siempre un micrópilo en el extremo anterior y un aerópilo en su parte posterior, confirmando que la diferenciación de los dominios terminal-anterior y terminal-posterior ocurrió normalmente. Por lo tanto, estas observaciones refuerzan la idea de que Slmb no sería crítico para los primeros eventos de diferenciación del epitelio folicular, que tienen lugar entre los estadios 2 y 6 de la ovogénesis. Consistente con esto, la línea *enhancer trap slmb*⁰⁰²⁹⁵ no se expresó en las células somáticas durante esos estadios del desarrollo.

A partir del estadio 9, *slmb*⁰⁰²⁹⁵ reveló una alta transcripción en las células columnares que rodean al ovocito, especialmente en los dos grupos de células precursoras de los AD. Por otro lado, la pérdida de función de *slmb* provocó defectos en la morfogénesis del corion, presentando una alta variabilidad en la morfología de los AD y expansión moderada del opérculo. Estos resultados sugirieron que en la ovogénesis media, Slmb es necesario para la especificación de las sub-poblaciones del epitelio columnar que van a determinar la posición y morfología del opérculo y de los AD.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la función de Slmb es crítica en **dos etapas** del desarrollo del linaje folicular: en el germario, Slmb es

necesaria para la especificación y maduración de las primeras sub-poblaciones foliculares (células polares/células del tallo y epitelio folicular), de modo que su pérdida de función conduce a defectos tempranos de encapsulación y diferenciación celular. En la ovogénesis media, Slmb está involucrado en la especificación de las distintas sub-poblaciones de células columnares que darán origen al opérculo y a los AD del corion.

- **Las vías de Hh, Wg y EGFR no están alteradas en los clones mutantes *slmb*.**

Habiendo caracterizado los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb* en el ovario, nos propusimos encontrar cuáles eran las vías o los sustratos que resultaban alterados en los clones mutantes *slmb*, provocando las anomalías descritas. Basándonos en distintos criterios fisiológicos y funcionales, elegimos estudiar a las vías de Hh, Wg, EGFR y Dpp, como posibles candidatas a estar reguladas por Slmb. Teniendo en cuenta que en discos imaginales de pata y ala de *Drosophila*, la pérdida de función de *slmb* induce la activación ectópica de las vías de Hh y Wg [128, 168] y que tanto Hh como Wg están involucrados en distintos procesos durante la ovogénesis de *Drosophila* [254], comenzamos analizando estas dos vías candidatas.

En los análisis de pérdida de función de *slmb* encontramos que algunos de los fenotipos provocados por la generación de clones mutantes en el linaje somático fueron similares a los observados luego de activar ectopicamente la vía Hh. Estos fenotipos incluyeron el retraso en la diferenciación de las células foliculares, defectos en el proceso de encapsulación del cisto, deslocalización del ovocito dentro del folículo y defectos en la morfología de los AD del corion. Sin embargo, otros de los fenotipos derivados de la sobre-expresión de Hh, no coincidieron con los observados tras la pérdida de función de *slmb*. En las ovariolas con clones mutantes *slmb*, no observamos hiper-proliferación de células somáticas en el germario ni formación de largos tallos de células indiferenciadas entre folículos adyacentes, como así tampoco detectamos división celular ectópica en el epitelio folicular, más allá del estadio 6 [181, 250, 254]. Finalmente, la expresión del elemento reportero *patched-LacZ*, que resulta dramáticamente activado en respuesta a la sobre-expresión de Hh en el ovario, no resultó alterada en los clones mutantes *slmb*. Por otro lado, no se detectaron interacciones génicas dominantes entre *slmb* y reguladores negativos de la vía de Hh, como así tampoco aumentó la incidencia de fenotipos anómalos, causados por la expresión constitutiva de Ci, cuando las moscas fueron simultáneamente

heterocigotas mutantes para *slmb*. En conjunto, estos resultados sugieren que a diferencia de lo que ocurre en discos imaginales, Slmb no regularía a la vía de Hh en el ovario.

Estudios previos demostraron que la expresión de Wg en el ovario ocurre específicamente en el filamento terminal y en las células cap del germario [254, 276]. Se reportó que tanto la eliminación de la señal de Wg como su sobre-expresión resultan en la rápida pérdida de las células madre foliculares, mientras que su expresión constitutiva provoca la proliferación excesiva de células foliculares, que tienden a acumularse entre los folículos, siendo incapaces de llevar a cabo el programa normal de diferenciación [276]. En los experimentos de hiperactivación de la vía Wg realizados en este trabajo de tesis, no observamos incidencia significativa de fenotipos anómalos, ni tampoco coincidencia con los fenotipos provocados por la pérdida de función de *slmb*, sugiriendo que la hiperactivación de la vía de Wg sería la causante de los fenotipos observados en los clones mutantes *slmb*. Esto puede resultar llamativo, ya que ha sido claramente demostrado que Slmb y su ortólogo en mamíferos, β -TrCP, reconocen secuencias específicas en Arm/ β -catenina, reclutándolos al complejo SCF para su ubiquitinación [99, 277]. La falta de interacción entre Slmb y Wg en el ovario de *Drosophila* puede explicarse por el hecho de que los dominios témporo-espaciales de expresión de *slmb* y de acción de Wg (células madre somáticas) no coincidan durante la ovogénesis.

Finalmente, basándonos en criterios morfológicos, decidimos estudiar un posible rol de Slmb en la regulación de la vía del EGFR. En un principio, los estudios de interacciones génicas dominantes ensayados entre *slmb* y *grk^{HK}* parecieron revelar un rol regulatorio de Slmb sobre la vía del EGFR. Sin embargo, el análisis de los genes reporteros *kekkon-LacZ* y *pipe-LacZ* demostró que ambos se expresan normalmente en los clones mutantes *slmb*, sugiriendo que la señal del EGFR no se encuentra alterada. Asimismo, cuando investigamos una posible desregulación de la expresión de Grk en el linaje germinal, observamos que su patrón es normal en los clones mutantes *slmb*, sugiriendo que Slmb no es requerido para la expresión o normal localización de esta proteína y la consecuente señalización hacia el epitelio folicular. Un dato a tener en cuenta es que tanto *kekkon* como *pipe*, son elementos de respuesta primaria a la activación de la vía del EGFR iniciada por Grk en el epitelio folicular [227]. Dado que existe una segunda ronda de activación autócrina del EGFR en los dos grupos de células foliculares que van a dar origen a los apéndices dorsales [227, 229], no podemos excluir la posibilidad de que la expresión de algún elemento de respuesta secundaria (ej. *rho*, *spitz*), resulte alterada en los clones mutantes *slmb*.

- **Slmb regula la vía de Dpp en el linaje somático del ovario**

La cuarta vía de señalización candidata a ser regulada por Slmb en el ovario fue la vía de Dpp. En este trabajo, demostramos que la sobre-expresión débil de Dpp en el linaje somático provoca una variedad de fenotipos anómalos en el corion, que son diferentes a los generados por la hiperactivación fuerte de la misma vía. Asimismo, encontramos que la hiperactivación débil de Dpp provoca defectos en el desarrollo del folículo que son muy similares a los que provoca la pérdida de función de *slmb* en el linaje somático. Altos niveles de sobre-expresión de Dpp en el ovario, causan un dramático incremento en la proliferación de las células madre germinales, conduciendo a la formación de germarios “tumerosos” y a la encapsulación de varios cistos en un mismo epitelio folicular. En estadios tardíos, la activación fuerte de la vía de Dpp provoca alteraciones en la especificación del dominio anterior del epitelio columnar, generándose huevos con el opérculo dramáticamente expandido y AD muy reducidos o ausentes.

Si bien algunos de estos fenotipos habían sido descritos previamente [176, 234, 254], en este trabajo de tesis encontramos que la activación ectópica débil de vía de Dpp tiene un efecto distinto sobre las células foliculares del ovario. La sobre-expresión débil de Dpp, así como la expresión ectópica de la proteína co-Smad, Medea y del receptor Tkv, producen defectos leves de encapsulación del cisto, pérdida de tallos interfoliculares, deslocalización del ovocito en el folículo y gran variabilidad en la morfología de los AD del corion. En apoyo a la idea de que Slmb podría estar regulando a la vía de Dpp en el epitelio folicular, observamos que el fenotipo de expansión del opérculo, obtenido por activación fuerte de la vía, fue completamente revertido por la sobre-expresión simultánea de Slmb. Por otro lado, el análisis de la línea *enhancer trap dpp*¹²³⁷⁹ reveló que el patrón de expresión de Dpp no se altera en los folículos con clones mutantes *slmb*, sugiriendo que la interacción entre Slmb y la vía de Dpp ocurriría río abajo del ligando. Consistente con esto, observamos que la expresión de los genes reporteros *BR-C* y *dad-LacZ*, que se transcriben en respuesta a la activación de la vía de Dpp, resulta alterada en los clones mutantes *slmb* y que dicha alteración es autónoma de célula.

Es interesante notar que los elementos reporteros *BR-C* y *dad-LacZ*, pueden ser utilizados para evidenciar niveles diferenciales de activación de la vía de Dpp. Mientras que la transcripción de *dad-LacZ* ocurre sólo en el dominio que recibe altos niveles del

ligando Dpp, especificando la formación del **opérculo**, la expresión de **BR-C** requiere niveles intermedios de actividad de esta vía, dando lugar a los **AD** [233](ver Fig. 41A). Consistente con esto, la sobre-expresión fuerte de Dpp provocó la expansión del opérculo, mientras que la sobre-expresión débil de Dpp produjo morfología variable de los AD (Fig.41B-C). De acuerdo con la idea de que la pérdida de función de *slmb* imita los efectos de hiperactivación débil de la vía de Dpp, los clones mutantes *slmb* presentaron frecuentemente alteraciones en el dominio de expresión de **BR-C** y asimismo, defectos en la morfología de los AD del corion (Fig. 41C). Por otro lado, la expresión ectópica de *dad-LacZ* en el epitelio columnar se detectó sólo cuando los clones mutantes *slmb* se formaron en regiones próximas a la fuente del ligando Dpp, sugiriendo que la pérdida de función de *slmb* aumentaría los niveles basales de activación de la vía, desplazando así los límites de los distintos dominios de “sensibilidad” a Dpp (Fig. 41D). Consistente con esto, sólo unos pocos huevos derivados de los folículos con clones *slmb*, presentaron expansión leve del opérculo.

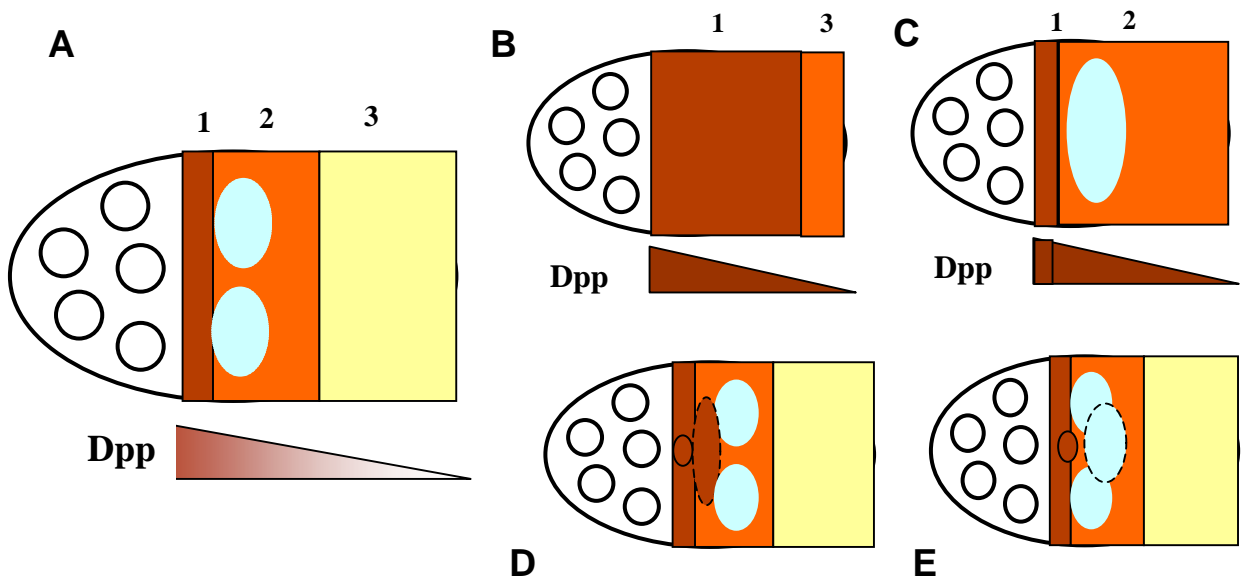


Fig. 41: Función de la vía de Dpp en la ovogénesis media. Los esquemas representan folículos de estadio 10, vistos dorsalmente. El círculo rojo representa el núcleo del ovocito, mientras que los círculos vacíos representan los núcleos de las células nodrizas. En el folículo se marcan los dominios con niveles altos (rosa), intermedios (naranja) o nulos (amarillo) del ligando Dpp. (A) Dominios de activación de la vía de Dpp en un folículo salvaje (B-C) sobre-expresión de la vía de Dpp, (D-E) activación ectópica de la vía de Dpp en folículos con clones mutantes *slmb*. (A) Dpp es secretado por distintas sub-poblaciones foliculares derivadas del dominio anterior del epitelio (células asociadas a nodrizas y células centrípetas), generando un gradiente de ligando A/P sobre el epitelio columnar. Las células centrípetas, situadas en el extremo anterior del ovocito (1) reciben altos niveles del ligando Dpp y como consecuencia, expresan el gen reportero *dad-LacZ* y dan origen al opérculo. Las células columnares adyacentes a las células centrípetas (2) reciben niveles intermedios del ligando Dpp (y altos niveles de Grk) y responden activando la transcripción del gen

BR-C en los dos parches de células que dan origen a los AD (representados como óvalos celestes). El dominio más posterior del epitelio columnar (**3**) no recibe niveles suficientes de ligando como para activar la vía de Dpp. (**B**) La sobre-expresión de altos niveles de Dpp provoca la expansión del dominio anterior del epitelio columnar “1”, de modo que los huevos derivados de estos folículos presentan una dramática expansión del opérculo y la reducción o ausencia de los AD. (**C**) Cuando Dpp se sobre-expresa a niveles más bajos, la activación ectópica de la vía provoca la alteración (generalmente incremento) del dominio de expresión de *BR-C* (óvalo celeste), conduciendo a la formación de AD de morfología variable. (**D**) la formación de un clon mutante *slmb* (representado con línea de puntos) en la región más anterior del epitelio columnar (próxima a la fuente del ligando Dpp) provoca expresión ectópica de *dad-LacZ* y expansión moderada del opérculo (**E**) la generación de clones mutantes *slmb* en regiones más posteriores del epitelio columnar (que reciben niveles más bajos de Dpp) provoca la expresión ectópica de *BR-C*, generando variabilidad en la morfología de los AD. Nótese que la pérdida de función de *slmb* permitiría que las células columnares activen ectopicamente la vía de Dpp a niveles menores del ligando (evidenciado como expansión de los dominios 1 o 2).

Trabajos anteriores habían demostrado que Dpp es requerido durante la ovogénesis temprana para mantener el nicho fisiológico de las células madre germinales (CMG) y para regular su división/diferenciación a cistoblasto [176, 278]. Analizando germarios mutantes *slmb* mediante el uso del marcador de CMG/cistoblasto anti-Sex lethal [279], no observamos un aumento en el número de estas células en las regiones I y IIA del germario, sugiriendo que la pérdida de función de *Slmb* no es suficiente para desregular la vía de Dpp en la línea germinal. Consistente con esto, se reportó que existen múltiples mecanismos que aseguran el silenciamiento de la señal de Dpp en el cistoblasto una vez que la CMG se ha dividido, entre ellos la degradación de Mad mediada por una E3 ligasa de la familia HECT, llamada Smurf [41, 264]. El análisis de interacciones génicas entre *slmb* y *smurf* podría ayudar a contestar si *Slmb* contribuye al control de la vía de Dpp también en el linaje germinal.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la pérdida de función de *slmb* provoca la activación ectópica débil de la vía de Dpp en el epitelio folicular, a través de un mecanismo que es autónomo de célula.

- **La proteína co-Smad, Medea, tiene un patrón de expresión dinámico durante la ovogénesis.**

Se ha mencionado previamente que la proteína co-Smad, Med, es esencial para la transducción de la señal de Dpp [280]. En respuesta a la señal, Mad resulta fosforilada, se une a Med y juntas translocan al núcleo para activar o reprimir la expresión génica [265]. El patrón de expresión de Med había sido descrito en el embrión, donde se encontró que

se expresa de manera ubicua y que su actividad está regulada por cambios en la localización subcelular, acumulándose en el núcleo de las células donde la vía de Dpp está activa [281]. En este trabajo de tesis hemos caracterizado el patrón de expresión de Med en el ovario, observando que a diferencia de lo que ocurre en el embrión, Med se expresa de forma dinámica durante el desarrollo, estando siempre localizada en el núcleo. Med comienza a detectarse en el epitelio folicular a partir del estadio 8-9 de la ovogénesis, en el mismo dominio de células anteriores que expresan el ligando Dpp. A partir del estadio 10, Med se observa en todas las células del epitelio folicular, si bien sus niveles son mucho más altos en las células derivadas del dominio anterior, incluyendo las células centrípetas y las células asociadas a las nodrizas. Estos resultados sugieren que la expresión de Med se encuentra regulada durante la ovogénesis y que probablemente los niveles de Med modularían la transducción de la señal de Dpp.

- **Slmb regula los niveles de Medea en el epitelio folicular**

Habiendo demostrado que Slmb funciona como regulador negativo de la vía de Dpp en el ovario, nos preguntamos qué elementos de esta vía podrían ser sustratos directos de Slmb. En los últimos años, distintos trabajos llevados a cabo en sistemas de células de mamíferos, involucraron a los complejos SCF-E3 ligasa en la regulación de la vía TGF- β /BMP: se encontró que la proteína R-Smad, Smad3, interacciona con Roc1/Rbx1 y puede ser ubiquitinada por un complejo SCF que incluye a la proteína F-box, β -TrCP/Fbw1 [114]. Esta ubiquitinación es dependiente de la activación de la vía de TGF- β , sugiriendo que β -TrCP reconocería a Smad3, una vez que ésta ha sido fosforilada. Por otro lado, dos publicaciones recientes demostraron que las proteínas F-box β -TrCP y Skp2 se unen a la co-Smad, Smad4 (homóloga de Med en mamíferos), promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. [115, 282].

Analizando el patrón de expresión de Med en folículos con clones mutantes *slmb*, observamos que los niveles de Med se incrementaron específicamente en los clones mutantes, sugiriendo un rol regulatorio de Slmb sobre esta proteína. Significativamente, a diferencia de lo observado con el elemento reportero *dad-LacZ*, la estabilización de Med se detectó tanto en los clones mutantes *slmb* que se formaron en regiones cercanas a la fuente de Dpp, como así también en los clones generados en zonas alejadas, sugiriendo que dicha estabilización sería independiente de la activación de la vía de Dpp.

Finalmente, se ha descrito que la mayoría de los sustratos ubiquitinados por el complejo SCF^{β-TrCP/Slmb} presentan la secuencia consenso DSG(X)_nS, donde S son las serinas fosforilables. Cuando ambas serinas han sido fosforiladas, el sustrato es reconocido por la proteína F-box β-TrCP/Slmb, promoviéndose así su ubiquitinación en el complejo SCF^{β-TrCP/Slmb} [99, 277, 283, 284]. El análisis de la secuencia de Med reveló que si bien este motivo no está presente en la proteína, existe un motivo similar, DLSG(X)₄S, que podría ser el que se fosforila, siendo luego reconocido por la proteína F-box, Slmb.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y a las evidencias reportadas en otros sistemas experimentales, proponemos que Slmb actuaría como regulador negativo de la vía de Dpp en el linaje somático del ovario, promoviendo la degradación de la proteína co-Smad, Medea, durante el desarrollo tardío del epitelio folicular. En el modelo propuesto, Slmb provocaría un efecto ligeramente diferente al descrito para las vías de Hh y Wg [128], ya que su sola pérdida de función no sería suficiente para activar ectopicamente la vía de Dpp, sino que sería necesario que existan niveles basales de activación de esta vía para que la falta de Slmb provoque un efecto biológico. De esta manera, las células mutantes *slmb* estarían “sensibilizadas” para transducir la señal de Dpp, activando la expresión de sus genes blanco a niveles menores del ligando de los que se requieren normalmente. Consistente con esto, la pérdida de función de *slmb* provocó fenotipos similares a los de sobre-expresión débil de Dpp, pero no reprodujo los fenotipos más drásticos observados luego de una sobre-expresión fuerte. Estudios genéticos adicionales, así como también el análisis de interacciones físicas entre Slmb y Medea, permitirán determinar si Medea es realmente un sustrato directo de Slmb en el ovario de *Drosophila*.

Conclusiones

En el segundo capítulo de esta Tesis hemos definido la función de la proteína F-box, Slmb, en la ovogénesis de *Drosophila*. *slmb* se expresa en un patrón dinámico durante la ovogénesis y es requerido para el desarrollo del ovocito, tanto en la línea germinal como en el linaje somático. En la línea germinal, Slmb controla los niveles de los reguladores del ciclo celular, Dp y E2F2, de modo que su pérdida de función frecuentemente provoca una ronda extra de división mitótica en el cisto. Asimismo, la endorreplicación del genoma, el proceso de dumping y la muerte de las células nodrizas por apoptosis resultan alterados en los cistos mutantes *slmb* [285]. Por otro lado, hemos demostrado que Slmb cumple distintas funciones en el linaje folicular, desde estadios muy tempranos del desarrollo. En el germario, Slmb es necesario para la correcta especificación de las células polares y las células de tallo, para la maduración del epitelio folicular y para el proceso de encapsulación del cisto [285]. En la ovogénesis media, Slmb participa en la especificación de las distintas sub-poblaciones del epitelio columnar que van a dar origen al opérculo y a los apéndices dorsales del corion que protegerá al huevo. La similitud entre los fenotipos observados tras la pérdida de función de *slmb* y los fenotipos obtenidos por hiperactivación débil de la vía de Dpp nos permitieron inferir que Slmb es probablemente un regulador negativo de la vía de Dpp en el ovario. En apoyo a esa hipótesis, encontramos que la pérdida de función de *slmb* provoca la desregulación autónoma de célula de distintos elementos reporteros de la vía de Dpp, incluidos el gen *BR-C* y el reportero *dad-LacZ*. El análisis del patrón de expresión de la proteína co-Smad, Medea, reveló que sus niveles se incrementan ante la pérdida de función de *slmb*, sugiriendo que esta proteína podría ser el sustrato directo de Slmb en el ovario [285]. Finalmente, el análisis de interacciones génicas entre Slmb y distintos componentes o reguladores de los complejos SCF puso en evidencia que Slmb lleva a cabo su función como subunidad F-box de un complejo SCF, durante la ovogénesis de *Drosophila*.

IV- CONCLUSIÓN FINAL

El trabajo de tesis presentado constó de dos etapas. En la primera etapa, hemos identificado a las proteínas que componen el núcleo invariante de los complejos SCF de *Drosophila melanogaster*, dSkpA, dCul1 y dRbx1. Utilizando el sistema del Doble Híbrido de levaduras y ensayos de interacción *in vitro* hemos caracterizado las interacciones que ocurren entre estas proteínas, como así también entre el núcleo invariante del complejo SCF y la proteína F-box, Slimb. Hemos demostrado además que la enzima E2 conjugadora de ubiquitina, UbcD1, se une específicamente al complejo SCF, sugiriendo que esta enzima participa en la cascada de ubiquitinación mediada por dichos complejos. Mediante experimentos realizados en colaboración hemos podido determinar que la proteína de *Drosophila* dRbx1 es capaz de complementar al mutante de levadura *hrt1*, poniendo en evidencia el alto grado de conservación funcional de esta familia de E3 ubiquitín ligasas. Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis constituyen por lo tanto, la primer evidencia experimental de que los complejos SCF se encuentran altamente conservados, también en *Drosophila*.

En la segunda etapa de la tesis, se definieron múltiples funciones que el complejo SCF^{Slimb} cumple durante la ovogénesis de *Drosophila*. Encontramos que *slmb* se expresa en la línea germinal a lo largo de toda la ovogénesis, presentando un patrón dinámico de expresión en el linaje somático. Estudios de pérdida de función revelaron que Slimb cumple es necesario en la línea germinal desde estadíos tempranos de la ovogénesis para controlar los niveles de factores involucrados en la modulación del ciclo celular. En el linaje somático, Slimb es requerido en el germario durante las primeras rondas de diferenciación de las células foliculares, mientras que en la ovogénesis media Slimb está involucrado en la especificación de las sub-poblaciones foliculares que darán origen al corion proteico. Analizando diferentes vías de transducción de señales hemos encontrado que la sobre-expresión débil de elementos de la vía de Dpp/TGF- β puede fenocopiar los fenotipos causados por la pérdida de función de *slmb* en el epitelio folicular, sugiriendo que Slimb podría ser un regulador negativo de la vía de Dpp en el ovario. Consistente con esta hipótesis, pudimos demostrar que durante la ovogénesis media, la pérdida de función de *slmb* conduce a la acumulación autónoma de célula de la proteína co-Smad, Medea, provocando una hiperactivación sutil de la vía de Dpp. Los resultados presentados en esta tesis sugieren por lo tanto, que el complejo SCF^{Slimb} limita la actividad de la vía Dpp/TGF- β durante la ovogénesis de *Drosophila* mediante de la degradación de la proteína co-Smad, Medea.

V- MATERIALES Y MÉTODOS

1- Materiales y Métodos utilizados en los experimentos del Capítulo I

Búsqueda por homología de secuencias en bases de datos de DNA: Las proteínas de *Drosophila* que presentaron mayor homología con las proteínas humanas Skp1, Rbx1, Cul1 y Cul3 (Acceso GenBank: U33760, AF140598, U58087 y AF062537, respectivamente) fueron identificadas en la base de datos del Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) utilizando el programa BLAST-P. Los genes correspondientes a estas proteínas, designados *dskpA*, *drbx1*, *dcul1* y *dcul3* corresponden a las anotaciones del Flybase CG16983 (transcripto CT40292), CG16982 (transcripto CT32695), CG1877 y CG11861 (transcripto CT35206), respectivamente. Para obtener las secuencias codificantes de dSkpA, dRbx1, dCul1, dCul3 y de las proteínas Slimb (AF032878), UbcD1 (X62575), UbcD6 (M63792) y UbcD10 (AJ238007), realizamos búsquedas en la colección de ESTs (Expressed Sequence Tags) del BDGP, utilizando la secuencia del cDNA predicho para cada proteína. Elegimos un clon representativo entre los que coincidieron con el extremo 5' de cada uno de los cDNA: *dskpA* (Clon ID: LP02056), *drbx1* (Clon ID: GH12110), *dcul1* (Clon ID: LD29973), *dcul3* (Clon ID: GH27416), *slmb* (Clon ID: LD31459), *ubcD1* (Clon ID: LD32571), *ubcD6* (Clon ID: LD22830) y *ubcD10* (Clon ID: LD30207). La identidad de todos los ESTs se confirmó por secuenciación automática de DNA, en el servicio del Secuenciación del Instituto Leloir.

Amplificación de las secuencias codificantes por PCR: Los distintos ESTs obtenidos en el vector pOT2 fueron amplificados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que abarcaron entre 20 y 25 nucleótidos a partir del sitio de inicio de la traducción (ATG) de cada uno de los mRNA (hebra sentido). Los oligos incluyeron una región 5' adicional de 12 nucleótidos en la que se agregó un sitio de corte para enzima de restricción: *dskpA* (BamHI), *dcul1* (BamHI), *drbx1* (BamHI), *dcul3*,(BamHI), *slmb* (XhoI), *ubcD1* (BamHI), *ubcD6* (XhoI) y *ubcD10* (BamHI). El oligonucleótido antisentido utilizado en todos los casos fue uno complementario al vector pOT2, que incluyeron un sitio de corte para XhoI.

Construcción de los plásmidos para ensayos in vitro: El producto de PCR de *drbx1* fue digerido con BamHI para permitir su clonado en fase en el vector pGEX-3X (Pharmacia). Para generar proteínas de fusión a poli-Histidina, los productos de PCR de *dSkpA* (BamHI) y *dUbcD1* (EcoRI-BamHI) fueron digeridos con las correspondientes enzimas de restricción y clonados en fase en el vector pTrcHisC (Invitrogen).

Transcripción y traducción in vitro: Las proteínas marcadas con [³⁵S]-Metionina fueron producidas a partir de los ESTs clonados el vector pOT2, (bajo regulación del promotor T7),

utilizando el sistema de transcripción acoplado a traducción *in vitro* (IVTT) en lisados de reticulocitos de conejo (TNT, Promega) y la T7 RNA polimerasa (Boheringer Mannheim).

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*: Las proteínas recombinantes fueron obtenidas a partir de cultivos de *E. Coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pTrcHisC ó pGEX-3X, codificando las proteínas de fusión a His ó a GST, respectivamente. Los cultivos fueron crecidos a 37°C hasta una Absorbancia_(600nm) de 0.5, momento en el cual se los indujo con IPTG a una concentración final de 50-100 μ M. Los cultivos se dejaron crecer durante 2,5 hs a 28°C. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 4°C y resuspendidas en la solución adecuada para continuar con los protocolos de GST-pull down o de inmunoprecipitación.

Purificación de proteínas de fusión a GST: Los pellets bacterianos obtenidos luego de centrifugar el cultivo fueron lisados en hielo por sonicación, en buffer de resuspensión (PBS, 1% Triton X-100, 0.5mM EDTA) con inhibidores de proteasas (0.1mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 1 μ g/1ml leupeptina, 1 μ g/1ml pepstatina y 1 μ g/1ml aprotinina). Los lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes se mezclaron con bolitas de glutation-agarosa (Sigma) (200 μ l de bolitas por 50 ml del cultivo bacteriano inicial). La mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C para permitir la unión de las proteínas de fusión a GST. Las bolitas de glutation-agarosa fueron centrifugadas a baja velocidad y lavadas 5 veces en buffer de resuspensión. Para los ensayos de interacción, la concentración de proteínas de fusión a GST en la suspensión fue estimada por SDS-PAGE y Coomassie blue.

Ensayos de GST pull-down: Las proteínas de fusión a GST unidas a glutation-agarosa (~20 μ l de bolitas) se mezclaron con 2 μ l de extracto de reticulocitos de conejo, conteniendo la proteína marcada con [³⁵S]-Metionina y se incubaron a 4°C por 3 hs en 100 μ l de buffer EBC (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5%v/v Igepal, 0.5mM EDTA). Las bolitas de glutation-agarosa fueron precipitadas por centrifugación a baja velocidad y lavadas 5 veces con buffer EBC a 4°C. Las muestras se resuspendieron en buffer de siembra (62mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glicerol; 40mM DTT ; 0,01% azul de bromo fenol) y las proteínas asociadas fueron detectadas por SDS-PAGE seguido de autorradiografía.

Purificación de proteínas de fusión a His: Los pellets bacterianos fueron lisados en hielo por sonicación, en buffer de "unión" (20mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5M NaCl, 5mM imidazol) al que se le agregaron inhibidores de proteasas (0.1mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 1 μ g/1ml leupeptina, 1 μ g/1ml pepstatina y 1 μ g/1ml aprotinina). Los lisados fueron centrifugados y los sobrenadantes mezclados con bolitas de sefarosa-ácido imidoacético (Sigma) previamente cargadas con Ni²⁺. Las

bolitas se lavaron con 10 volúmenes de buffer de unión, y luego con 6 volúmenes de buffer de lavado (20mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5M NaCl, 60mM imidazol). Las proteínas de fusión a poliHistidina fueron recuperadas con 6 volúmenes de buffer de elución (20mM Tris-HCl pH 7.9; 0.5M NaCl, 1M imidazol).

Ensayos de Interacción *in vitro* utilizando proteínas de fusión a His: Las proteínas de fusión a His purificadas (100µl), se mezclaron con 4µl de lisado de reticulocitos conteniendo las proteínas marcadas con [³⁵S]-Metionina. Se agregaron 400µl de buffer EBC y se dejó interaccionar durante 3hs a 4°C. Las muestras se incubaron luego con anticuerpo anti-Histidina (1/1000, Santa Cruz Biotechnology) durante 2hs, a 4°C. La inmunoprecipitación se realizó agregando 20µl de proteína A-Sefarosa (Sigma) y centrifugando a baja velocidad. Luego de 5 lavados con buffer EBC, las muestras fueron resuspendidas en buffer de siembra y las proteínas asociadas se detectaron por SDS-PAGE, seguido de autorradiografía.

Sistema del Doble Híbrido de Levaduras (DH): El plásmido pAS2-1 (Clontech) fue utilizado para generar proteínas fusionadas por su extremo N-terminal, al dominio de unión al DNA de GAL4 (DNA-BD). El plásmido pACT2 (Clontech) se utilizó para generar proteínas fusionadas por su extremo N-terminal al dominio de activación de la transcripción de GAL4 (AD), seguido por el péptido Hemaglutinina (HA). Las secuencias codificantes de *dskpA*, *drbx1*, *dcu11*, *dcu13*, *slmb*, *ubcD1*, *ubcD6* y *ubcD10* utilizadas para clonar en estos vectores fueron obtenidas a partir de los ESTs, amplificadas por PCR. La cepa de levaduras PJX, que lleva los elementos reporteros *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* bajo el control de la secuencia UAS, fue transformada secuencialmente con distintas combinaciones de plásmidos recombinantes pACT2 y pAS2-1, con el método mediado por acetato de Litio (LiAc), exactamente como está descrito en el Yeast Protocols Handbook (Clontech). Las levaduras fueron luego plaqueadas en medio SD sin leucina ni triptofano (Clontech) para seleccionar la presencia de ambos plásmidos. La expresión de las proteínas de fusión en levaduras fue confirmada por *western blot*, utilizando el anticuerpo anti-GAL4-DBD (1/1000, IKE) o el anticuerpo anti-HA- (1/1000, Santa Cruz Biotechnology).

Doble Híbrido. Análisis de interacción en placa: Tres colonias de levaduras co-transformantes para cada una de las combinaciones proteicas a testear se estiraron en placas con medio SD carente de leucina, triptofano, adenina e histidina (Clontech) y con el sustrato cromogénico de la β-galactosidasa, X-gal (80µg/ml). La interacción entre proteínas se evidenció por la capacidad de las levaduras de crecer en medio sin adenina ni histidina (reporteros *ADE2* e *HIS3*) desarrollando color azul (reportero *LacZ*). Para cada uno de los ensayos de interacción se incluyó un control negativo, que consistió en co-transformar a las levaduras con uno de los vectores conteniendo a la proteína de

fusión (pAS21 ó pACT2), junto con el vector complementario vacío (pACT2 ó pAS21, respectivamente).

Doble Híbrido. Análisis de interacción en medio líquido: Para obtener mayor sensibilidad en la detección de la β -galactosidasa, realizamos ensayos colorimétricos en medio líquido. Para cada ensayo se crecieron levaduras en 5ml de medio SD sin Leucina ni Triptofano (Clontech) durante toda la noche. Al día siguiente se transfirieron 2ml de dicho cultivo a 8ml de medio rico YPD y se incubaron a 30°C con agitación hasta que las células se encontraron en fase de crecimiento exponencial. (A600nm entre 0.5-0.8). Posteriormente se distribuyó el cultivo en tubos de 1.5ml y se centrifugó a 14000 rpm, durante 30 segundos. El precipitado celular se resuspendió en 300 μ l de buffer Z (Na₂HPO₄·7H₂O, 16.1 g/l; NaH₂PO₄·H₂O 5.5 g/l; KCl 0.75 g/l; MgSO₄·7H₂O; pH7) y se utilizaron 100 μ l para la reacción. Para medir la actividad β -gal las células se rompieron sometiéndolas a ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Posteriormente se adicionaron 0,7ml de buffer Z con β -mercaptoetanol (1/400) y 160 μ l de ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosido 4 mg/ml) a cada tubo de reacción y se incubó a 30°C hasta el desarrollo de color. Para detener la reacción se agregaron 0.4ml de Na₂CO₃ 1M y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante se transfirió a cubetas adecuadas para medir la absorbancia a 420nm y se calcularon las unidades de β -galactosidasa presentes en el extracto (una unidad de β -galactosidasa se define como la cantidad capaz de hidrolizar 1 μ mol de ONPG a o-nitrofenol y D-galactosa /minuto/célula.)

2- Materiales y Métodos utilizados en los experimentos del Capítulo II

Mantenimiento de líneas de moscas y cruzamientos: Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis, se mantuvieron en viales de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de alto, conteniendo medio de crecimiento estándar (a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico). Para los experimentos en los que se necesitó una gran cantidad de individuos, las moscas se amplificaron en botellas plásticas, de aproximadamente 250 cm³, conteniendo el mismo medio de crecimiento. Las hembras de *Drosophila* utilizadas para realizar disecciones de ovarios y análisis del corion fueron mantenidas a 25°C. En los experimentos en los que se utilizó el sistema de sobre-expresión Gal4/UAS algunas combinaciones genéticas debieron crecerse a 18°C para que las moscas alcanzaran el estadio adulto (ej. los niveles basales de expresión de algunos genes resultaron letales a 25°C. A 18°C la actividad de Gal4 disminuye notablemente). Para seleccionar las moscas bajo lupa y llevar a cabo los cruzamientos, las mismas fueron anestesiadas utilizando gas CO₂.

Inducción de construcciones GAL4/UAS: Para inducir la expresión de proteínas por el sistema Gal4/UAS (ver Apéndice [251]), las moscas fueron crecidas en cámaras reguladas a 18°C y transferidas a 25°C en el estadio adulto. Los tratamientos de shock térmico fueron administrados colocando los viales con hembras de dos a cinco días de edad, en un baño de agua a 37°C, durante 10, 30 ó 60 minutos dependiendo del transgén inducido. En todos los casos el tratamiento se aplicó dos veces por día durante tres días consecutivos. Una vez finalizado el tratamiento, las hembras fueron mantenidas 25°C y dejadas envejecer de tres a siete días antes de disecar sus ovarios.

Generación de clones por el sistema FRT/FLP: Los clones mutantes en el ovario fueron generados utilizando el método de recombinación mitótica mediada por Flipasa (FLP) [235] (ver Apéndice). Para analizar la pérdida de función de *slmb* en la línea germinal, generamos clones mutantes por el método FLP/DFS (Flipase/ Dominant Female Sterile), utilizando el transgén OvoD como marcador de recombinación. Para generar clones en el linaje folicular, indujimos la recombinación mitótica con los elementos *e22C-Gal4* y *UAS-Flipasa*. El promotor *e22C* dirige la expresión de Gal4 en las células foliculares del ovario a lo largo de todo el desarrollo. Para marcar positivamente a los clones mutantes con la proteína verde fluorescente (GFP) utilizamos el sistema MARCM [286]. Brevemente, hembras del genotipo *y w; slmb^{0295,1 o 2} P{neoFRT82B}/TM3B, sb* se cruzaron con machos del genotipo *y w, hsFLP; P{neoFRT82B} P{w[+mC]=ovo^{D1}}3R/TM3, sb* para generar clones de línea germinal; con machos *y w; e22C-Gal4, UAS-FLP/CyO; P{neoFRT82B}* para generar clones en el linaje folicular y con machos *y w Hs-FLP UAS-GFP; tubGal4 P{neoFRT82B} tubGal80/TM6B tb*, para generar clones marcados con GFP en el epitelio

folicular (GFP bajo el promotor UAS no se expresa en la línea germinal). Para inducir la formación de clones con el elemento *Hs-FLP*, se administraron shocks térmicos en el estadio pupal, colocando las botellas con moscas a 38°C, durante 1 1/2 horas, una vez por día por tres días consecutivos. Las hembras de la F1 que presentaron el genotipo adecuado fueron seleccionadas para llevar a cabo los análisis.

Generación de doble recombinantes *FRT82B dad¹⁸⁸³slmb²*: Para generar moscas recombinantes que tuvieran la secuencia *FRT82B*, la mutación *slmb²* y el elemento reportero *dad-LacZ*, se partió de parentales del genotipo *y w; P{neoFRT82B} slmb²/TM3 sb y y w; dad¹⁸⁸³ P{LacZ}/TM3 sb* y se siguió el esquema de cruzamientos y selección de individuos que se detalla en el Apéndice. La selección de los individuos con el elemento *P{neoFRT82B}* fue realizada agregando al medio de cultivo de las moscas el antibiótico G418 (GIBCO) a una concentración final 0,5 mg/ml. La concentración óptima se ensayó probando distintas cantidades de antibiótico en el medio de cultivo (1mg/ml, 0,75mg/ml, 0,5mg/ml y 0,25mg/ml) y se determinó como la mínima concentración que permitió el desarrollo de moscas con el elemento *P{neoFRT82B}* (que llevan el gen de resistencia a neomicina) y que al mismo tiempo resultó letal para las moscas salvajes (Canton-S).

Disección de ovarios: Todos los ovarios analizados se obtuvieron de hembras jóvenes (entre 3 y 12 días de eclosionadas), para evitar los fenotipos causados por el envejecimiento. Antes de la disección, las hembras fueron cruzadas con machos (de cualquier genotipo) y mantenidas en viales con levadura fresca a 25°C, para estimular la ovogénesis. Los ovarios fueron disecados bajo lupa en PT (PBS, Tritón X-100 0.1%) y almacenados en eppendorff con PT, en hielo, hasta el momento de la fijación.

Tinciones con X-gal: El protocolo utilizado es una variación del descrito por Margolis y Spradling [185]. Los ovarios disecados en PT fueron fijados durante 10 minutos en 0.5% Glutaraldeído en buffer de fijación de ovarios (16.7mM KH₂PO₄, pH6.8; 75mM KCl; 25mM NaCl; 3.3 mM MgCl₂) y lavados varias veces con PT a temperatura ambiente. Los ovarios se incubaron luego en 500µl de solución de tinción (0.2% X-Gal, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆ en PBS) a 37°C, en oscuridad. El desarrollo de color fue seguido bajo lupa. Cuando se consideró adecuado, la reacción se detuvo lavando varias veces con PT. Las muestras se montaron en glicerol 50% en PT y se analizaron por microscopía de Nomarsky.

Fijación de ovarios para tinciones fluorescentes: Los ovarios disecados en PT se lavaron durante 10 minutos en PTW (PBS, 0,1% Tween 20) y se los fijó por 10 minutos en 1:1 Heptano/Formaldehído 8% en PTW, con agitación fuerte. Se retiró completamente el fijador, se realizaron dos enjuagues con PTW y se permeabilizó con PT 1% (PBS, 1% Tritón X-100), durante

una hora con agitación suave. Todo el protocolo fue llevado a cabo a temperatura ambiente en tubos eppendorff de 1.5 o 2 ml. Los volúmenes utilizados para lavar, fijar y permeabilizar los ovarios fueron de aproximadamente 1-1.5ml.

- **Inmunofluorescencia:** Los ovarios fijados fueron bloqueados durante 1 hora en 5% BSA en PT e incubados en ~100µl de una dilución del anticuerpo primario en PT (*) durante 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Las muestras se lavaron varias veces en PT (5 lavados de 20 minutos, aproximadamente) y se incubaron en 150µl de anticuerpo secundario (1/300, 10% suero normal de cabra en PT), en oscuridad, durante 2 hs a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Los preparados se lavaron exhaustivamente en PT (5-6 veces, durante 20 minutos) y se almacenaron a 4°C en glicerol 80% en PT. El protocolo utilizado para la tinción con anti-Grk 1D12 fue ligeramente diferente: los ovarios se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehido 6%, en solución de fijación de ovarios (16.7mM KH₂PO₄, pH6.8; 75mM KCl; 25mM NaCl; 3.3 mM MgCl₂), se bloquearon por 1 hora con 1% BSA en PT 0.3% (PBS, 0.3% Triton X-100) y se incubaron con el anticuerpo primario, toda la noche a 4°C. El resto del protocolo fue igual al descripto para el resto de los anticuerpos.

(*) Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-β-galactosidasa (1/1200), anti-GFPmAB 3E6 (1/500) y rabbit anti-GFP (1/200), los tres de Molecular Probes; 7G10 anti-FasciclinIII (1/100), 1D12 anti-Gurken (1/500) y M18 anti-Sxl (1/500), obtenidos del Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa University; anti-Medea (1/500, gentilmente cedido por Laurel Raftery del Harvard Medical School, USA), PS1 anti-pMad (1/500, provisto por Peter ten Dijke del Ludwing Institute for Cancer Research, Suecia) y anti-pH3 (1/500, Upstate). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron CyTM3-conjugated Donkey Anti-Mouse (1/300), CyTM2-conjugated Donkey Anti-Rabbit (1/300) y CyTM2-conjugated Donkey Anti-Mouse (1/300), obtenidos de Jackson ImmunoResearch.

- **Tinciones con DAPI:** Para visulizar núcleos/DNA de células germinales y foliculares, los ovarios fijados se incubaron en DAPI (Molecular Probes) 1µg/µl en PT durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La muestras se lavaron luego con PT (5-6 lavados de 10 minutos) y se almacenaron en glicerol 80% en PT. En los casos en que se realizó también inmunotinción, el DAPI fue agregado una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, también durante cinco minutos.
- **Tinciones con Falloidina-TRITC:** Para marcar las estructuras ricas en actina (ej. canales ring) los ovarios fijados fueron incubados con Phalloidina-TRITC (SIGMA) 1µM en PT durante 1

hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Las muestras se lavaron luego con PT (5-6 lavados de 20 minutos) y se almacenaron en glicerol 80% en PT.

Síntesis de sondas para hibridización in situ de RNA: Las sondas de RNA fueron marcadas con UTP-Digoxigenina, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Boehringer Mannheim). El cDNA utilizado para marcar el transcripto *Z1* del gen *Broad-Complex* a partir del promotor T7 del vector pBluescript, fue gentilmente cedido por Mary Bownes [232]. Las sondas sentido y antisentido de *smb* se marcaron a partir de su EST utilizando las RNA polimeras T3 y T7, respectivamente (Boehringer Mannheim).

Hibridización in situ de ovarios: Los ovarios disecados fueron fijados durante una hora en 1ml de paraformaldehído 4% en PBS, 0.1% DMSO, lavados con PBS e incubados 40 minutos en presencia de Proteínasa K (Proteínasa K 10µg/ml en PT). La reacción se detuvo lavando dos veces por 10 minutos con 0.2% glicina en PBS y cuatro veces con PBS durante cinco minutos. El paso de pre-hibridización se comenzó lavando los ovarios en 1:1 PTW:Solución de Hibridización "H" (50%Formamida, 5X SSC, DNA de esperma de salmón 0,1 mg/ml, tRNA 0,1 mg/ml, heparina 50 µg/ml, Tween-20 0,1%), seguido por dos lavados de 10 minutos en 100% de solución H. Los ovarios se incubaron luego en 100% de solución H durante dos horas a 50°C. La hibridización se realizó incubando los ovarios toda la noche a 55°C, en 100 µl de solución H con 2 µl de ribosonda (previamente desnaturalizada por 10 minutos a 95°C). Al día siguiente, la muestra se lavó dos veces durante 20 minutos en solución H (a 50°C), una vez en 1:1 solución H:PTW durante 20 minutos (a 50°C) y varias veces en PTW, a temperatura ambiente. A continuación, los ovarios fueron incubados con el anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (1/5000 en PT, Boehringer Mannheim) durante toda la noche a 4°C. Las muestras se lavaron exhaustivamente con PTW y se enjuagaron luego tres veces en solución alcalina (10mNaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9.5; 0,1%Tween-20). Finalmente, la reacción de color se llevó a cabo en oscuridad, agregando 4,5µl de solución NBT y 3,5µl de solución BCIP (Boehringer Mannheim) en 1 ml de solución alcalina. El desarrollo de color se siguió bajo lupa, deteniéndose la reacción por lavados reiterados con PTW. Los ovarios se montaron en glicerol 70% en PBS.

Preparación de corion: Los huevos depositados en las placas de ovipuesta por las hembras del genotipo elegido fueron recogidos manualmente con una aguja para preservar el corion y almacenados en tubos eppendorff con PT. Luego de varios lavados con PT, los huevos se transfirieron a un portaobjetos, se les retiró completamente el líquido y se cubrieron con ácido láctico/Solución de Hoyer 1:1. Los preparados se dejaron secar durante toda la noche en una estufa a 70°C.

Microscopía: La morfología del corion se analizó en una lupa Olympus SZX12, acoplada a una cámara fotográfica Olympus PM/358. Alternativamente se utilizó el microscopio Olympus BX-60, utilizando óptica de campo oscuro. Según el tipo de tinción, los preparados de ovario fueron visualizados en el microscopio Olympus BX-60, utilizando lámpara y filtros para fluorescencia, óptica de Nomarsky y/o campo claro. Las fotografías fueron tomadas con la cámara digital CoolSnap Pro. Alternativamente, el análisis de preparados de ovario se llevó en un microscopio confocal CarlZeiss LSM5-Pascal.

Extractos de ovarios de *Drosophila*: Los extractos proteicos se realizaron a partir de ovarios disecados, lavados en PBS frío y homogeneizados en buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA P2714) y ortovanadato de sodio 2mM. El homogenato fue centrifugado durante 15 minutos a 13000 rpm en frío y la fase soluble se transfirió a un nuevo tubo eppendorff. La concentración de proteínas en el extracto fue determinado utilizando el “Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit” (SIGMA).

Experimentos de western blot de extractos de ovario: Para realizar análisis por *western blot* se resolvieron alrededor de 37 a 50µg de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10-12%. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de PVDF (BIO-RAD), las cuales se lavaron con buffer TBST (TBS, 0,1% Tween-20) y se bloquearon durante 2 hs con de 10% leche descremada en TBST. Las membranas fueron luego incubadas en presencia del anticuerpo primario diluído en 5% leche descremada en TBST, durante 2hs a temperatura ambiente ó toda la noche a 4°C. Finalmente, las membranas se lavaron exhaustivamente con TBST y se incubaron con una dilución 1/3000 del anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rabanita (HRP), durante una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar varias veces, las membranas se incubaron por un minuto con el sustrato de la enzima HRP, LumiGlo (New England Biolabs) y se reveló por autorradiografía.

(*) los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CiclinaE (1/10, cedido por Helena Richardson), anti-E2F2 (1/2) y anti-Dp (1/3, cedidos Nick Dyson), anti-E2F1 (1/1000, cedido por Terry Orr-Weaver) y anti-Hsp70 (1/5000, SIGMA).

➤ Líneas de *Drosophila* utilizadas

Líneas mutantes *smb* recombinadas con el elemento *FRT82B*:

*smb*⁰⁰²⁹⁵ *FRT82B/TM3 sb* (alelo nulo, provisto por Tian Xu)
*smb*¹ *FRT82B/TM3 sb* (alelo hipomórfico, provisto por Jing Jiang)
*smb*² *FRT82B/TM3 sb* (alelo nulo, provisto por Jing Jiang)

Marcadores moleculares incorporados o recombinados con el elemento *smb*² *FRT82B*:

pipe-LacZ (provista por David Stein, Universidad de Texas, Austin, USA)
AN296 (*enhancer trap* del gen *kekkon*, obtenida del laboratorio de Benny Shilo)
*slbo*⁰¹³¹⁰ (marcador de células *border*, obtenido de Bloomington #12227)
PZ80 (marcador de células polares, provisto por Allan Spradling, Carnegie Institute, Baltimore)
patched-LacZ (reportero de la vía Hh, provisto por Juan Modollel)
*dad*¹⁸⁸³ (*enhancer trap* del gen *dad*, reportero de la vía de Dpp, provisto por Allan Spradling)
dpp-LacZ (*enhancer trap* de *dpp*, obtenida de Bloomington #12379)

Líneas Gal4 utilizadas en estudios de hiperexpresión:

2xsev hs-Gal4(w+) (Hs fuerte, permite una alta sobre-expresión)
y w; hs-Gal4(w+)/CyO (Hs débil)
T155-Gal4 (expresión en células foliculares columnares a partir del estadio 9-10)
CY2-Gal4 (expresión en células foliculares columnares, a partir del estadio 9-10)
e22C-Gal4 (expresión en todas las células foliculares desde el germario, Bloomington #1973)

Líneas UAS utilizadas en los estudios de sobre-expresión:

Las líneas *UAS-wingless* (BL #5919 y #5919) y *UAS-armadillo* (BL #4782 y #4783) fueron obtenidas del Bloomington Stock Center

Las líneas *UAS-Tkv* (activado), *UAS-dpp* (expresión débil, cromosoma 2) y *UAS-dpp* fuerte (expresión fuerte, cromosoma 3) fueron obtenidas del laboratorio de Benny Shilo (Instituto Weizmann, Israel).

La línea *UAS-medea* fue gentilmente cedida por S.J.Newfeld (Arizona State University).

Las líneas *UAS-ci[PKA]* (una versión estable de Ci que tiene mutado el dominio de fosforilación por PKA), *tubulina-Ci* y *UAS-hh* fueron gentilmente provistas por Konrad Basler (Universidad de Zurich, Suiza).

Líneas utilizadas para generar clones mutantes homocigotas

e22C-Gal4, *UAS-flipasa* (expresión de flipasa en el linaje folicular, Bloomington #5077)
hs-flp(122); Dr/TM3 Sb (flipasa inducible por shock térmico, Bloomington #7)
FRT82BOvo^{D1}/TM3 sb/ (Bloomington #2149)
y w Hs-FLP UAS-GFP; tubGal4 P{neoFRT82B} tubGal80/TM6B tb (MARCM [287] marcación positiva por el sistema Gal4/Gal80. Al encontrarse bajo promotor UAS, la proteína reportera GFP se expresa en linaje germinal).

Alelos mutantes utilizados en los experimentos de interacciones génicas: las siguientes líneas de moscas mutantes se obtuvieron de Bloomington: *sog*^{U2} (BL #5394), *put135* (BL #3100), *put10460* (BL #11745), *fsk10* (BL #4615), *mad* (BL #10479), *med5* (BL #6187), *dpp*¹⁰⁶³⁸ (BL #12379), *dad[j1E4]* (BL #10305), *sax4* (BL #5404), *CSN4*^{k08018} (BL #10765), *CSN5*^{L4032} (BL #10301), *Cul1*^{BG02329} (BL #12764), *Cul1*^{k01207} (BL #10494), *ptcS2* (BL #6332), *pka-C1* (BL #4101). La mutante *grk*^{HK} fue cedida por David Stein (Universidad de Texas, Austin, USA).

VI- BIBLIOGRAFÍA

1. Cenciarelli, C., et al., *Identification of a family of human F-box proteins*. *Curr Biol*, 1999. **9**(20): p. 1177-9.
2. Hershko, A., A. Ciechanover, and I.A. Rose, *Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(7): p. 3107-10.
3. Hershko, A., et al., *Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(4): p. 1783-6.
4. Ciechanover, A., et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
5. Vogel, G., *Nobel Prizes. Gold medal from cellular trash*. *Science*, 2004. **306**(5695): p. 400-1.
6. Simpson, M.V., *The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices*. *J Biol Chem*, 1953. **201**(1): p. 143-54.
7. Hershko, A., A. Ciechanover, and A. Varshavsky, *Basic Medical Research Award. The ubiquitin system*. *Nat Med*, 2000. **6**(10): p. 1073-81.
8. Hershko, A., *Lessons from the discovery of the ubiquitin system*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(11): p. 445-9.
9. Wilkinson, K.D., M.K. Urban, and A.L. Haas, *Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(16): p. 7529-32.
10. Goldstein, G., et al., *Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(1): p. 11-5.
11. Ciechanover, A., et al., *Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(2): p. 761-5.
12. Hershko, A., et al., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
13. Hough, R., G. Pratt, and M. Rechsteiner, *Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(5): p. 2400-8.
14. Tanaka, K. and A. Ichihara, *Proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) in eukaryotic cells*. *Cell Struct Funct*, 1990. **15**(3): p. 127-32.
15. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 425-79.
16. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 373-428.
17. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 503-33.
18. Pickart, C.M. and R.E. Cohen, *Proteasomes and their kin: proteases in the machine age*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(3): p. 177-87.
19. Schlesinger, D.H., G. Goldstein, and H.D. Niall, *The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells*. *Biochemistry*, 1975. **14**(10): p. 2214-8.
20. Roth, J., et al., *Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein*. *Embo J*, 1998. **17**(2): p. 554-64.
21. Shih, S.C., K.E. Sloper-Mould, and L. Hicke, *Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors*. *Embo J*, 2000. **19**(2): p. 187-98.
22. Strous, G.J. and R. Govers, *The ubiquitin-proteasome system and endocytosis*. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 10): p. 1417-23.
23. Spence, J., et al., *Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain*. *Cell*, 2000. **102**(1): p. 67-76.
24. Spence, J., et al., *A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(3): p. 1265-73.
25. Haglund, K., et al., *Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(5): p. 461-6.
26. Piotrowski, J., et al., *Inhibition of the 26 S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23712-21.
27. Pickart, C.M., *Ubiquitin in chains*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(11): p. 544-8.
28. Haas, A.L. and I.A. Rose, *The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(17): p. 10329-37.
29. Cenci, G., et al., *UbcD1, a Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme required for proper telomere behavior*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 863-75.

30. Verma, R., R.M. Feldman, and R.J. Deshaies, *SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(8): p. 1427-37.
31. Koegl, M., et al., *A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly*. Cell, 1999. **96**(5): p. 635-44.
32. Aravind, L. and E.V. Koonin, *The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination*. Curr Biol, 2000. **10**(4): p. R132-4.
33. Hatakeyama, S., et al., *U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 33111-20.
34. Hatakeyama, S. and K.I. Nakayama, *U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(4): p. 635-45.
35. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
36. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
37. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2563-7.
38. Qiu, L., et al., *Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35734-7.
39. Kumar, S., A.L. Talis, and P.M. Howley, *Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18785-92.
40. Huibregtse, J.M., J.C. Yang, and S.L. Beaudenon, *The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3656-61.
41. Podos, S.D., et al., *The DSmurf ubiquitin-protein ligase restricts BMP signaling spatially and temporally during Drosophila embryogenesis*. Dev Cell, 2001. **1**(4): p. 567-78.
42. Sakata, T., et al., *Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2228-36.
43. Mansfield, E., et al., *Genetic and molecular analysis of hyperplastic discs, a gene whose product is required for regulation of cell proliferation in Drosophila melanogaster imaginal discs and germ cells*. Dev Biol, 1994. **165**(2): p. 507-26.
44. Lee, J.D., et al., *The ubiquitin ligase Hyperplastic discs negatively regulates hedgehog and decapentaplegic expression by independent mechanisms*. Development, 2002. **129**(24): p. 5697-706.
45. Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale, *A novel cysteine-rich sequence motif*. Cell, 1991. **64**(3): p. 483-4.
46. Haupt, Y., et al., *Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice*. Cell, 1991. **65**(5): p. 753-63.
47. van Lohuizen, M., et al., *Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging*. Cell, 1991. **65**(5): p. 737-52.
48. Freemont, P.S., *The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **684**: p. 174-92.
49. Borden, K.L., *RING domains: master builders of molecular scaffolds?* J Mol Biol, 2000. **295**(5): p. 1103-12.
50. Saurin, A.J., et al., *Does this have a familiar RING?* Trends Biochem Sci, 1996. **21**(6): p. 208-14.
51. Xie, Y. and A. Varshavsky, *The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain*. Embo J, 1999. **18**(23): p. 6832-44.
52. Deshaies, R.J., *SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 435-67.
53. Tyers, M. and P. Jorgensen, *Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(1): p. 54-64.
54. Levkowitz, G., et al., *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1029-40.
55. Zheng, N., et al., *Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases*. Cell, 2000. **102**(4): p. 533-9.
56. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
57. Geyer, R.K., Z.K. Yu, and C.G. Maki, *The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 569-73.
58. Boyd, S.D., K.Y. Tsai, and T. Jacks, *An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 563-8.

59. Reiss, Y., D. Kaim, and A. Hershko, *Specificity of binding of NH₂-terminal residue of proteins to ubiquitin-protein ligase. Use of amino acid derivatives to characterize specific binding sites.* J Biol Chem, 1988. **263**(6): p. 2693-8.
60. Iwai, K., et al., *Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12436-41.
61. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.* Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-5.
62. Page, A.M. and P. Hieter, *The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 583-609.
63. Lisztwan, J., et al., *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity.* Genes Dev, 1999. **13**(14): p. 1822-33.
64. Pause, A., et al., *Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9533-8.
65. Willems, A.R., M. Schwab, and M. Tyers, *A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 133-70.
66. Kishino, T., M. Lalonde, and J. Wagstaff, *UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome.* Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 70-3.
67. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.* Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
68. Schwob, E., et al., *The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in S. cerevisiae.* Cell, 1994. **79**(2): p. 233-44.
69. Goebel, M.G., et al., *The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme.* Science, 1988. **241**(4871): p. 1331-5.
70. Bai, C., et al., *SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box.* Cell, 1996. **86**(2): p. 263-74.
71. Feldman, R.M., et al., *A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p.* Cell, 1997. **91**(2): p. 221-30.
72. Skowyra, D., et al., *F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex.* Cell, 1997. **91**(2): p. 209-19.
73. Kamura, T., et al., *The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2.* Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2928-33.
74. Tan, P., et al., *Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha.* Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 527-33.
75. Ohta, T., et al., *ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity.* Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 535-41.
76. Seol, J.H., et al., *Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34.* Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1614-26.
77. Kamura, T., et al., *Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase.* Science, 1999. **284**(5414): p. 657-61.
78. Skowyra, D., et al., *Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1.* Science, 1999. **284**(5414): p. 662-5.
79. Lyapina, S.A., et al., *Human CUL1 forms an evolutionarily conserved ubiquitin ligase complex (SCF) with SKP1 and an F-box protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7451-6.
80. Zhang, H., et al., *p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase.* Cell, 1995. **82**(6): p. 915-25.
81. Michel, J.J. and Y. Xiong, *Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A.* Cell Growth Differ, 1998. **9**(6): p. 435-49.
82. Ng, R.W., et al., *Characterization of the cullin and F-box protein partner Skp1.* FEBS Lett, 1998. **438**(3): p. 183-9.
83. Yam, C.H., et al., *Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 635-45.
84. Stebbins, C.E., W.G. Kaelin, Jr., and N.P. Pavletich, *Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function.* Science, 1999. **284**(5413): p. 455-61.
85. Kipreos, E.T., et al., *cul-1 is required for cell cycle exit in C. elegans and identifies a novel gene family.* Cell, 1996. **85**(6): p. 829-39.
86. Patton, E.E., et al., *Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast.* Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 692-

87. Yu, H., et al., *Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1219-22.
88. Zachariae, W., et al., *Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1216-9.
89. Lammer, D., et al., *Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex*. Genes Dev, 1998. **12**(7): p. 914-26.
90. Liakopoulos, D., et al., *A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system*. Embo J, 1998. **17**(8): p. 2208-14.
91. Hori, T., et al., *Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8*. Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6829-34.
92. Morimoto, M., et al., *Nedd8-modification of Cul1 is promoted by Roc1 as a Nedd8-E3 ligase and regulates its stability*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(2): p. 392-8.
93. Morimoto, M., et al., *Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1)*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(3): p. 1093-6.
94. Read, M.A., et al., *Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta(TrCP))-dependent ubiquitination of IkappaBalpha*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2326-33.
95. Kawakami, T., et al., *NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase*. Embo J, 2001. **20**(15): p. 4003-12.
96. Wu, K., A. Chen, and Z.Q. Pan, *Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32317-24.
97. Kumar, A. and J.V. Palletta, *The sulfur controller-2 negative regulatory gene of Neurospora crassa encodes a protein with beta-transducin repeats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3343-7.
98. Kipreos, E.T. and M. Pagano, *The F-box protein family*. Genome Biol, 2000. **1**(5): p. REVIEWS3002.
99. Winston, J.T., et al., *The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 270-83.
100. Kitagawa, M., et al., *An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin*. Embo J, 1999. **18**(9): p. 2401-10.
101. Koepp, D.M., et al., *Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase*. Science, 2001. **294**(5540): p. 173-7.
102. Margottin-Goguët, F., et al., *Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase*. Dev Cell, 2003. **4**(6): p. 813-26.
103. Shirane, M., et al., *Common pathway for the ubiquitination of IkappaBalpha, IkappaBbeta, and IkappaBepsilon mediated by the F-box protein FWD1*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28169-74.
104. Winston, J.T., et al., *A family of mammalian F-box proteins*. Curr Biol, 1999. **9**(20): p. 1180-2.
105. Patton, E.E., A.R. Willems, and M. Tyers, *Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis*. Trends Genet, 1998. **14**(6): p. 236-43.
106. Jaquenoud, M., et al., *The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCFGrr1 complex*. Embo J, 1998. **17**(18): p. 5360-73.
107. Kaiser, P., et al., *Cdc34 and the F-box protein Met30 are required for degradation of the Cdk-inhibitory kinase Swe1*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2587-97.
108. Margottin, F., et al., *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 565-74.
109. Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1510-20.
110. Besnard-Guerin, C., et al., *HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 788-95.
111. Yaron, A., et al., *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 590-4.
112. Spencer, E., J. Jiang, and Z.J. Chen, *Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 284-94.

113. Lassot, I., et al., *ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2192-202.
114. Fukuchi, M., et al., *Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(5): p. 1431-43.
115. Wan, M., et al., *Smad4 protein stability is regulated by ubiquitin ligase SCF beta-TrCP1*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14484-7.
116. Trimarchi, J.M. and J.A. Lees, *Sibling rivalry in the E2F family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(1): p. 11-20.
117. Marti, A., et al., *Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(1): p. 14-9.
118. Campanero, M.R. and E.K. Flemington, *Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2221-6.
119. Durand, B., et al., *p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation*. Curr Biol, 1998. **8**(8): p. 431-40.
120. Malek, N.P., et al., *A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase*. Nature, 2001. **413**(6853): p. 323-7.
121. Mendez, J., et al., *Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 481-91.
122. Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 764-76.
123. von der Lehr, N., et al., *The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1189-200.
124. Strohmaier, H., et al., *Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line*. Nature, 2001. **413**(6853): p. 316-22.
125. Kim, S.Y., et al., *Skp2 regulates Myc protein stability and activity*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1177-88.
126. Welcker, M., et al., *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9085-90.
127. Yada, M., et al., *Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7*. Embo J, 2004. **23**(10): p. 2116-25.
128. Jiang, J. and G. Struhl, *Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb*. Nature, 1998. **391**(6666): p. 493-6.
129. Theodosiou, N.A., et al., *slimb coordinates wg and dpp expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development*. Development, 1998. **125**(17): p. 3411-6.
130. Lisztwan, J., et al., *Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 368-83.
131. Nayak, S., et al., *The Caenorhabditis elegans Skp1-related gene family: diverse functions in cell proliferation, morphogenesis, and meiosis*. Curr Biol, 2002. **12**(4): p. 277-87.
132. Yamanaka, A., et al., *Multiple Skp1-related proteins in Caenorhabditis elegans: diverse patterns of interaction with Cullins and F-box proteins*. Curr Biol, 2002. **12**(4): p. 267-75.
133. Connelly, C. and P. Hieter, *Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression*. Cell, 1996. **86**(2): p. 275-85.
134. Singer, J.D., et al., *Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2375-87.
135. Sasagawa, Y., et al., *Caenorhabditis elegans RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis*. Genes Cells, 2003. **8**(11): p. 857-72.
136. Neer, E.J., et al., *The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins*. Nature, 1994. **371**(6495): p. 297-300.
137. Gonen, H., et al., *Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of IkappaBalpha*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14823-30.
138. Treier, M., W. Seufert, and S. Jentsch, *Drosophila UbcD1 encodes a highly conserved ubiquitin-conjugating enzyme involved in selective protein degradation*. Embo J, 1992. **11**(1): p. 367-72.
139. Jensen, J.P., et al., *Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30408-14.

140. Koken, M., et al., *Dhr6, a Drosophila homolog of the yeast DNA-repair gene RAD6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3832-6.
141. Aguilera, M., et al., *Ariadne-1: a vital Drosophila gene is required in development and defines a new conserved family of ring-finger proteins*. Genetics, 2000. **155**(3): p. 1231-44.
142. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
143. Galan, J.M. and M. Peter, *Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9124-9.
144. Fuchs, S.Y., et al., *HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2039-46.
145. Bocca, S.N., et al., *Occurrence of a putative SCF ubiquitin ligase complex in Drosophila*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(2): p. 357-64.
146. Filippov, V., et al., *Temporal and spatial expression of the cell-cycle regulator cul-1 in Drosophila and its stimulation by radiation-induced apoptosis*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 18): p. 2747-56.
147. Khush, R.S., et al., *A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade*. Curr Biol, 2002. **12**(20): p. 1728-37.
148. Moberg, K.H., et al., *Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines*. Nature, 2001. **413**(6853): p. 311-6.
149. Doronkin, S., I. Djagaeva, and S.K. Beckendorf, *The COP9 signalosome promotes degradation of Cyclin E during early Drosophila oogenesis*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 699-710.
150. Wach, A., et al., *Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(11): p. 1065-75.
151. Blondel, M., J.M. Galan, and M. Peter, *Isolation and characterization of HRT1 using a genetic screen for mutants unable to degrade Gic2p in saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2000. **155**(3): p. 1033-44.
152. Nouredine, M.A., et al., *Drosophila Roc1a encodes a RING-H2 protein with a unique function in processing the Hh signal transducer Ci by the SCF E3 ubiquitin ligase*. Dev Cell, 2002. **2**(6): p. 757-70.
153. Kaplun, L., et al., *Functions of the DNA damage response pathway target Ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26S proteasome system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10077-82.
154. Ryoo, H.D., et al., *Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(6): p. 432-8.
155. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 9-20.
156. Byrd, C., G.C. Turner, and A. Varshavsky, *The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor*. Embo J, 1998. **17**(1): p. 269-77.
157. Kumar, S., W.H. Kao, and P.M. Howley, *Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13548-54.
158. Nuber, U., et al., *Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2795-800.
159. Moynihan, T.P., et al., *The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-API*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30963-8.
160. Yokouchi, M., et al., *Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31707-12.
161. Kus, B.M., et al., *Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro*. Proteins, 2004. **54**(3): p. 455-67.
162. Zheng, N., et al., *Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 703-9.
163. Jackson, P.K. and A.G. Eldridge, *The SCF ubiquitin ligase: an extended look*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 923-5.
164. Schulman, B.A., et al., *Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 381-6.

165. Mathias, N., C.N. Steussy, and M.G. Goebel, *An essential domain within Cdc34p is required for binding to a complex containing Cdc4p and Cdc53p in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4040-5.
166. Ohlmeyer, J.T. and D. Kalderon, *Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator*. Nature, 1998. **396**(6713): p. 749-53.
167. Jiang, J. and G. Struhl, *Protein kinase A and hedgehog signaling in Drosophila limb development*. Cell, 1995. **80**(4): p. 563-72.
168. Theodosiou, N.A., et al., *slimb coordinates wg and dpp expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development*. Development, 1998. **125**(17): p. 3411-6.
169. Wojcik, E.J., D.M. Glover, and T.S. Hays, *The SCF ubiquitin ligase protein slimb regulates centrosome duplication in Drosophila*. Curr Biol, 2000. **10**(18): p. 1131-4.
170. Khush, R.S., et al., *A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade*. Curr Biol, 2002. **12**(20): p. 1728-37.
171. Grima, B., et al., *The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 178-82.
172. Ko, H.W., J. Jiang, and I. Edery, *Role for Slimb in the degradation of Drosophila Period protein phosphorylated by Doubletime*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 673-8.
173. Heriche, J.K., et al., *Involvement of an SCFSlimb complex in timely elimination of E2F upon initiation of DNA replication in Drosophila*. BMC Genet, 2003. **4**(1): p. 9.
174. Lopez-Schier, H., *The polarisation of the anteroposterior axis in Drosophila*. Bioessays, 2003. **25**(8): p. 781-91.
175. Dobens, L.L. and L.A. Raftery, *Integration of epithelial patterning and morphogenesis in Drosophila ovarian follicle cells*. Dev Dyn, 2000. **218**(1): p. 80-93.
176. Xie, T. and A.C. Spradling, *decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary*. Cell, 1998. **94**(2): p. 251-60.
177. Xie, T. and A.C. Spradling, *A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary*. Science, 2000. **290**(5490): p. 328-30.
178. de Cuevas, M., M.A. Lilly, and A.C. Spradling, *Germline cyst formation in Drosophila*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 405-28.
179. Schulz, C., et al., *Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog stet organizes encapsulation by somatic support cells*. Development, 2002. **129**(19): p. 4523-34.
180. Zhang, Y. and D. Kalderon, *Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the Drosophila ovary*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 599-604.
181. Forbes, A.J., et al., *hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in Drosophila*. Development, 1996. **122**(4): p. 1125-35.
182. Lopez-Schier, H. and D. St Johnston, *Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during Drosophila oogenesis*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1393-405.
183. Grammont, M. and K.D. Irvine, *fringe and Notch specify polar cell fate during Drosophila oogenesis*. Development, 2001. **128**(12): p. 2243-53.
184. Bai, J. and D. Montell, *Eyes Absent, a key repressor of polar cell fate during Drosophila oogenesis*. Development, 2002. **129**(23): p. 5377-88.
185. Margolis, J. and A. Spradling, *Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary*. Development, 1995. **121**(11): p. 3797-807.
186. Tworoger, M., et al., *Mosaic analysis in the drosophila ovary reveals a common hedgehog-inducible precursor stage for stalk and polar cells*. Genetics, 1999. **151**(2): p. 739-48.
187. Bender, L.B., P.J. Kooh, and M.A. Muskavitch, *Complex function and expression of Delta during Drosophila oogenesis*. Genetics, 1993. **133**(4): p. 967-78.
188. Smith, J.E., 3rd, C.A. Cummings, and C. Cronmiller, *Daughterless coordinates somatic cell proliferation, differentiation and germline cyst survival during follicle formation in Drosophila*. Development, 2002. **129**(13): p. 3255-67.
189. Cummings, C.A. and C. Cronmiller, *The daughterless gene functions together with Notch and Delta in the control of ovarian follicle development in Drosophila*. Development, 1994. **120**(2): p. 381-94.
190. Baksa, K., et al., *The Drosophila STAT protein, stat92E, regulates follicle cell differentiation during oogenesis*. Dev Biol, 2002. **243**(1): p. 166-75.
191. Dej, K.J. and A.C. Spradling, *The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during Drosophila oogenesis*. Development, 1999. **126**(2): p. 293-303.

192. Mahajan-Miklos, S. and L. Cooley, *Intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis*. Dev Biol, 1994. **165**(2): p. 336-51.
193. Cohen, R.S., *Oocyte patterning: dynein and kinesin, inc.* Curr Biol, 2002. **12**(23): p. R797-9.
194. Dej, K.J. and A.C. Spradling, *The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during Drosophila oogenesis*. Development, 1999. **126**(2): p. 293-303.
195. DiMario, P.J. and A.P. Mahowald, *The effects of pH and weak bases on the in vitro endocytosis of vitellogenin by oocytes of Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res, 1986. **246**(1): p. 103-8.
196. Brennan, M.D., et al., *The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in Drosophila melanogaster*. Dev Biol, 1982. **89**(1): p. 225-36.
197. Mahajan-Miklos, S. and L. Cooley, *Intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis*. Dev Biol, 1994. **165**(2): p. 336-51.
198. Royzman, I., et al., *The E2F cell cycle regulator is required for Drosophila nurse cell DNA replication and apoptosis*. Mech Dev, 2002. **119**(2): p. 225-37.
199. Myster, D.L., P.C. Bonnette, and R.J. Duronio, *A role for the DP subunit of the E2F transcription factor in axis determination during Drosophila oogenesis*. Development, 2000. **127**(15): p. 3249-61.
200. Dobens, L.L. and L.A. Raftery, *Integration of epithelial patterning and morphogenesis in Drosophila ovarian follicle cells*. Dev Dyn, 2000. **218**(1): p. 80-93.
201. Grammont, M. and K.D. Irvine, *Organizer activity of the polar cells during Drosophila oogenesis*. Development, 2002. **129**(22): p. 5131-40.
202. Hombria, J.C. and S. Brown, *The fertile field of Drosophila Jak/STAT signalling*. Curr Biol, 2002. **12**(16): p. R569-75.
203. Xi, R., J.R. McGregor, and D.A. Harrison, *A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium*. Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 167-77.
204. Price, J.V., R.J. Clifford, and T. Schupbach, *The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the Drosophila EGF receptor homolog*. Cell, 1989. **56**(6): p. 1085-92.
205. Clifford, R. and T. Schupbach, *The torpedo (DER) receptor tyrosine kinase is required at multiple times during Drosophila embryogenesis*. Development, 1992. **115**(3): p. 853-72.
206. Gonzalez-Reyes, A. and D. St Johnston, *Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during Drosophila oogenesis*. Development, 1998. **125**(15): p. 2837-46.
207. Neuman-Silberberg, F.S. and T. Schupbach, *The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein*. Cell, 1993. **75**(1): p. 165-74.
208. Gonzalez-Reyes, A., H. Elliott, and D. St Johnston, *Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 654-8.
209. Thio, G.L., et al., *Localization of gurken RNA in Drosophila oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript*. Dev Biol, 2000. **221**(2): p. 435-46.
210. Saunders, C. and R.S. Cohen, *The role of oocyte transcription, the 5'UTR, and translation repression and derepression in Drosophila gurken mRNA and protein localization*. Mol Cell, 1999. **3**(1): p. 43-54.
211. Gonzalez-Reyes, A., H. Elliott, and D. St Johnston, *Polarization of both major body axes in Drosophila by gurken-torpedo signalling*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 654-8.
212. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Raf acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during Drosophila oogenesis*. Genes Dev, 1994. **8**(5): p. 629-39.
213. Hsu, J.C. and N. Perrimon, *A temperature-sensitive MEK mutation demonstrates the conservation of the signaling pathways activated by receptor tyrosine kinases*. Genes Dev, 1994. **8**(18): p. 2176-87.
214. Roth, S., et al., *cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila*. Cell, 1995. **81**(6): p. 967-78.
215. Morimoto, A.M., et al., *Pointed, an ETS domain transcription factor, negatively regulates the EGF receptor pathway in Drosophila oogenesis*. Development, 1996. **122**(12): p. 3745-54.
216. Keller Larkin, M., et al., *Role of Notch pathway in terminal follicle cell differentiation during Drosophila oogenesis*. Dev Genes Evol, 1999. **209**(5): p. 301-11.
217. Deneff, N. and T. Schupbach, *Patterning: JAK-STAT signalling in the Drosophila follicular epithelium*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. R388-90.
218. Montell, D.J., P. Rorth, and A.C. Spradling, *slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes Drosophila C/EBP*. Cell, 1992. **71**(1): p. 51-62.

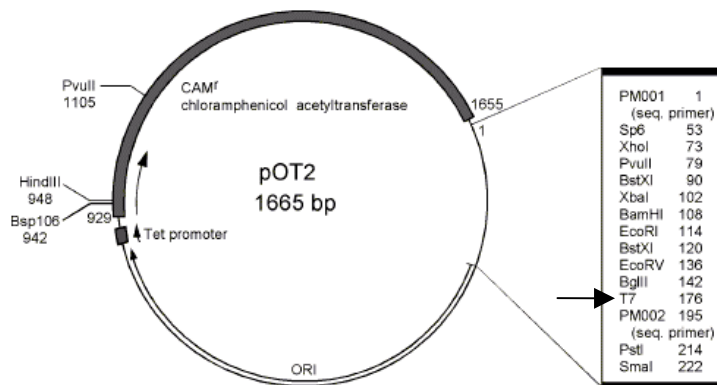
219. Liu, Y. and D.J. Montell, *Identification of mutations that cause cell migration defects in mosaic clones*. *Development*, 1999. **126**(9): p. 1869-78.
220. Montell, D.J., *Border-cell migration: the race is on*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(1): p. 13-24.
221. Silver, D.L. and D.J. Montell, *Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila*. *Cell*, 2001. **107**(7): p. 831-41.
222. Niewiadomska, P., D. Godt, and U. Tepass, *DE-Cadherin is required for intercellular motility during Drosophila oogenesis*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(3): p. 533-47.
223. Duchek, P., et al., *Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor*. *Cell*, 2001. **107**(1): p. 17-26.
224. Duchek, P. and P. Rorth, *Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis*. *Science*, 2001. **291**(5501): p. 131-3.
225. Riechmann, V. and A. Ephrussi, *Axis formation during Drosophila oogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(4): p. 374-83.
226. Spradling, A., *Developmental genetics of oogenesis*, in *The Development of Drosophila melanogaster*, M.-A.A. Bate M, Editor. 1993, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 1-70.
227. Wasserman, J.D. and M. Freeman, *An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the Drosophila egg*. *Cell*, 1998. **95**(3): p. 355-64.
228. Ruohola-Baker, H., et al., *Spatially localized rhomboid is required for establishment of the dorsal-ventral axis in Drosophila oogenesis*. *Cell*, 1993. **73**(5): p. 953-65.
229. Sen, J., et al., *Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity*. *Cell*, 1998. **95**(4): p. 471-81.
230. Pai, L.M., G. Barcelo, and T. Schupbach, *D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in Drosophila oogenesis*. *Cell*, 2000. **103**(1): p. 51-61.
231. Peri, F., M. Technau, and S. Roth, *Mechanisms of Gurken-dependent pipe regulation and the robustness of dorsoventral patterning in Drosophila*. *Development*, 2002. **129**(12): p. 2965-75.
232. Deng, W.M. and M. Bownes, *Two signalling pathways specify localised expression of the Broad-Complex in Drosophila eggshell patterning and morphogenesis*. *Development*, 1997. **124**(22): p. 4639-47.
233. Peri, F. and S. Roth, *Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the Drosophila egg*. *Development*, 2000. **127**(4): p. 841-50.
234. Twombly, V., et al., *The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis*. *Development*, 1996. **122**(5): p. 1555-65.
235. Xu, T. and G.M. Rubin, *Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues*. *Development*, 1993. **117**(4): p. 1223-37.
236. Chou, T.B., E. Noll, and N. Perrimon, *Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in Drosophila and their use in generating germ-line chimeras*. *Development*, 1993. **119**(4): p. 1359-69.
237. Chou, T.B. and N. Perrimon, *The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1996. **144**(4): p. 1673-9.
238. Duffy, J.B., D.A. Harrison, and N. Perrimon, *Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics*. *Development*, 1998. **125**(12): p. 2263-71.
239. Hawkins, N.C., J. Thorpe, and T. Schupbach, *Encore, a gene required for the regulation of germ line mitosis and oocyte differentiation during Drosophila oogenesis*. *Development*, 1996. **122**(1): p. 281-90.
240. Frolov, M.V., et al., *Functional antagonism between E2F family members*. *Genes Dev*, 2001. **15**(16): p. 2146-60.
241. Cayirlioglu, P., et al., *Drosophila E2f2 promotes the conversion from genomic DNA replication to gene amplification in ovarian follicle cells*. *Development*, 2001. **128**(24): p. 5085-98.
242. Edgar, B.A., *Cell cycle. Cell-cycle control in a developmental context*. *Curr Biol*, 1994. **4**(6): p. 522-4.
243. Lilly, M.A. and A.C. Spradling, *The Drosophila endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion*. *Genes Dev*, 1996. **10**(19): p. 2514-26.
244. Torres, I.L., H. Lopez-Schier, and D. St Johnston, *A Notch/Delta-dependent relay mechanism establishes anterior-posterior polarity in Drosophila*. *Dev Cell*, 2003. **5**(4): p. 547-58.
245. Karpen, G.H. and A.C. Spradling, *Analysis of subtelomeric heterochromatin in the Drosophila minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis*. *Genetics*, 1992. **132**(3): p. 737-53.

246. Grammont, M.a.I., Kenneth D., *Organizer activity of the polar cells during Drosophila oogenesis*. Development, 2002. **129**: p. 5131-5140.
247. Rorth, P., K. Szabo, and G. Texido, *The level of C/EBP protein is critical for cell migration during Drosophila oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 23-30.
248. Sapir, A., R. Schweitzer, and B.Z. Shilo, *Sequential activation of the EGF receptor pathway during Drosophila oogenesis establishes the dorsoventral axis*. Development, 1998. **125**(2): p. 191-200.
249. Schupbach, T., *Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in Drosophila melanogaster*. Cell, 1987. **49**(5): p. 699-707.
250. Zhang, Y. and D. Kalderon, *Regulation of cell proliferation and patterning in Drosophila oogenesis by Hedgehog signaling*. Development, 2000. **127**(10): p. 2165-76.
251. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
252. Lum, L. and P.A. Beachy, *The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers*. Science, 2004. **304**(5678): p. 1755-9.
253. Tabata, T. and Y. Takei, *Morphogens, their identification and regulation*. Development, 2004. **131**(4): p. 703-12.
254. Forbes, A.J., et al., *The role of segment polarity genes during early oogenesis in Drosophila*. Development, 1996. **122**(10): p. 3283-94.
255. Queenan, A.M., A. Ghabrial, and T. Schupbach, *Ectopic activation of torpedo/Egfr, a Drosophila receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo*. Development, 1997. **124**(19): p. 3871-80.
256. Raftery, L.A. and D.J. Sutherland, *TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads*. Dev Biol, 1999. **210**(2): p. 251-68.
257. Sekelsky, J.J., et al., *Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1995. **139**(3): p. 1347-58.
258. Kim, J., et al., *Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 304-8.
259. Tsuneizumi, K., et al., *Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 627-31.
260. Ashe, H.L., M. Mannervik, and M. Levine, *Dpp signaling thresholds in the dorsal ectoderm of the Drosophila embryo*. Development, 2000. **127**(15): p. 3305-12.
261. Harland, R.M., *Developmental biology. A twist on embryonic signalling*. Nature, 2001. **410**(6827): p. 423-4.
262. Araujo, H. and E. Bier, *sog and dpp exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the Drosophila embryo*. Development, 2000. **127**(16): p. 3631-44.
263. Francois, V., et al., *Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene*. Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2602-16.
264. Casanueva, M.O. and E.L. Ferguson, *Germline stem cell number in the Drosophila ovary is regulated by redundant mechanisms that control Dpp signaling*. Development, 2004. **131**(9): p. 1881-90.
265. Affolter, M., et al., *Nuclear interpretation of Dpp signaling in Drosophila*. Embo J, 2001. **20**(13): p. 3298-305.
266. Masuyama, N., et al., *Identification of two Smad4 proteins in Xenopus. Their common and distinct properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12163-70.
267. Bech-Otschir, D., M. Seeger, and W. Dubiel, *The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 467-73.
268. Seeger, M., C. Gordon, and W. Dubiel, *Protein stability: the COP9 signalosome gets in on the act*. Curr Biol, 2001. **11**(16): p. R643-6.
269. Wu, J.T., et al., *Neddylaton and deneddylaton regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 1014-20.
270. Doronkin, S., I. Djagaeva, and S.K. Beckendorf, *CSN5/Jab1 mutations affect axis formation in the Drosophila oocyte by activating a meiotic checkpoint*. Development, 2002. **129**(21): p. 5053-64.
271. Ohlmeyer, J.T. and T. Schupbach, *Encore facilitates SCF-Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis during Drosophila oogenesis*. Development, 2003. **130**(25): p. 6339-49.
272. Lilly, M.A., M. de Cuevas, and A.C. Spradling, *Cyclin A associates with the fusome during germline cyst formation in the Drosophila ovary*. Dev Biol, 2000. **218**(1): p. 53-63.

273. Moberg, K.H., et al., *Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines*. Nature, 2001. **413**(6853): p. 311-6.
274. Grosskortenhaus, R. and F. Sprenger, *Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2*. Dev Cell, 2002. **2**(1): p. 29-40.
275. Hsu, J.Y., et al., *E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1)*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. 358-66.
276. Song, X. and T. Xie, *Wingless signaling regulates the maintenance of ovarian somatic stem cells in Drosophila*. Development, 2003. **130**(14): p. 3259-68.
277. Hart, M., et al., *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. Curr Biol, 1999. **9**(4): p. 207-10.
278. Chen, D. and D. McKearin, *Dpp Signaling Silences bam Transcription Directly to Establish Asymmetric Divisions of Germline Stem Cells*. Curr Biol, 2003. **13**(20): p. 1786-91.
279. Bopp, D., et al., *Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in Drosophila melanogaster*. Genes Dev, 1991. **5**(3): p. 403-15.
280. Das, P., et al., *The Drosophila gene Medea demonstrates the requirement for different classes of Smads in dpp signaling*. Development, 1998. **125**(8): p. 1519-28.
281. Sutherland, D.J., et al., *Stepwise formation of a SMAD activity gradient during dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo*. Development, 2003. **130**(23): p. 5705-16.
282. Liang, M., et al., *Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived Smad4 mutants by SCFSkp2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7524-37.
283. Yaron, A., et al., *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 590-4.
284. Guardavaccaro, D., et al., *Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo*. Dev Cell, 2003. **4**(6): p. 799-812.
285. Muzzopappa, M. and P. Wappner, *Multiple roles of the F-box protein Slimb in Drosophila egg chamber development*. Development, 2005. **132**(11): p. 2561-71.
286. Lee, J.R., et al., *Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in Drosophila*. Cell, 2001. **107**(2): p. 161-71.
287. Lee, T., et al., *Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 307-16.

VII-APÉNDICE

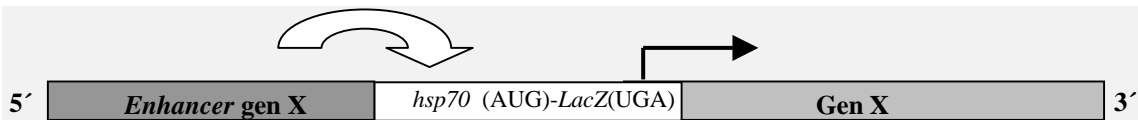
1.2 Vector pOT2 (ESTs)



Los ESTs (Expressed Sequence Tags) de *dskpA* (LP02056), *dcu11* (LD29973), *dcu13* (GH27416), *drbx1* (GH12110), *slmb* (LD31459), *ubcD1* (LD32571), *ubcD6* (LD22830) y *ubcD10* (LD30207) fueron obtenidos del Berkeley *Drosophila* Genome Project, clonados en el vector pOT2, en los sitios EcoRI-BamHI. Estas construcciones fueron utilizadas para sintetizar cada uno de los cDNAs por PCR y para producir las proteínas marcadas con ³⁵S-Metionina por transcripción y traducción *in vitro* (IVTT) en el sistema de reticulocitos de conejo, a partir del promotor de la T7 RNA polimerasa.

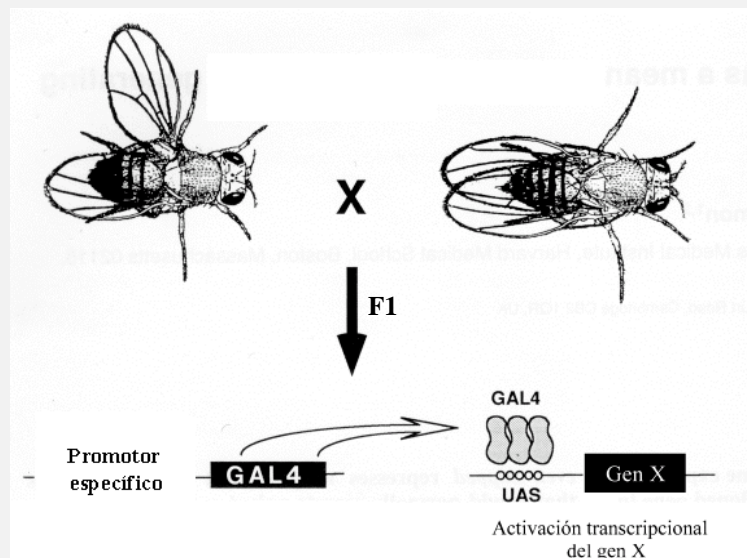
2. Genética de *Drosophila*

2.1 Líneas *enhancer trap*: Las líneas *enhancer trap* son una herramienta útil y sensible a la hora de identificar o analizar el patrón de expresión de genes de interés [1]. Estas líneas se generan por transposición al azar de un elemento P modificado, en el genoma de la mosca. El elemento P lleva el gen de *LacZ* (u otro gen reportero) río abajo del promotor mínimo *hsp70*, que por sí solo no es capaz de inducir la transcripción génica. Sólo cuando el elemento P se inserte en la proximidad de un *enhancer* se detectará expresión de β-galactosidasa en el patrón correspondiente a dicho *enhancer*. Aislado y analizando la región del genoma aledaña al elemento P, podrá identificarse cuál es la secuencia regulatoria que está dirigiendo la expresión de *LacZ*, que estará copiando alguno o todos los aspectos del patrón de expresión del gen cuyo *enhancer* "atrapado".



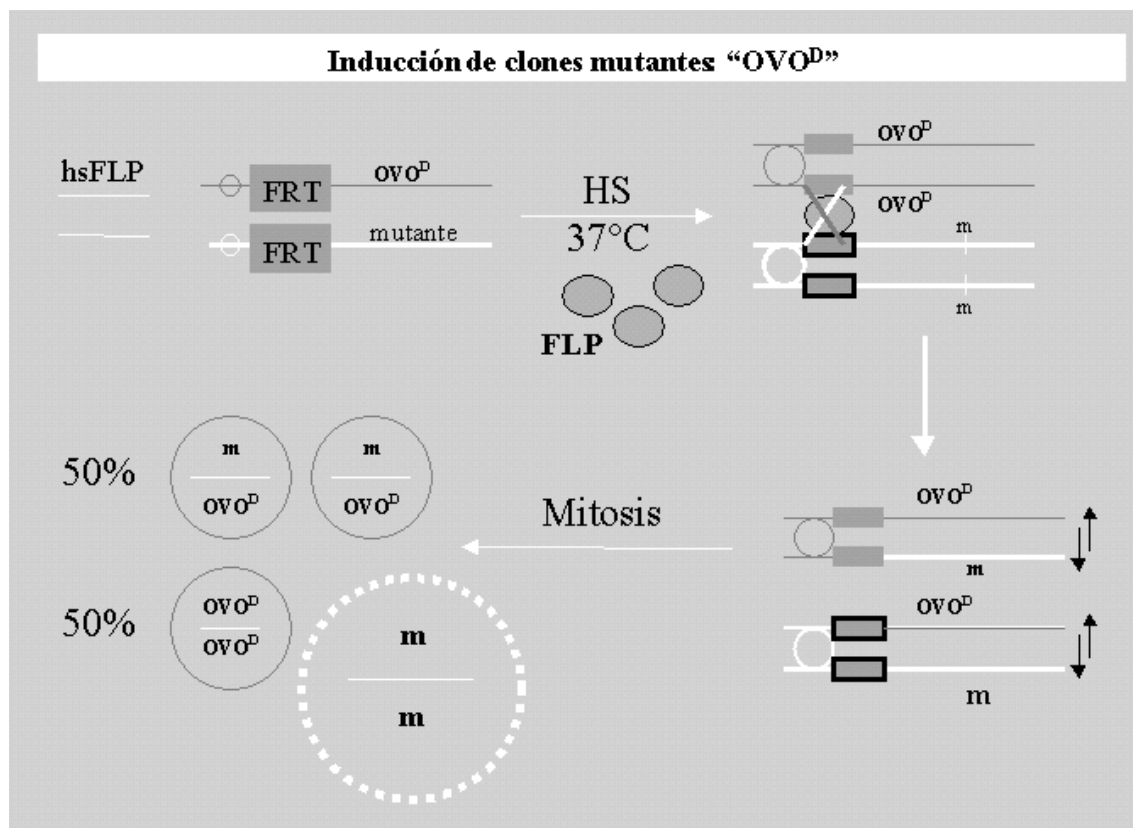
La inserción de un elemento P-LacZ en la cercanía de un *enhancer* X otorga expresión de β -galactosidasa en el mismo patrón que se expresa el gen regulado por dicho *enhancer*.

2.2 Sobre-expresión génica por el sistema Gal4/UAS: esta técnica emplea la combinación de dos elementos P, permitiendo la expresión regulada en espacio y/o tiempo de un gen de interés [2]. Para tal fin, se construye una línea de moscas transgénicas utilizando un elemento P que lleva el gen del factor de transcripción de levaduras Gal4, río abajo de un promotor inducible por temperatura (promotor de *heat shock*) o de un promotor tejido-específico. Por otro lado, se construye una segunda línea transgénica con un elemento P que lleva el gen que se desea sobre-expresar (*GFP*, *LacZ*, o un gen endógeno de la mosca) bajo control de la región regulatoria reconocida por Gal4, el promotor UAS (Upstream Activated Sequences). Cruzando machos de una de las líneas (ej. Gal4) con hembras de la otra línea (ej. UAS) se obtendrá una F1 en la que algunos o todos los individuos llevarán en su genoma los dos elementos P. En esos individuos, el gen de interés se expresará en el patrón que dicta el promotor que controla la expresión de Gal4.



2.3 Generación de clones mutantes homocigotas por el sistema FRT/FLP: Este sistema se basa en la generación de parches de células mutantes homocigotas en el contexto de un individuo heterocigota para dicha mutación, utilizando la enzima Flipasa (FLP) de levaduras, que cataliza la recombinación específica entre secuencias blanco FRT (Flipase Recombinación Target) [3]. Utilizando elementos P, se logró insertar la secuencia FRT en el genoma de la mosca, obteniéndose una colección de inserciones cercanas al centrómero de cada uno de los brazos de los cromosomas X, 2 y 3 (ej. el FRT utilizado en los experimentos de esta tesis está en la posición 82B del cromosoma 3). Para realizar los experimentos el elemento FRT adecuado se recombina (meióticamente) con el alelo mutante del gen de interés (*m*), de manera de obtener un cromosoma "FRT-*m*". Para inducir la generación de clones, deben combinarse los siguientes elementos en una misma mosca: 1) un transposón P que lleva el gen de la Flipasa bajo control de un promotor regulable, 2) el cromosoma FRT-*m* y 3) el cromosoma homólogo al FRT-*m*, llevando el mismo elemento FRT recombinado con un gen marcador (ej. FRT-ubiGFP). Dado que en *Drosophila* los cromosomas homólogos se aparean durante la **mitosis**, induciendo la expresión de la flipasa en el momento en que ocurre la división celular se promoverá la recombinación mitótica entre los cromosomas homólogos. Luego, al segregarse las cromátidas hermanas, el 25% de las células hijas recibirán dos cromosomas FRT-*m*, dando lugar a la formación de un clon mutante homocigota (ver esquema). El clon "hermano" al clon mutante será homocigota para el gen reportero (FRT-ubiGFP), mientras que el resto de las células serán heterocigotas FRT-*m*/FRT-ubiGFP. De esta manera, sólo las células mutantes homocigotas no expresarán el reportero GFP.

El método de la hembra estéril FLP/DFS (FLP, Dominant Female Sterile) agrega al método FRT/FLP la utilización del gen marcador *Ovo^D* en el cromosoma homólogo al que lleva la mutación de interés. La expresión de *Ovo^D* impide que el ovocito acumule vitelo [4, 5] y por lo tanto, sólo los cistoblastos que sean mutantes homocigotas (y por lo tanto hayan perdido el elemento *Ovo^D*) darán origen a cistos con ovocitos vitelogénicos. Por esta razón, el método *Ovo^D* permite identificar exclusivamente a los clones que se han generado en la línea germinal.

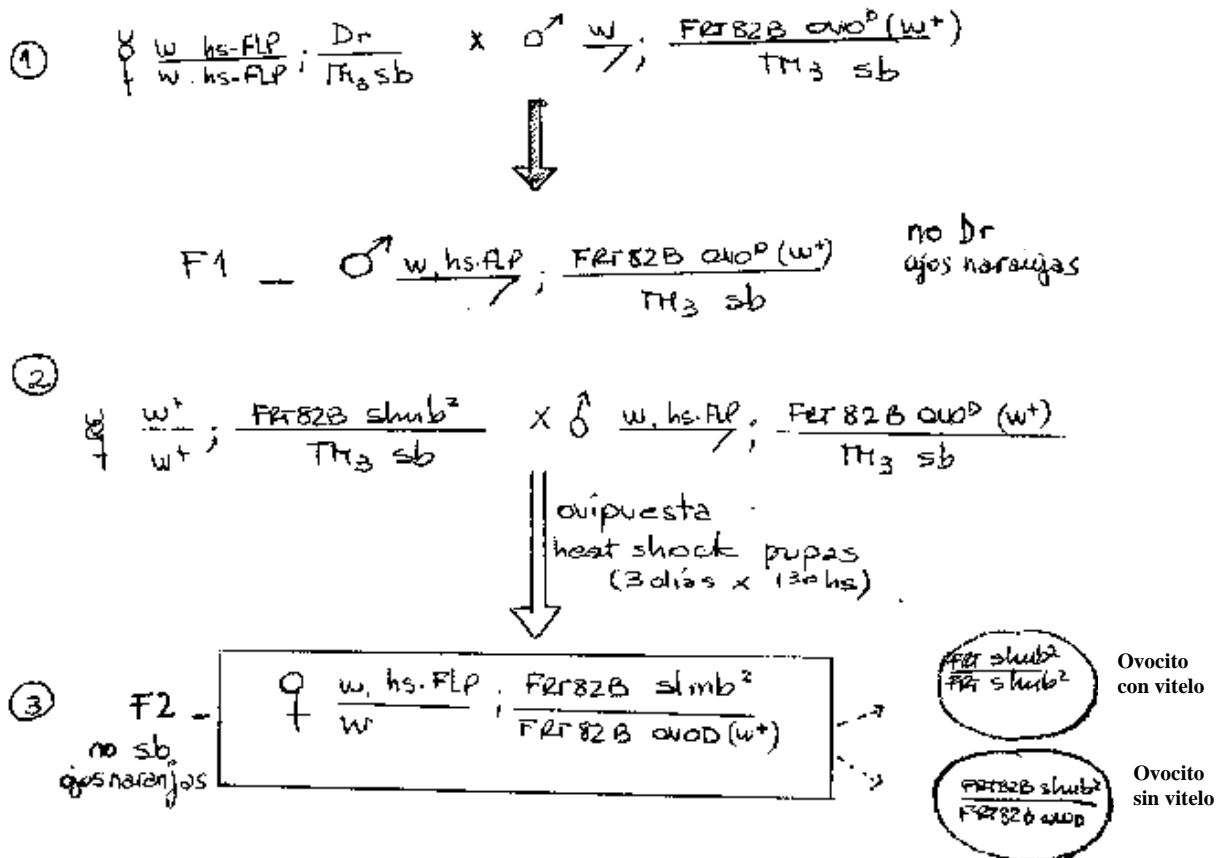


Para obtener clones mutantes por el método FLP-FRT, en el genoma de una misma mosca se introduce el gen de la flipasa (bajo promotor inducible o regulable), un cromosoma portador de la mutación (m) recombinada con la secuencia FRT, y el cromosoma homólogo llevando la secuencia FRT junto con un gen marcador (en este caso Ovo^D). En el momento que está ocurriendo la división celular se induce la expresión de la Flipasa de modo de promover la recombinación entre sitios FRT de los cromosomas homólogos. Si ocurre la recombinación, al segregarse las cromátidas hermanas (flechas), alrededor del 25% de las células formadas será mutante homocigota para el gen de interés. El 75% restante seguirá expresando el gen marcador. En el caso del marcador Ovo^D , sólo las células mutantes homocigotas generarán cistos con ovocitos vitelogénicos.

1. O'Kane, C.J. and W.J. Gehring, *Detection in situ of genomic regulatory elements in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9123-7.
2. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
3. Golic, K.G. and S. Lindquist, *The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome*. Cell, 1989. **59**(3): p. 499-509.
4. Chou, T.B. and N. Perrimon, *Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in Drosophila*. Genetics, 1992. **131**(3): p. 643-53.
5. Chou, T.B. and N. Perrimon, *The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in Drosophila melanogaster*. Genetics, 1996. **144**(4): p. 1673-9.

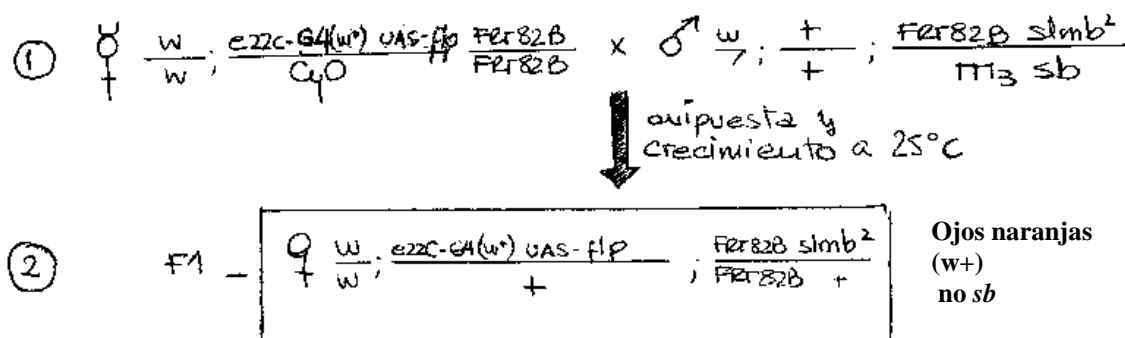
3. Diseño de los principales cruzamientos

3.1 Generación de clones de línea germinal (FRT/DFS)



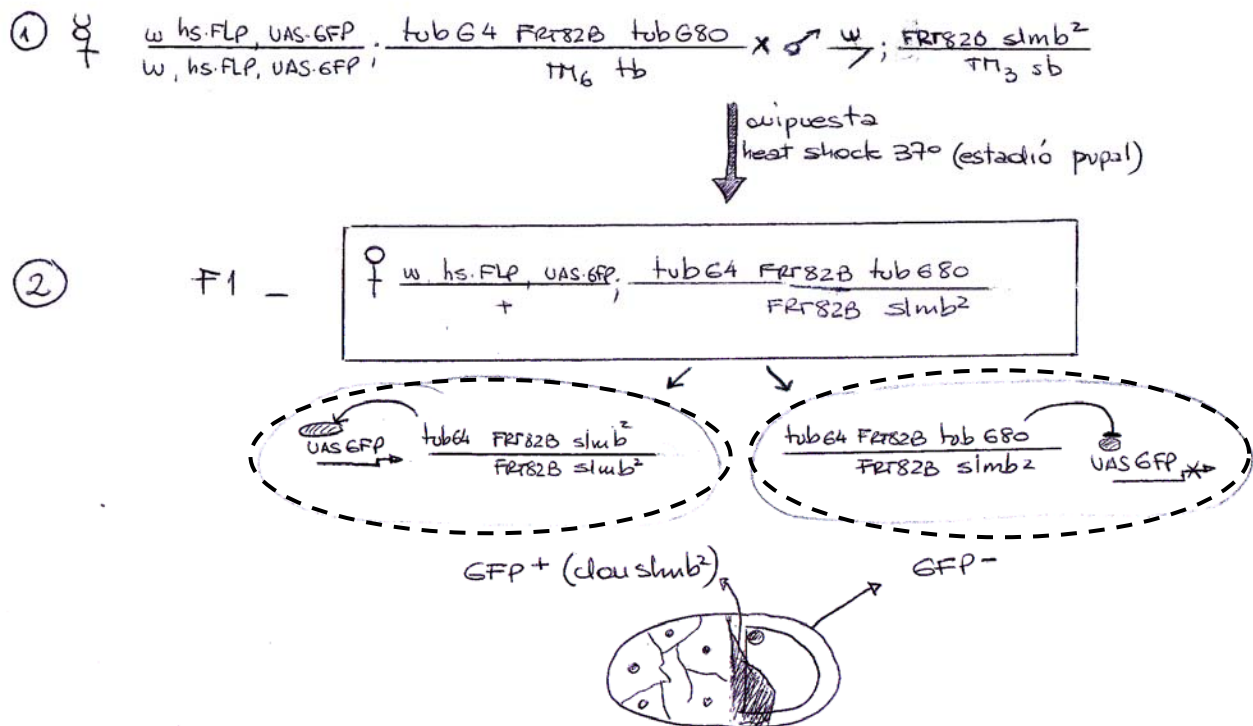
(1) Para generar clones mutantes *slmb* de línea germinal se partió de hembras transgénicas con ojos blancos y rugosos (*w*, *Dr*) que en el cromosoma X llevaban el gen de la Flipasa regulado por un promotor inducible por temperatura (*hs-Flp*). A estas hembras se las cruzó con machos de ojos naranjas (*w*⁺) que llevaban el cromosoma FRT82B recombinado con el marcador *Ovo*^{D(w⁺)}. (2) En la F1, el 100% de los machos heredó el cromosoma X materno con el elemento *hs-Flp* y entre ellos, se seleccionaron los que presentaron ojos naranjas, indicando la presencia del transgén *Ovo*^{D(w⁺)}. (3) Los machos seleccionados se cruzaron con hembras de ojos blancos de la línea FRT82B-*slmb*. A estas hembras se las dejó oviponer durante 3 días a 25°C. Cuando la F2 alcanzó el estadio pupal, se aplicó un shock térmico de 1³⁰hs (a 38°C), una vez al día durante tres días consecutivos (inducción de la recombinación mitótica). Entre los adultos que emergieron de la F2, se seleccionaron las hembras con ojos naranjas (*Ovo*^D) que **no** presentaron el marcador fenotípico *stubble* (*sb*, que indica la presencia del cromosoma balanceador TM3) y que por lo tanto, llevaban el cromosoma FRT82B-*slmb*. Esas hembras portaban todos los elementos necesarios para la generación de clones, de modo que algunas de las células precursoras de la línea germinal recombinaron durante el estadio pupal, generando células madre germinales homocigotas mutantes para *slmb*. Los clones mutantes *slmb* se identificaron como aquellos cistos que presentaron ovocitos vitelogénicos.

3.2 Generación de clones en las células foliculares (*e22C-Flp*)



(1) Para generar clones exclusivamente en el linaje folicular, partimos de una línea de moscas de ojos naranjas (*w+*) que lleva en el cromosoma 2 el gen de la Flipasa bajo control del promotor *UAS*, recombinado con el elemento *e22C-Gal4* que otorga expresión en las células foliculares a lo largo de toda la ovogénesis. A su vez, estas moscas llevaban el elemento *FRT82B* en el cromosoma 3 (sin ningún gen marcador). Las hembras de esta línea se cruzaron con machos de ojos blancos de la línea *FRT82B-slmb*, balanceada con el cromosoma *TM3*, que lleva el marcador fenotípico *stubble* (*sb*). Estas hembras se dejaron ovipositar a 25°C. (2) En la F1 se seleccionaron las hembras de ojos naranjas (indicando la presencia del cromosoma 2 con el gen de la Flipasa) que no presentaron el marcador *sb* y que por lo tanto, llevaban el cromosoma *FRT-slmb*. En estas hembras la recombinación mitótica ocurrió **exclusivamente en las células foliculares** del ovario, en donde se expresa el elemento *e22C-Gal4*. Dependiendo del estadio de la ovogénesis en que se produjo la recombinación, el clon mutante abarcó una cantidad de células mayor o menor dentro del epitelio folicular (la división mitótica empieza en el germario y continúa hasta el estadio 6 de la ovogénesis).

3.3 Generación de clones marcados positivamente con GFP (MARCM)



Para generar clones mutantes marcados **positivamente** con la proteína verde fluorescente (GFP), utilizamos el sistema MARCM, que se basa en introducir simultáneamente en el genoma de la mosca el activador transcripcional Gal4 y el inhibidor transcripcional Gal80, que se une a Gal4 e impide que active la transcripción a partir de los sitios UAS. Para generar los clones *slmb* marcados con GFP combinamos en un mismo individuo el gen de la GFP regulado por la secuencia UAS (*UAS-GFP*), recombinado con el elemento *hs-Flp*, en el cromosoma X. Por otro lado, utilizamos un cromosoma 3 que llevaba, de un lado del centrómero, el transgén tubulina-Gal4 (expresión constitutiva de Gal4) y del otro lado del centrómero, la secuencia FRT82B recombinada con el transgén tubulina-Gal80 (expresión constitutiva de Gal80). El cromosoma 3 homólogo llevaba la secuencia FRT82B recombinada con la mutación *slmb*² (*FRT82B-slmb*²). En una situación normal, Gal80 inhibe constitutivamente la actividad transcripcional de Gal4, de modo que las células no expresan GFP. Al inducir la expresión de la Flipasa se promueve la recombinación mitótica a partir del sitio FRT, de modo que algunas células pierden el transgén *tub-Gal80* y adquieren la mutación *slmb*². Como consecuencia de la ausencia del represor Gal80, Gal4 puede unirse a la secuencia UAS y activar la transcripción de GFP. De esta manera, la presencia de GFP en un clon celular indicó que el mismo era mutante homocigota para *slmb*. También en este caso, el tamaño del clon mutante dependió del estadio del desarrollo en el que se produjo la recombinación.

3.4 Recombinación del elemento *dad-LacZ* en el cromosoma *FRT82B slmb²*

① ♀ $\frac{w}{w}; \frac{FRT82B^{(neo)} slmb^2}{TM_3 sb.}$ x ♂ $\frac{w}{Y}; \frac{dad^{1893}}{TM_3 sb}$



② ♀ $\frac{w}{w}; \frac{FRT82B slmb^2}{dad^{1893}}$ x ♂ $\frac{y, w}{Y}; \frac{Xa}{TM_3 sb}$

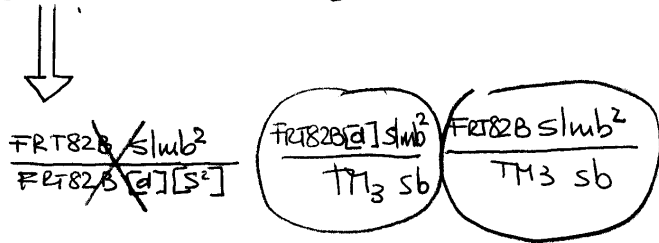
selección F2 con C418

③ 200 ♂ $\frac{w}{Y}; \frac{FRT82B [dad^{1893}] [slmb^2]?}{TM_3 sb}$

④ CHEQUEO POR LETALIDAD (*slmb²*) - 200 parejas

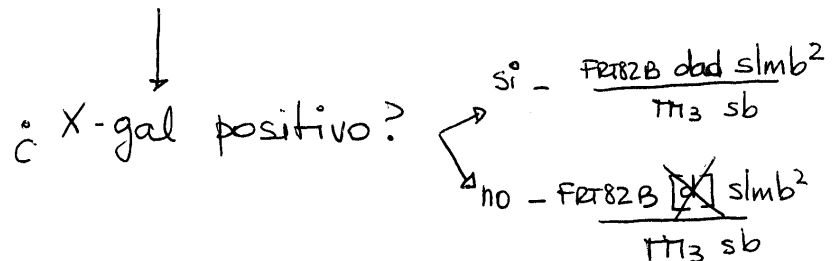
④* ♂ $\frac{w}{Y}; \frac{FRT82B [d] [slmb^2]}{TM_3 sb}$ x ♀ $\frac{w}{w}; \frac{FRT82B slmb^2}{TM_3 sb}$

⑤ toda la F1 stubble?



⑤ CHEQUEO POR X-gal (~150 líneas)

5 F1 ♀ $\frac{FRT82B [dad^{1893}] slmb^2}{TM_3 sb}$



Para introducir el elemento *dad-LacZ* (*dad*¹⁸⁸³) en el cromosoma *FRT82B-slmb*² generamos moscas doble recombinantes, ya que el locus de *dad* se encuentra en la posición 89E del brazo derecho del cromosoma 3, entre el sitio de inserción del elemento *FRT* (82B) y el locus *slmb* (93C). El mapa de recombinación disponible en el Flybase nos permitió calcular que la frecuencia de la doble recombinación sería del 1,4%. En base a esta predicción, calculamos, en cada paso, el número de individuos que debíamos chequear. A continuación, se describen los pasos seguidos para llegar al doble recombinante.

- 1- Hembras de la línea *FRT82B-slmb*² se cruzaron con machos de la línea *dad*¹⁸⁸³, para obtener una F1 con individuos que lleven ambos cromosomas 3. En la F1 se seleccionaron hembras *FRT82B-slmb*² / *dad*¹⁸⁸³ (no *stubble*) ya que en *Drosophila*, la recombinación meiótica ocurre sólo en hembras. Estas hembras fueron la fuente de gametas “posible doble recombinantes”, que se seleccionaron en los pasos sucesivos.
- 2- Las hembras *FRT82B-slmb*² / *dad*¹⁸⁸³ se cruzaron con machos de la línea balanceadora TM3 *stubble* y en la progenie, se seleccionaron 200 machos *stubble* que llevaban el elemento *FRT82B*. Dicha selección se realizó utilizando el antibiótico G418 (neomicina) ya que el elemento *FRT* está ligado al gen de resistencia a neomicina (*neo*).
- 3- Habiendo seleccionado estos machos, probamos para cada uno de ellos si los elementos *dad*¹⁸⁸³ y *slmb*² estaban presentes en el cromosoma *FRT82B*.
- 4- Para probar si la mutación *slmb*² estaba presente en el cromosoma *FRT82B* (pudo haberse perdido durante la meiosis por recombinación) realizamos un “**chequeo por letalidad**”, cruzando a cada uno de los 200 machos, en viales individuales, por 4 hembras de la línea *FRT82B-slmb*². Si el alelo *slmb*² estaba presente en el macho candidato, toda la F1 debía tener el cromosoma balanceador (*stubble*), ya que dicha mutación es letal en homocigosis. Evaluamos la F1 de cada uno de los cruzamientos (1 a 200) y guardamos aquellos machos **parentales** en los que se confirmó la presencia de *slmb*² (aproximadamente 150 machos).
- 5- Para analizar la presencia de *dad*¹⁸⁸³ en estos 150 machos *FRT82B-slmb*², seleccionamos cinco hembras de cada una de las F1 del último cruzamiento (punto 4) y realizamos tinciones de ovarios con X-gal, ya que *dad*¹⁸⁸³ otorga expresión de β-galactosidasa en el dominio de expresión del gen *dad*. Entre las 150 F1 analizadas, encontramos tres líneas positivas para *dad-LacZ*. Los machos parentales correspondientes a estas tres líneas fueron cruzados por la línea balanceadora TM3 para fundar la línea *FRT82B dad*¹⁸⁸³ *slmb*²/TM3 *sb* que se utilizó en los experimentos del Capítulo II .