

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FATIGA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

UN SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO QUE REGULA EL CRECIMIENTO
CELULAR Y LA RAMIFICACIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO

AUTOR: LIC. LÁZARO CENTANIN

DIRECTOR: DR. PABLO WAPPNER

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO LELOIR

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AÑO 2006

*a Luis, Estani y Olguita,
por enseñar, fomentar y practicar
la dedicación a las pasiones.*

*a Marisa y a Marisa,
por su vida para los otros
-“regalando alegrías, así te recuerdo yo”-*

a Julieta, por la revelación.

AGRADECIMIENTOS

Tanto el proceso de formación profesional que implica realizar una Tesis de Doctorado como la experiencia de participar en un grupo de investigación tienen como base fundamental la interacción en algunos casos cotidiana y en otros esporádica con infinidad de personas que aportan conocimientos de lo más variados. El trabajo resultante es de este modo función de la gente con la que uno interactuó. Esto podría tomarse como un acto de auténtica prudencia (si no les gusta lo que leen, le reclaman a la lista que se encuentra a continuación) pero la idea con la que está dicho es en realidad muy otra: a lo largo de estos años he aprendido un número muy grande de cosas de un número también grande de personas, y me enorgullece haber realizado un trabajo en el que parte de esos aprenderes se hayan al menos tratado de practicar.

Dentro de las personas que influyen en esta etapa de formación, una Tesis doctoral depende fundamentalmente de la interacción del doctorando con su jefe y con el laboratorio en el que realiza su trabajo. Como jefe Pablo ha estado siempre presente y ha sido a lo largo de toda la Tesis muy optimista y entusiasta con el trabajo de investigación al que me he dedicado; su predisposición a discutir los resultados fue en todos los casos auténtica y beneficiosa. Aparte de lo dicho, debo agradecerle particularmente el acierto a la hora de elegir becarios: me considero un afortunado por haber compartido el laboratorio con quienes lo han integrado, un grupo de gente no sólo de formación hipervariada (biólogos, bioquímicos y biotecnólogos de universidades de distintos puntos del país) sino también de personalidades lo suficientemente distintas para enriquecer el día a día pero no tan disímiles como para dificultar la interacción. Entonces, a Silvia, Daniela y Sofía, por los primeros años, y a Maxi, Nuria, Lucía, Mariana, Julieta, Muchacho y Andrés por los oídos y las voces y las facturas y los chupitos que hicieron de lo cotidiano algo memorable. También a Agustina y a Juan, recambio generacional con la misión de mantener viva la alegría.

Fuera del laboratorio, el establecimiento del grupo de Fernanda Ceriani fue una infusión de aire fresco y de acercamiento a nuevos modos de diseño y hechura de experimentos compartiendo el modelo animal. Fernanda y Pablo fomentaron reuniones conjuntas para que los estudiantes presentemos de forma regular nuestros resultados; la habilidad de poder contar lo que uno hace es necesaria toda vez que uno quiera interactuar con terceros, y considero que esa rutina fue extremadamente beneficiosa. Entonces, a Fernanda, a Paz, a Carolina y a todo el resto del grupo, que han hecho del cuarto de moscas un lugar cálido y agradable a pesar de ser oscuro y frío.

Las gracias necesariamente se extienden más allá de los laboratorios de Drosophila. Dentro del pasillo, imposible no mencionar a mis referentes, Alejandro y Federico: palabra, oído, palmada, abrazo. Enseñanza queriendo no querer enseñar. A Laurita, Caffé, Cordobés, Gabriela, Daniela, Rodolfo, Clarita, Carina, Leo, Mariano, Cristian, Alejandro, Diego y Martín, inevitables del regocijo.

También dentro del Instituto a mi tutor, Luis, por aquellos primeros años donde se me revelaron los insectos. A aquellos investigadores que continúan predicando pasión por lo que hacen, a los preguntadores natos, a los que pueden criticar un concepto sin atacar a la persona que lo enuncia y a todos los que comparten lo que saben y acompañan en el aprender. A todo el personal del Instituto: mantenimiento, autoclave, biblioteca, recepción, soporte informático y secretaría.

A los Organismos que durante la presente Tesis Doctoral financiaron mi actividad en el laboratorio: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la Fundación Carrillo, la Fundación Antorchas y la Fundación Instituto Leloir.

RESUMEN

Los niveles tisulares de oxígeno regulan la expresión de genes que intervienen en procesos celulares y fisiológicos básicos como la angiogénesis, la eritropoiesis, y el ciclo celular. Dicha expresión depende de HIF-1 (Hipoxia Inducible Factor-1), un factor de transcripción heterodimérico α/β que es degradado en normoxia y estabilizado en hipoxia. La destrucción de HIF-1 α depende de la hidroxilación de dos residuos de prolina, catalizada por prolil-4-hidroxilasas (PHDs) específicas que por emplear oxígeno molecular como co-sustrato son consideradas Sensores Moleculares de Oxígeno de la célula. Las PHDs fueron recientemente identificadas y se ignoraba qué tipos de procesos biológicos controlan en metazoos superiores. En la presente Tesis, se identificó el sensor de oxígeno de *Drosophila*, al que denominamos Fatiga y se caracterizó su función en la regulación del crecimiento celular y en la ramificación del sistema traqueal, un proceso que presenta rasgos en común con la angiogénesis de los mamíferos. También se observó, mediante experimentos genéticos, que los principales fenotipos de pérdida de función de Fatiga se revierten en ausencia de la proteína Sima, homólogo de HIF en *Drosophila*. Sin embargo, los doble mutantes *fatiga sima* presentan anomalías en el desarrollo del ala y del ovario, evidenciando posibles funciones de Fatiga independientes de Sima.

Palabras clave: Hipoxia, Crecimiento Celular, Desarrollo Traqueal, Sensor Molecular de Oxígeno, Receptor de FGF/Breathless.

ABSTRACT

Oxygen levels control the expression of a plethora of genes involved in cellular and physiological processes such as angiogenesis, eritropoiesis and cell cycle. In mammals, the transcriptional response to hypoxia depends on HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), an α/β heterodimeric transcription factor that is rapidly degraded in normoxia and stabilized in hypoxia. Oxygen-dependent destruction of the HIF-1 α subunit is mediated by the hydroxylation of two key prolyl residues, a reaction catalyzed by specific prolyl-4-hydroxylases that utilize molecular oxygen as a co-substrate thus, functioning as oxygen sensors. Since PHDs have been recently identified, the developmental consequences of their inactivation in higher metazoans had not been reported so far. In this Thesis, we have identified the *Drosophila* oxygen sensor, which we have named Fatiga. We have characterized its effects on cell growth and tracheal sprouting, a process related to mammalian angiogenesis. Finally, we have observed that the defects occurring in Fatiga mutants are reverted by concomitant mutation of the *sima* gene, the *Drosophila* HIF- α homologue, suggesting that the main functions of PHDs during *Drosophila* development involve down-regulation of HIF. However, *fga sima* adult flies show defects in wing and ovary development, which imply that Fga is involved in patterning these organs in a Sima-independent manner.

Keywords: Hypoxia, Cell Growth, Tracheal Sprouting, Molecular Oxygen Sensor, FGF-R/Breathless.

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.- EL OXÍGENO COMO FUENTE DE ENERGÍA	2
2.- LOS ORGANISMOS PRESENTAN ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS A HIPOXIA	2
3.- HIPOXIA LOCAL Y SU RELEVANCIA EN INFARTOS Y TUMORES	3
4.- HIF ES EL REGULADOR MAESTRO EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA	4
5.- LA ESTRUCTURA DE LA TESIS	4
6.- CICLO DE VIDA DE <i>DROSOPHILA</i>	5
MATERIALES Y MÉTODOS	7
1.- MANTENIMIENTO DE STOCKS	8
2.- LÍNEAS DE MOSCAS UTILIZADAS	8
3.- GENÉTICA	9
4.- ANÁLISIS DE CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA	10
5.- TRATAMIENTOS DE HIPOXIA	11
6.- ANÁLISIS DE FENOTIPOS TRAQUEALES EN LARVAS DE TERCER ESTADIO	11
7.- EXPERIMENTOS DE SILENCIAMIENTO POR <i>dsRNA</i> EN EMBRIONES	11
8.- GENERACIÓN DE LÍNEAS DE MOSCAS TRANSGÉNICAS	12
9.- BIOLOGÍA MOLECULAR	13
10.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA	14
11.- HIBRIDIZACIONES <i>IN SITU</i> DE RNAs MENSAJEROS	14
12.- ANTICUERPOS E INMUNO-TINCIONES	15
CAPÍTULO PRIMERO	17
1.- INTRODUCCIÓN	18
1.1 UN GEN INDUCIBLE POR HIPOXIA	18
1.2 UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RESPONSABLE DE LA INDUCCIÓN POR HIPOXIA	18
1.3 UNA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN CADA CÉLULA	18
1.4 LA REGULACIÓN POR HIPOXIA DE HIF	19
1.5 UN DOMINIO DE DEGRADACIÓN DEPENDIENTE DE OXÍGENO EN HIF- α	19
1.6 NATURALEZA DEL SENSOR DE OXÍGENO	20
1.7 LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN <i>D. MELANOGASTER</i>	22
2.- OBJETIVOS PARTICULARES	24
3.- RESULTADOS	25
3.1 DISEÑO DE UN SCREEN DE MODIFICADORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA	25
3.2 MUTANTES DEL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO PRESENTAN ALTERADA LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA.	29
3.3 FATIGA CODIFICA PARA TRES TRANSCRIPTOS DISTINTOS	38
3.4 LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE FATIGA SON FUNCIONALMENTE DIFERENTES	43
4.- DISCUSIÓN	48
4.1 IDENTIFICACIÓN DEL SENSOR DE OXÍGENO DE <i>DROSOPHILA</i> Y SUS EFECTOS DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN	48
4.2 CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LOS SENSORES MOLECULARES DE OXÍGENO DE LAS DISTINTAS ESPECIES	49
5.- CONCLUSIÓN.	54
CAPÍTULO SEGUNDO	55
1.- INTRODUCCIÓN	56
1.1 SISTEMAS CELULARES VS MODELOS ANIMALES	56
1.2 LA FALTA DE OXÍGENO RESULTA EN DEFECTOS EN EL CRECIMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE LA INACTIVACIÓN DE FATIGA	57
1.3 UNA ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS <i>IN VIVO</i> DE ROLES DE FATIGA DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE SIMA.	60

2.- OBJETIVOS PARTICULARES	61
3.- RESULTADOS	62
3.1 MOSCAS MUTANTES <i>sima</i> VIVEN EN NORMOXIA PERO NO EN HIPOXIA	62
3.2 EL ENCENDIDO CONSTITUTIVO DEL REPORTERO TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN MUTANTES <i>FATIGA</i> SE SUPRIME EN DOBLE MUTANTES <i>FATIGA SIMA</i>	64
3.3 REVERSIÓN DEL FENOTIPO DE VACIADO TRAQUEAL EN DOBLE MUTANTES <i>FATIGA SIMA</i>	65
3.4 SIMA TAMBIÉN MEDIA LOS EFECTOS DE FATIGA EN CRECIMIENTO CELULAR Y CORPORAL	66
3.5 LA FALTA DE SIMA REVIERTE LA LETALIDAD DE LOS MUTANTES <i>fatiga</i>	70
4.- DISCUSIÓN	73
4.1 LOS MUTANTES <i>sima</i> SON VIABLES EN NORMOXIA	73
4.2 FATIGA COMO SENSOR DE OXÍGENO DEDICADO A SIMA	74
4.3 SIMA ES UN REGULADOR NEGATIVO DEL CRECIMIENTO CELULAR	76
4.4 MECANISMOS ADICIONALES DE REGULACIÓN DE LAS PROLIL HIDROXILASAS DEPENDIENTES DE OXÍGENO	77
4.5 BLANCOS ADICIONALES DE LAS HIDROXILASAS DE HIF	79
4.6 LA HIDROXILACIÓN DE PROLINAS COMO MODIFICACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRA-CELULARES	80
5.- CONCLUSIÓN	82
CAPÍTULO TERCERO	83
1.- INTRODUCCIÓN	84
1.1 LOS SISTEMAS RESPIRATORIO Y CIRCULATORIO EN MAMÍFEROS Y SU REGULACIÓN POR LOS NIVELES DE OXÍGENO	84
1.3 EL SISTEMA TRAQUEAL DE LOS INSECTOS Y SU REGULACIÓN POR HIPOXIA	86
2.- OBJETIVOS PARTICULARES	93
3.- RESULTADOS	94
3.1 LA VÍA FATIGA-SIMA MODULA EL DESARROLLO DEL SISTEMA TRAQUEAL	94
3.2 EL RECEPTOR DE FGF, <i>breathless</i> , ES UN GEN TRAQUEAL INDUCIBLE POR HIPOXIA	101
3.3 BREATHLESS ES NECESARIO Y SUFICIENTE PARA PRODUCIR LOS FENOTIPOS DE EXTRA-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL	103
4.- DISCUSIÓN	108
4.1 LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA CONTROLAN EL GRADO DE RAMIFICACION TRAQUEAL	108
4.2 LAS CÉLULAS TERMINALES TRAQUEALES SON PARTICULARMENTE SENSIBLES A HIPOXIA	109
4.3 <i>breathless</i> COMO BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA RESPONSABLE DE LOS FENOTIPOS DE SOBRE-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL	110
4.4 LA VÍA FGA/SIMA Y SU INTERACCIÓN CON LOS SISTEM DE REPARTO DE OXÍGENO EN MAMÍFEROS E INSECTOS	113
5.- CONCLUSIÓN	115
ANEXOS	116
ANEXO 1	117
ANEXO 2	118
ANEXO 3	120
ANEXO 4	122
BIBLIOGRAFÍA	124

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL OXÍGENO COMO MOLÉCULA ESENCIAL PARA LA VIDA

1.- EL OXÍGENO COMO FUENTE DE ENERGÍA

El oxígeno es desde hace poco más que 2000 millones de años una molécula necesaria para la gran mayoría de las formas de vida que conocemos. Los seres vivientes que poblaban la tierra en aquel momento se restringían a organismos uni- u oligo- celulares que tomaban el oxígeno del medio ambiente por simple difusión. La evolución hacia especies multicelulares complejas -artrópodos, vertebrados, mamíferos- se basó en la aparición de órganos especializados en captar activamente y transportar esta molécula clave para asegurar una oxigenación celular adecuada. Claros ejemplos de estos órganos especializados son los pulmones y el sistema vascular de los mamíferos actuales.

El tráfico favorable de electrones desde NADH al O₂, mediado por las proteínas que constituyen la cadena respiratoria resulta en la generación de un gradiente electroquímico de protones a un lado y otro de la membrana interna mitocondrial, que luego se utiliza para generar ATP. El oxígeno es entonces el aceptor final de electrones de esta cadena respiratoria mitocondrial necesaria para la obtención de energía a partir del metabolismo de azúcares. La naturaleza altamente oxidante del oxígeno lo convierte en un aceptor final de electrones ideal, ya que cuanto más oxidante sea el aceptor y más reductor sea el dador, más productivo energéticamente es el traspaso de electrones del dador al aceptor (del mismo modo que una usina hidroeléctrica es más rendidora cuanto mayor es la diferencia de nivel de agua entre el punto más alto y el más bajo).

Actualmente se cree que el aumento de la presión parcial de oxígeno en la atmósfera terrestre ocurrido hace 2300 millones de años (fenómeno conocido como La Gran Oxidación) y la aparición de un sistema eficiente para generar energía dependiente de esta molécula fueron los pilares sobresalientes para la aparición de organismos multicelulares complejos y energéticamente demandantes (Bekker et al., 2004; Hedges et al., 2004; Hedges et al., 2001). Hoy, el oxígeno es el elemento químico más abundante en la atmósfera y en los seres vivos. Constituye el 21% -en volumen- de la atmósfera, el 85,8% en masa de los océanos, el 46,7% en masa de la corteza terrestre (como componente de la mayoría de las rocas y minerales) y representa un 60% del cuerpo humano.

2.- LOS ORGANISMOS PRESENTAN ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS A HIPOXIA

Los niveles intracelulares de oxígeno deben mantenerse en un rango muy acotado, dado que niveles elevados pueden causar consecuencias severas por daño oxidativo y niveles reducidos pueden comprometer metabólicamente a la célula y por ende al organismo; es entendible entonces que exista una respuesta celular y sistémica a cambios en la disponibilidad de oxígeno. De hecho, la respuesta a hipoxia existe en casi todos los seres vivos, desde organismos unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae* hasta organismos pluricelulares complejos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*; la naturaleza de esta respuesta está sorprendentemente conservada entre *phyla*. La respuesta a

hipoxia involucra modificaciones adaptativas tanto agudas como crónicas que tienden a hacer más soportable la condición adversa de falta de O_2 .

Cuando una persona que vive a nivel del mar experimenta hipoxia por la altura, responde aumentando la frecuencia respiratoria -hiperventilando-, como compensación ante la caída en la presión parcial de oxígeno. La respuesta hiperventilatoria está mediada por quimiorreceptores presentes en el cuerpo carotídeo, que dejan de estimularse cuando se restituye la presión de O_2 normal. Individuos de poblaciones que viven permanentemente en la altura responden hiperventilando mucho menos cuando son expuestos a hipoxia, evidenciando mecanismos adaptativos a esta condición adversa (Cruz et al., 1980). Además de la respuesta de hiperventilación disminuida, las poblaciones que viven en la altura presentan adaptaciones adicionales, como por ejemplo 1) un aumento en el número de alvéolos pulmonares y 2) mayores niveles de hemoglobina (Hb) en sangre, junto con un mayor recuento de glóbulos rojos. Estas adaptaciones tienden a facilitar la llegada del oxígeno a las células de los distintos tejidos del cuerpo ya que: 1) los alvéolos pulmonares son los sitios donde se produce el intercambio gaseoso entre el pulmón y los vasos sanguíneos, por lo que un mayor número de alvéolos redundará en un intercambio más fluido y por consiguiente en sangre que se oxigenará más fácilmente; 2) la hemoglobina se encuentra en los glóbulos rojos y capta el oxígeno en los pulmones para liberarlo en los tejidos periféricos, por lo que tener más glóbulos rojos y más hemoglobina optimiza el transporte de oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos que lo demandan. Experimentos con animales de laboratorio revelaron que los mismos cambios ocurrían cuando éstos eran sometidos a breves estadías en la altura (Bert, 1882), indicando que la respuesta adaptativa podía ocurrir en tiempos relativamente cortos.

3.- HIPOXIA LOCAL Y SU RELEVANCIA EN INFARTOS Y TUMORES

Típicamente, un episodio de infarto se produce cuando una arteria se obstruye y deja sin suministro sanguíneo al órgano que irrigaba, quedando el tejido privado tanto de oxígeno como de nutrientes transportados por la sangre. Se ha postulado que una respuesta transcripcional a hipoxia activa es fundamental para inducir la re-vascularización del órgano afectado (Iyer et al., 1998). El tejido que sufrió el infarto responde a la privación de oxígeno expresando factores pro-angiogénicos que contribuyen a la formación de nuevos vasos que promueven la irrigación sanguínea. Por otro lado, ha sido reportado también que la respuesta transcripcional a hipoxia es relevante en el proceso de cicatrización de heridas. Experimentos utilizando modelos animales mostraron que la cicatrización de heridas en ratones salvajes es mucho más eficiente que la que ocurre en ratones cuya respuesta a hipoxia está impedida (Sen et al., 2002). Adicionalmente, hiper-activar artificialmente la respuesta a hipoxia en la zona afectada por la herida resulta en una cicatrización más rápida y eficiente (Sen et al., 2002; Tang et al., 2004). Conocer los mecanismos por los que los bajos niveles de oxígeno disparan respuestas de re-vascularización y cicatrización de heridas podría resultar en una ventaja para el diseño de estrategias

terapéuticas, donde una activación farmacológica de la respuesta a hipoxia podría aumentar las chances de una evolución clínica favorable.

La respuesta a hipoxia también es relevante en la evolución de los tumores. Típicamente, el crecimiento de un tumor está limitado por la disponibilidad de nutrientes y oxígeno que difunden desde el vaso sanguíneo más cercano. Cuando un clon celular crece más allá del límite impuesto por la tasa de difusión tisular del oxígeno, la hipoxia sensada por la creciente masa de células tumorales dispara la expresión de factores angiogénicos que promuevan la vascularización del tumor (Pugh and Ratcliffe, 2003). La existencia de nuevos vasos sanguíneos que aportan nutrientes y oxígeno, permite entonces el crecimiento del tumor y constituye también una vía de comunicación para diseminar distintos focos tumorales a lo largo del organismo. En este caso, el desafío de la clínica es acotar o inhibir la respuesta a hipoxia local dentro del tumor para impedir la angiogénesis y de ese modo la progresión tumoral.

4.- HIF ES EL REGULADOR MAESTRO EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA

El aumento del número de glóbulos rojos en sangre inducido por la exposición a hipoxia fue el fenómeno que inició -como veremos en la introducción del Capítulo 1- una línea de investigación que acabaría identificando los componentes celulares encargados de SENSAR Y RESPONDER A CAMBIOS EN LA PRESIÓN PARCIAL DE OXÍGENO. Uno de los avances clave en la comprensión de este fenómeno se produjo cuando se identificó a la Eritropoyetina (EPO) como una hormona inducida por hipoxia y estimuladora de la producción de eritrocitos (Erslev, 1953; Jacobs et al., 1985; Jacobson, 1957; Kurst et al, 1983; Lin et al., 1985). La identificación, clonado y expresión recombinante de esta hormona tuvo luego especial relevancia en la terapéutica de anemias severas. El trabajo de diversos grupos de investigación a lo largo de muchos años llevó a la identificación de HIF (por *Hypoxia Inducible Factor*), un factor de transcripción que se estabiliza en hipoxia y sólo en esta condición promueve la transcripción de genes blanco que serán los efectores finales de las distintas respuestas adaptativas (Huang et al., 1998; Mawell et al., 1993; Wang and Semenza, 1993a; Wang and Semenza, 1993b)

Durante casi una década la pregunta central en el estudio de la respuesta transcripcional dependiente de hipoxia fue por qué HIF se estabiliza en hipoxia y no en normoxia. Este interrogante -¿cómo una proteína lee la caída en la presión parcial de oxígeno?- continuaba sin ser respondido al inicio de esta Tesis y constituyó la pregunta fundamental sobre la que se basa el Trabajo de Investigación que la integra.

5.- LA ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente Tesis consta de tres capítulos, organizados cada uno con su respectiva introducción y discusión. Los tópicos que se presentan en cada uno de ellos están relacionados y son dependientes los últimos de los primeros, pero abarcan módulos que creo mejor analizar por separado. El PRIMER CAPÍTULO narra la búsqueda del Sensor Molecular de Oxígeno de la Célula y

establece en qué medida es necesario este Sensor Molecular para mantener la homeostasis de un organismo entero; el SEGUNDO CAPÍTULO está dedicado a analizar cuáles de las funciones del Sensor están mediadas por su único sustrato conocido hasta el momento, el factor de transcripción HIF- α /Sima; el TERCER CAPÍTULO, finalmente, hace hincapié en cómo los genes mencionados modulan la morfología del sistema distribuidor de oxígeno mediante la inducción de un receptor de la familia de FGF, en una clara respuesta adaptativa al medio ambiente que resulta estar conservada entre insectos y mamíferos. Todo el trabajo expuesto en esta Tesis se llevó a cabo utilizando como modelo a la mosca *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* es un insecto holometábolo -remodela absolutamente su patrón corporal durante la metamorfosis, donde pasa de ser una larva ápoda a un adulto hexápodo volador- y cosmopolita que fue introducido al campo de la investigación a principios del siglo XX por Thomas Morgan. Como se verá en la introducción del Capítulo 1, esta mosca presenta una respuesta transcripcional a hipoxia homóloga a la que ocurre en mamíferos y por lo tanto daba la oportunidad de estudiar la naturaleza de esta respuesta en individuos genéticamente modificados, evidenciando la relevancia funcional de los genes que la llevan a cabo. Lo mucho que se ha utilizado a este modelo para llevar a cabo abordajes genéticos a los más diversos tópicos biológicos ha resultado en un amplio espectro de herramientas que permiten, entre otras cosas, expresar ectópicamente un gen de interés en un tejido determinado -o en células individuales-, analizar funcionalmente y a gran escala un fenotipo dado en colecciones de mutantes existentes -y disponibles sin cargo-, generar nuevos mutantes a partir de mutantes existentes y combinar unas mutaciones con otras para analizar las consecuencias de la pérdida simultánea de función de múltiples factores en un organismo entero.

6.- CICLO DE VIDA DE *DROSOPHILA*

En la presente Tesis se utilizó a *Drosophila* como modelo experimental, con la intención de realizar un abordaje genético al mecanismo de Sensado de Oxígeno. Antes de comenzar con la parte experimental, considero necesario hacer una breve introducción a la biología de *Drosophila* con especial incapié en los eventos que serán analizados a lo largo del trabajo de investigación.

El ciclo de vida de esta mosca, desde que un huevo es fecundado hasta que el adulto alcanza la madurez sexual dura de 10 a 12 días a 25° C. Una vez que el huevo es fecundado, la madre lo deposita en un lugar húmedo y 24 horas más tarde eclosiona una larva ápoda. El estadio larval dura unos 4-5 días en los que el individuo se alimenta y crece considerablemente de tamaño. Las larvas presentan un ESQUELETO EXTERNO compuesto principalmente por quitina, que brinda protección y sostén para anclar los músculos del cuerpo pero impone un límite en el crecimiento: los tejidos blandos no pueden crecer más allá de los límites impuestos por la cutícula. Es por esto que durante los estadios larvales el viejo exoesqueleto se cambia por uno nuevo más grande, fenómeno que se conoce como MUDA; *Drosophila* muda de larva I a larva II y de larva II a larva III, durando aproximadamente 1 día el 1^{er} estadio larval, 1 día el 2^{do} y 2 días el 3^{er} estadio larval.

Luego de llegar a un tamaño crítico, la larva deja de alimentarse, abandona el alimento y se inmoviliza en un lugar seco para iniciar el proceso de metamorfosis que dura otros 4-5 días. Durante este estadio la larva da lugar a una pupa, en la cual la gran mayoría de los tejidos larvales se destruyen para dar origen a las estructuras adultas -cabeza, alas, patas, ojos, antenas. Todas estas estructuras se generan a partir de una serie de primordios formados por una única capa celular y presentes desde la embriogénesis, llamados discos imaginales. Existe un tipo de disco imaginal que da origen a las alas, otro a las patas, otro a las antenas, y así sucesivamente para cada una de las estructuras del adulto. El ciclo de vida se completa cuando el adulto formado rompe el pupario y sale al exterior, siendo fértil aproximadamente desde 12 horas después de ocurrida la emergencia (FIGURA 1).

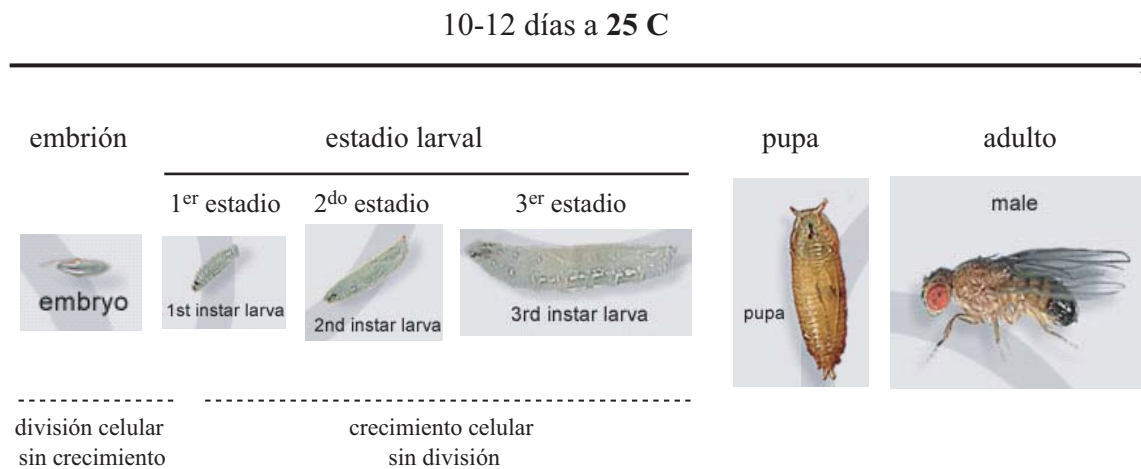


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Drosophila*. El ciclo de vida de *Drosophila* dura de 10 a 12 días a 25 grados. Las hembras ponen huevos fecundados de los que un día más tarde emergen larvas de primer estadio. Luego de pasar por el segundo y tercer estadio larval, la mosca comienza la metamorfosis dentro de un pupario inmóvil; el estadio pupal dura 4 días. Del pupario emerge finalmente el adulto que alcanza la madurez sexual 12 hs más tarde.

Dos curiosidades del ciclo de vida que serán relevantes durante la Tesis: **1.-** el cigoto original (UNA CÉLULA) tiene el mismo tamaño que la larva de primer estadio que emerge del huevo (formada por varias DECENAS DE MILES DE CÉLULAS), es decir que durante la embriogénesis las divisiones celulares se dan en detrimento del tamaño celular resultante: se generan más células, pero estas células son mucho más chicas. **2.-** durante el estadio larval se da el caso opuesto, ya que no hay prácticamente división celular pero sí un incremento dramático en el tamaño celular que lleva al crecimiento de la larva entera. De este modo, la larva crece no porque genera CÉLULAS ADICIONALES sino porque SUS CÉLULAS ORIGINALES son cada vez más y más grandes. Este crecimiento celular viene acompañado en muchos tejidos por rondas sucesivas de replicación del DNA en ausencia de división celular, dando origen a núcleos con varias centenas o hasta miles de copias de su genoma organizados en cromosomas politénicos. Recién vuelve a haber división celular sobre el final del 3er estadio larval y en el principio de la pupación, donde son los discos imaginales los que proliferan (aumentan en número de células) y se diferencian (las células generadas adoptan identidades particulares) para dar lugar a las estructuras adultas especializadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MANTENIMIENTO DE STOCKS

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis, se mantuvieron en medio de crecimiento estándar a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico (Ashburner, 1989). Los stocks se mantuvieron en viales de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de alto, y los mismos viales se utilizaron en los experimentos de sobrevivencia y crecimiento. Para la amplificación de líneas de interés, se utilizaron botellas de mayor capacidad (aproximadamente 250 cm³) conteniendo el mismo medio de cultivo. El laboratorio cuenta con incubadoras que mantienen condiciones controladas de temperatura para el mantenimiento de las líneas. De acuerdo con los requerimientos de cada experimento los viales o botellas fueron mantenidos a 25°C o 18°C, pudiendo incubarlos por períodos cortos a 29°C o 37°C (condiciones de *heat shock*) para diferentes tratamientos.

2.- LÍNEAS DE MOSCAS UTILIZADAS

2.1 MUTANTES.

- ❖ *fga*⁰²²⁵⁵ y *sima*¹²¹⁶² (obtenidas del Bloomington Stock Center)
- ❖ *sima*^{KG07607} (obtenidas del Laboratorio de Hugo Bellen, Baylor College of Medicine, Houston, USA)
- ❖ *bt*^{H82} y *bt*^{H82Δ 3} (Klambt et al., 1992)(cedidas por el laboratorio de Benny Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)
- ❖ Stock Completo de Deleciones Cromosómicas de Bloomington (obtenidas del Bloomington Stock Center y listado en <http://flystocks.bio.indiana.edu/df-kit.htm>)

2.2 REPORTEROS TRANSCRIPCIONALES.

- ❖ *ldhLacZ* y *2xldhGAL4UASGFP-LacZ_n* (generados previamente en el laboratorio, descritos en (Lavista-Llanos et al., 2002))
- ❖ *bnl*^{P2} (Sutherland et al., 1996)
- ❖ *prnd*¹ (Guillemin et al., 1996)
- ❖ *bt*^{H82Δ 3} (Klambt et al., 1992)

2.3 LÍNEAS GAL4.

- ❖ *69BGAL4*, *act-FRTCD2FRT-GAL4* (obtenidas del Bloomington Stock Center)
- ❖ *hsGAL4* (Ruberte et al., 1995)
- ❖ *TermGAL4* (Jarecki et al., 1999)
- ❖ *enGAL4* (cedida por Ana Macías, Universidad Nacional de Córdoba)
- ❖ *btGAL4* (Shiga, 1996)

2.4 LÍNEAS UAS.

- ❖ *UASSima* y *UASSimaP850* (generadas previamente en el laboratorio)
- ❖ *UASBtl*, *UASBnl* (cedidas por Markus Affolter, Universidad de Basel, Suiza)
- ❖ *UASCD8GFP*, *UASTauGFP*, *UASTrh*, *UASSim* (cedidas por Benny Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)

2.5 OTRAS LÍNEAS:

Δ 2-3 Transposasa; *hsFLP*; *Xa/CyO(blue)*; *Xa/TM3Sb(blue)*; *Xa/TM3Ser ry*; *C(1)DX, y f/FM7 actGFP*; *Xa/CyO actGFP*; *Xa/TM3Ser actGFP*; *Xa/TM6B* (todas obtenidas del Bloomington Stock Center).

3.- GENÉTICA

3.1 GENERACIÓN DE MUTANTES *fga*.

La inserción *l(3)02255* fue removida del locus *fatiga* mediante la expresión de una forma activa de la Transposasa Δ 2-3. Brevemente, mutantes heterocigotas *fga*⁰²²⁵⁵/*TM3* fueron cruzados con la línea Δ 2-3 *Trp/TM3*, luego cruzadas con *Xa/TM3* y los machos resultantes sin el marcador fenotípico del elemento P *l(3)02255* (ojos *rosy*) se utilizaron individualmente para establecer líneas independientes. Estas líneas se testearon por letalidad contra la delección *Df(3R)3-4*. Las líneas letales sobre esta delección, candidatas a mutantes *fga*, fueron caracterizadas molecularmente mediante ensayos de PCR sobre DNA genómico y ensayos de Southern blot, analizando la región genómica cercana a la inserción original.

3.2 GENERACIÓN DE REVERTANTES DE LAS MUTACIONES DE *fga* Y *sima*.

Las mutantes insercionales *fga*⁰²²⁵⁵/*TM3* y *sima*^{KG07607}/*TM3* fueron cruzadas por una línea que expresa la Transposasa Δ 2-3 del modo que se describió en el punto anterior, sólo que se seleccionaron los machos que hubieran perdido el marcador del transposón (*rosy* para mutantes *fga* y *white yellow* para mutantes *sima*) y que fueran viables sobre delecciones ó mutaciones que comprometían a cada uno de los genes en cuestión.

3.3 GENERACIÓN DE RECOMBINANTES *fga*¹ *sima*^{KG07607}.

Mutantes heterocigotas *fga*¹/*TM3* y *sima*^{KG07607}/*TM3* fueron cruzados entre sí y hembras de la progenie se cruzaron por *Xa/TM3*. Los machos resultantes con ojos de color rojo y cuerpo marrón que revelaban la presencia de la mutación *sima*^{KG07607} fueron seleccionados. La presencia de *fga*¹ se confirmó mediante ensayos de letalidad contra la delección *Df(3R)3-4* y molecularmente por Southern blot sobre DNA genómico.

3.4 GENERACIÓN DE CLONES DE HIPEREXPRESIÓN DE SIMA EN TEJIDOS ENDORREPLICATIVOS.

Para los experimentos de *flip-out*, moscas *hsFLP*; *act-FRTCD2FRT-Gal4* fueron cruzadas con moscas *UASGFP* (control) o con individuos recombinantes *UASGFP UASSima* (ver ANEXO 4). A los

embriones resultantes se los sometió a un *heat shock* durante 15 minutos a 37°C, y se los dejó desarrollar hasta el tercer estadio larval. Las larvas positivas para la expresión de GFP fueron elegidas para la disección de tejidos endorreproductivos. El cuerpo gordo, las glándulas salivales y los proventrículos fueron fijados en 4% paraformaldehído, teñidos con Dapi y/o faloidina, montados en Glicerol 40% en PT (1x PBS, 0,1% Triton X-100) y observados bajo el microscopio de fluorescencia.

3.4.1 TINCIONES CON DAPI: las glándulas salivales, los proventrículos y los cuerpos gordos se incubaron en DAPI (Molecular Probes) 1µg/µl en PT durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se lavaron luego con PT (5-6 lavados de 10 minutos) y se almacenaron en glicerol 40% en PT.

3.4.2 TINCIONES CON FALLOIDINA-TRITC: Para marcar los contornos celulares, los cuerpos gordos fueron fijados durante 10 minutos en 1:1 Heptano/Formaldehído 8% en PTW (PBS 1x, Tween 20 0,1%), lavados con PTW e incubados con Phalloidina-TRITC (SIGMA) 1µM en PTW durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Las muestras se lavaron luego con PTW (5-6 lavados de 20 minutos en total) y se almacenaron en glicerol 40% en PTW.

3.5 EXPRESIÓN DE SIMA EN TRÁQUEAS DE LARVAS DE TERCER ESTADIO.

Moscas *btGal4*, *tubGal80^{ts}* fueron cruzadas con moscas *UASSima* y se permitió la ovipuesta a 18°C. Las larvas resultantes fueron crecidas a 18°C hasta llegar al 2^{do} estadio y se administraron *heat shocks* diarios de 20 minutos a 30°C. Larvas de 3^{er} estadio fueron retiradas del alimento, anestesiadas con éter etílico y observadas bajo el microscopio de campo claro para analizar el árbol traqueal.

4.- ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO Y LA SOBREVIVENCIA.

Típicamente, 50-100 moscas de los genotipos de interés fueron colocadas en vasos de ovipuesta, y cada 6-8 horas se colectaron embriones. Entre 40 y 60 larvas de 1^{er} estadio que emergieron, fueron transferidas a viales con alimento fresco.

4.1 SOBREVIVENCIA DE MUTANTES *sima* EN HIPOXIA Y EN NORMOXIA.

Viales conteniendo 50 larvas salvajes o mutantes *sima* de primer estadio fueron colocadas a 21% ó 5% O₂. Las larvas se dejaron desarrollar hasta estadios pupales y las pupas resultantes fueron contadas diariamente entre los días 5 y 10 posteriores a la ovipuesta.

4.2 SOBREVIVENCIA DE MUTANTES *fga sima*.

Larvas homocigotas *fga sima* y heterocigotas *fga sima/TM3GFP* fueron colocadas en viales independientes y dejadas desarrollar hasta estadios adultos. Se contaron tanto las pupas resultantes como los adultos que emergieron de ellas para cada uno de los genotipos.

4.3 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES *fga* Y LOS DOBLE MUTANTES *fga sima*.

Larvas de 1^{er} estadio de genotipos *fga*⁹, *fga sima* y controles salvajes fueron colocadas en viales como se describió previamente. Para medir la duración de los estadios larvales de los distintos genotipos, se contaron las pupas resultantes hasta los 10 días posteriores al comienzo del experimento. Para los experimentos donde se analizaron los efectos sobre el peso corporal, las pupas fueron pesadas 24 horas después de abandonar el alimento. Se utilizó una balanza electrónica de precisión Mettler AE 240 para pesar pupas individuales o en grupos de 3 individuos.

5.- TRATAMIENTOS DE HIPOXIA.

Para analizar los efectos de la hipoxia tanto en larvas como en embriones, se utilizó un incubador Forma Scientific 3131 que permite regular los niveles relativos de oxígeno. Los porcentajes de Oxígeno utilizados fueron 5% ó 3% según el experimento, y se completaron con 95% ó 97% de Nitrógeno, respectivamente.

6.- ANÁLISIS DE FENOTIPOS TRAQUEALES EN LARVAS DE TERCER ESTADIO.

Larvas de primer estadio fueron colocadas en números controlados en viales y dejadas desarrollar hasta el último día del tercer estadio a 21% o 5% O₂, dependiendo del experimento. Las larvas fueron retiradas del alimento manualmente o por flotación en NaCl 6%, lavadas con PBS 1x y luego anestesiadas con éter etílico. Las larvas fueron luego montadas en glicerol 40% en PT y observadas al microscopio de campo claro. Las fotos fueron tomadas con una cámara digital CoolSnap Pro utilizando el software Image PRO-Plus 5.1 y luego editadas en Adobe Photoshop 7.0.

7.- EXPERIMENTOS DE SILENCIAMIENTO POR *dsRNA* EN EMBRIONES

7.1 GENERACIÓN *dsRNA* PARA *fatiga*.

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al ORF (marco abierto de lectura) entero de *fgaB* (1014 bp) utilizando como templado el EST GH23732. Los *primers* utilizados (A y B, ver final del párrafo) presentaban en sus extremos sitios de reconocimiento de la RNA Pol del fago T7, de modo que no se necesitaron subclonados posteriores para la síntesis del *dsRNA* (RNA doble cadena). Los fragmentos obtenidos por PCR se purificaron utilizando columnas GFX (Amersham). La reacción de síntesis de *dsRNA* se llevó a cabo durante 4 hs a 37°C en buffer T7 1x (Boeringer), mezcla de rNTPs 1 mM, 15 a 20 unidades de RNA polimerasa T7 (Boeringer) y como templado, 1µg del producto de PCR correspondiente al gen *fga*. Los productos se purificaron por precipitación con etanol con 80mM LiCl a -20°C; seguidamente fueron resuspendidos en buffer de inyección (5mM KCl, 10mM NaH₂PO₄ pH7.8) y se corrió una alícuota en un gel de agarosa 1% para chequear su integridad.

A: 5' GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAACAACAAGCAAAAAGCGATCCG 3'

B: 5' GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAAACCCGTTCTTGTCATCCG 3'

A y B: Oligonucleótidos para amplificar la región codificante de *fga*, conteniendo en los extremos sitios para la RNA Polimerasa T7 (subrayados).

7.2 INYECCIÓN DE *dsRNA* EN EMBRIONES.

Embriones decorionados de menos de 30 minutos de edad, homocigotas para el reportero *2xldhGAL4*, fueron inyectados con unos pocos fentolitros de una solución 0,2µg/µl de *dsRNA* en estadios previos a la celularización. Los embriones fueron colocados a 25 °C y el encendido del reportero se analizó 16 horas luego de la ovipuesta bajo el microscopio de fluorescencia. Para los experimentos analizando la presencia de Sima, los embriones fueron fijados y teñidos según se detalla en esta misma sección.

8.- GENERACIÓN DE LÍNEAS DE MOSCAS TRANSGÉNICAS

8.1 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES *UASFGA*.

Los transcritos de cada una de las isoformas fueron escindidos de los ESTs originales con distintas enzimas de restricción y clonados en sitios compatibles en el vector de expresión pCaSpeR (*UAS*) utilizando 0,2 unidades de Ligasa T4 (Promega, NEB). Se utilizaron las enzimas BglII-XhoI sobre el EST LD24638 (*fgaA*) y EagI-KpnI sobre RE46201 (*fgaC*) y los fragmentos liberados fueron clonados en sitios idénticos del vector pCaSpeR. Para *fgaB*, se utilizaron los sitios BamHI y XhoI sobre el EST GH23732 y el fragmento correspondiente fue clonado en los sitios BglII y XhoI del plásmido pCaSpeR-*UAS*.

8.2 INYECCIÓN DE EMBRIONES.

Para generar las líneas de moscas transgénicas se inyectaron varios cientos de embriones de genotipo *yw* (no más de 30 minutos luego de la ovipuesta) con una solución conteniendo 0,4µg/µl de la construcción de interés (*UASFGaA* ó *B* ó *C*) y 0,25µg/µl de un plásmido *Helper* que codifica la Trasposasa, en buffer de inyección (5mM KCl, 0.5mM NaH₂PO₄ pH 7.8). Se procedió según Spradling, 1986 y Spradling and Rubin, 1982; brevemente, los embriones fueron inmovilizados sobre una cinta adhesiva de doble faz pegada sobre un porta objetos y luego cubiertos con aceite halocarbonado 700 (Sigma). La micro-inyección de DNA se llevó a cabo con capilares Narishige de 1mm de diámetro que fueron estirados en un estirador vertical Narishige PC-10. La inyección se realizó bajo un microscopio Olympus BH utilizando un microinyector Eppendorff 5246 en una habitación acondicionada a 18 °C. Los embriones se dejaron desarrollar a 18°C durante 48 horas y las larvas que emergieron fueron transferidas a un vial con alimento y dejadas desarrollar a 25°C. Los adultos obtenidos fueron cruzados en forma individual con moscas *yw*. A partir de la progenie de estos cruzamientos se seleccionaron individuos con el marcador del transgen, típicamente ojos rojos, los cuales se utilizaron como fundadores de líneas transgénicas.

9.- BIOLOGÍA MOLECULAR

9.1 RT-PCR.

Moscas de los distintos estadios del ciclo de vida (embriones, larvas de 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} estadio, pupas y adultos) fueron homogeneizadas en Trizol (Life Technologies) para la obtención de RNA total. 1 a 5µg de RNA fueron utilizados como templado para la síntesis de DNA copia (cDNA) utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), siguiéndose el protocolo recomendado por el fabricante. El cDNA resultante fue utilizado como templado de reacciones de PCR, en las que se emplearon oligonucléidos que permitían la individualización de cada uno de los transcritos de *fga*. Los *primers* utilizados fueron:

*fgaA***FOR**: 5' CAATGAGCAGGGGTCGCG 3'

*fgaBC***FOR**: 5' ACGAGTGCGGTTTCGGTTC 3'

*fgaABC***REV**: 5' TCCTGCGTTGTACATGCTTC 3'

9.2 RT-PCR SEMICUANTITATIVA.

La extracción de RNA y síntesis del cDNA se realizó igual que en el punto previo. El cDNA se sintetizó a partir de 5µg de RNA total en reacciones de 20µl de volumen que fueron luego llevados a 200µl; alícuotas de 2 µl se tomaron como templado para reacciones de PCR. Se llevaron a cabo reacciones con diferentes números de ciclos de amplificación (23, 26, 29 y 32) y el análisis cuantitativo se realizó en la fase exponencial de la reacción utilizando actina 42A como control interno para normalizar. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl y los *primers* utilizados para cada gen fueron:

*SC-fgaB***FOR**: 5' GAACTTTTGGACAAGCGTGAG 3'

*SC-fgaC***FOR**: 5' ATATAATATAACCGCCGGTTGAG 3'

*fgaABC***REV**: 5' TCCTGCGTTGTACATGCTTC 3'

9.3 ENSAYOS DE SOUTHERN BLOT.

Sesenta moscas adultas de los genotipos de interés (*fga*⁰²²⁵⁵, *fga*¹, *fga*⁹, *fga*⁶⁴ -todas ellas heterocigotas- y controles salvajes) fueron trituradas manualmente en un tubo *eppendorf* con émbolo de plástico y utilizadas para la extracción de DNA genómico según Huang et al., 2000. Cinco a diez µg de DNA fueron digeridos a 37°C durante 16 hs con distintas enzimas de restricción (EcoRI, SalI, BamHI, PstI, AflII, EagI de NEB, Promega o Gibco) y el producto de digestión fue sembrado en un gel de agarosa 0,8% en Buffer TBE 1x. La electroforesis se realizó durante 6 horas a 120 Voltios o 16 horas a 40 Voltios. El gel fue transferido a membranas Zeta-Probe GT (BIO-RAD Laboratorios, Hercules, CA, USA) por capilaridad, en buffer SSC 10x según Sambrook and David (2001). Fragmentos de DNA flanqueantes a la zona de inserción del elemento P y de distintas regiones del locus *fga* fueron marcadas con ³²P y utilizadas como sondas para hibridizar

las membranas. Los resultados fueron analizados en un Phosphoimager Store 840 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

9.4 ENSAYOS DE NORTHERN BLOT PARA *sima*^{KG07607}.

Se extrajo RNA total de moscas salvajes y homocigotas *sima*^{KG07607} utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Veinticinco µg de cada RNA fueron sembrados en geles de agarosa conteniendo formaldehído, transferidas a membranas Zeta-Probe GT (BIO-RAD) e hibridizadas con sondas para *sima* o *actina42A*, previamente marcadas con ³²P. Los resultados fueron analizados en un Phosphoimager Store 840 (Molecular Dynamics).

10.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE β-GALACTOSIDASA

Para realizar ensayos cuantitativos de actividad β-galactosidasa se procedió según Zwiebel et al., 1991. Brevemente, larvas de tercer estadio que portaban *enhancer traps* del gen *btl*, junto con larvas control, fueron homogeneizados en 200 µl de buffer de lisis [50mM Tris HCl pH 7.8; 2mM EDTA; 10% glicerol; 2mM DTT; 1% Tritón X-100; 1mM PMSF] en un Potter vidrio-teflón y el homogenato fue centrifugado a 2500 x g durante 3 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó su concentración de proteínas utilizando el Kit de ácido bicinonínico (Sigma). La reacción enzimática se llevó a cabo incubando 20µl de extracto (conteniendo 20-100µg de proteína) con 180µl de buffer de reacción (80mM Na₃PO₄ pH7.3; 102mM β-mercaptoetanol; 9mM MgCl₂) con 4mM Rojo Clorofenol β-D-galactopiranosido (CPRG) (Roche Diagnostics, Mannheim). La reacción fue desarrollada en la oscuridad durante 30, 60, 120 o 160 minutos y se midió absorbancia a 550nm.

11.- HIBRIDIZACIÓN *IN SITU* DE RNAs MENSAJEROS.

11.1 SÍNTESIS DE SONDAS.

Las sondas para los distintos transcritos de *fga* fueron sintetizadas utilizando rUTP marcado con Digoxigenina (DIG). Como templado se utilizaron productos de PCR en los que el *primer* reverso contenía el promotor de la RNA Pol T7. El fragmento de PCR fue purificado por columna (GFX™ Amersham Bioscience) y las sondas se sintetizaron a partir de 1µg de templado utilizando el kit *DIG RNA probe* (Roche). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, en presencia de una mezcla de ribonucleótidos marcados con DIGoxigenina-11-UTP (10 mM (ATP, CTP, GTP), 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP, pH 7.5), inhibidor de RNasa (RNasin, Biolabs, 20 unidades/µl) y la RNA Polimerasa del fago T7 (20 unidades/µl) (Roche Diagnostics), durante 2 horas a 37°C. Una alícuota del producto de reacción se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, en un documentador de geles con luz UV. El producto de reacción se precipitó en etanol (volumen final de 300µl) con 80mM LiCl, 5mM EDTA y 0.1mg/ml tRNA y se resuspendió en 10µl H₂O DEPC para su almacenamiento a -20°C.

11.2 HIBRIDIZACIÓN DE LA SONDA EN EMBRIONES.

Embriones de genotipos *yw*, *enGal4 UASSima*, *enGal4 UASFGaA*, *enGal4 UASFGaB* o *enGal4 UASFGaC*, fueron decorionados y fijados en un tubo *ependorf* conteniendo 1:1 n-heptano:fijador [formaldehído 10% en PBS] durante 20-30 minutos a temperatura ambiente con agitación. A los embriones se les quitó la membrana vitelina con metanol, luego se los re-hidrató con diluciones seriadas de MetOH-PTW [1xPBS, 0.1% Tween 20] hasta llegar a 100% PTW. Los embriones fueron fijados nuevamente durante 20 minutos en 5% de formaldehído en PTW y luego de 6 lavados de 2 minutos en PTW, fueron lavados durante 5 minutos en 1:1 PTW:solución de hibridización (50% formamida, 5X SSC, 50µg/ml heparina, 0.1% Tween 20), a la que se le agregó 1mg/ml tRNA (Sigma) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón (Sigma). Los embriones se pre-hibridizaron durante 1 hora (mínimo) en solución de hibridización 100% a 50°C con agitación y luego se hibridizaron en 100 µl de solución de hibridización conteniendo la sonda (1µl de sonda marcada en 100µl de solución), durante toda la noche a 50°C con agitación. Los embriones se lavaron una vez durante 10 minutos en 750µl de solución de hibridización a 50°C, luego 10 minutos en 1:1 solución de hibridización:PTW a 50°C y posteriormente se realizaron cinco lavados durante 15 minutos en PTW a 50°C. Finalmente, los embriones fueron lavados una última vez en PTW a temperatura ambiente y luego se bloqueó con 10% Suero de Oveja en PTW durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer, Mannheim) diluido 1/3000 a 4°C durante toda la noche. Luego de dos lavados con PTW los embriones fueron incubados con 250µl de solución de tinción (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris 9.5, 0.1% Tween 20 en H₂O DEPC) conteniendo 5µl del sustrato NBT/BCIP (18.75mg/ml NBT y 9.4mg/ml BCIP en 67 % dimetilsulfóxido (DMSO) v/v, Boehringer Mannheim). El desarrollo del color se monitoreó bajo lupa binocular y la reacción se frenó transfiriendo los embriones a PTW. Los embriones se lavaron dos veces en PTW durante 10 minutos y finalmente se incubaron en glicerol 70% en PTW a 4°C durante al menos 3 horas. El patrón de expresión resultante fue analizado y documentado bajo el microscopio de campo claro.

12.- ANTICUERPOS E INMUNO-TINCIONES.

12.1 FIJACIÓN Y TINCIÓN DE EMBRIONES.

Los embriones se colectaron en placas de ágar luego de ovipuestas sincronizadas u ovipuestas durante toda la noche (ON) y se dejaron envejecer hasta el estadio deseado. Luego fueron decorionados en lavandina comercial 50%, filtrados y enjuagados con agua destilada y luego transferidos a un tubo *ependorf* donde fueron fijados en una solución 1:1 heptano:fijador (3.7% formaldehído en PT -PBS1x, Triton 100x 0,1%) con agitación durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, el fijador (fase inferior) fue reemplazado por metanol y se removió la membrana vitelina de los embriones con agitación fuerte, enjuagando varias veces con metanol. Los embriones fueron luego re-hidratados incubándolos 5 minutos en 1:1 metanol:PT

y 5 minutos en PT. Luego, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) 10% en PT durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubados con el anticuerpo primario en PT (la dilución varía en cada caso) durante 4 horas a temperatura ambiente u ON a 4°C. El anticuerpo primario fue removido y se hicieron tres lavados con PT durante 20 minutos con agitación. Los anticuerpos secundarios conjugados a CyTM2 o CyTM3 fueron incubados en PT con 10% de suero normal de cabra a una dilución típicamente de 1:150 durante 2½ horas a temperatura ambiente. Luego de remover el anticuerpo secundario, los embriones fueron lavados otras tres veces en PT durante 20 minutos con agitación, y colocados en 400µl de glicerol 80% en PT a 4°C en la oscuridad durante al menos 4 horas. La observación se realizó en un microcopio de fluorescencia Olympus BX-60 o en un microscopio confocal Zeiss LSM5 Pascal.

12.2 ANTICUERPOS UTILIZADOS

12.2.1 PRIMARIOS

- ❖ Conejo o Ratón anti-β-Gal 1/200 a 1/1200 (Cappel, Mol.Probes, Sigma)
- ❖ Rata anti-Sima 1/150 (para visualizar la proteína endógena) y 1/400 (para la hiper-expresada) (Bacon et al., 1998).
- ❖ IgM Ratón monoclonal 2A12 1/7 (Developmental Studies Hybridoma Bank)
- ❖ Conejo o Ratón anti-GFP 1/1000 (Molecular Probes)
- ❖ IgG Ratón monoclonal anti-dSRF 1/150 (cedido por Benny Shilo)

12.2.2 SECUNDARIOS, salvo especificaciones particulares, todos los anticuerpos secundarios fueron de *Jackson Laboratories* y utilizados en diluciones 1/150.

- ❖ anti-Conejo conjugado a CyTM2
- ❖ anti-conejo conjugado a CyTM3
- ❖ anti-rata conjugado a CyTM2
- ❖ anti-rata conjugado a CyTM3
- ❖ anti-IgG de ratón conjugado a CyTM5
- ❖ anti-IgG de ratón conjugado a CyTM3
- ❖ anti-IgM de ratón biotinilado + streptavidina conjugado a CyTM2 ó streptavidina conjugado a CyTM3

CAPÍTULO PRIMERO

FATIGA ES EL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO DE *Drosophila*

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 UN GEN INDUCIBLE POR HIPOXIA.

La historia que llevó a la identificación de la maquinaria celular de **SENSADO Y RESPUESTA A HIPOXIA** no puede ser contada sin hacer referencia a la Eritropoietina (EPO). La EPO es una hormona sintetizada y secretada por el riñón que funciona aumentando la producción y liberación de glóbulos rojos al sistema circulatorio. Ya desde principios del siglo XX se sabía que existía un factor circulante en sangre que podía aumentar la producción de esas células sanguíneas. Experimentos clásicos de Carnot en 1906 revelaron que si un conejo era inyectado con sangre de otro conejo anémico, el recuento de eritrocitos del conejo inyectado aumentaba notoriamente, postulándose la existencia de una posible *hemopoyetina* inducida por anemia que estimulaba la producción de glóbulos rojos (Carnot and Deflandre, 1906). La hormona se identificó alrededor de medio siglo más tarde, su acción general fue establecida y desde entonces se la conoce como Eritropoietina (Erslev, 1953; Jacobson, 1957; Reissmann, 1950). El gen codificante para Epo fue simultáneamente clonado por dos grupos en el año 1985 (Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985), lo que constituyó el punto de inicio para los estudios moleculares que prosiguieron. Puntualmente, con el gen identificado sería posible el estudio de los mecanismos que llevaban a su inducción por hipoxia, sospechada desde hacía más de un siglo pero recién demostrada poco tiempo antes (Bert, 1882; Goldberg et al., 1988; Kurtz et al., 1983; Ogle et al., 1978). Fue esto, de hecho, lo que llevó al particular orden en el que los componentes celulares de la respuesta transcripcional a hipoxia se fueron descubriendo: primero un **GEN INDUCIBLE POR HIPOXIA**, luego el **FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RESPONSABLE** de esa inducción, más tarde la **REGULACIÓN** que ocurre **SOBRE ESE FACTOR** y por último **EL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO**. La idea de esta introducción es hacer una breve reseña de cómo estos factores se fueron dando a conocer.

1.2 UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RESPONSABLE DE LA INDUCCIÓN POR HIPOXIA.

Una vez identificado el gen de la EPO, y sabiéndose que los niveles de expresión de esta hormona en riñón eran mayores en hipoxia que en normoxia, se iniciaron estudios moleculares con el objeto de identificar al Factor que inducía esta expresión diferencial. Fue recién en 1992 que el grupo de Gregg Semenza (de la *Johns Hopkins University School of Medicine*, Maryland, USA) identificó, mediante ensayos de movilidad retardada en geles utilizando oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del *enhancer* de la EPO humana, un factor nuclear que se unía a esas regiones regulatorias. Se determinó luego que la actividad y abundancia de dicho factor de transcripción son inducidas por hipoxia, por lo que lo denominaron HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) (Wang et al., 1995; Wang and Semenza, 1993a; Wang and Semenza, 1993b; Wang and Semenza, 1995). HIF fue caracterizado como un Factor de Transcripción de la familia bHLH-PAS, constituido por dos subunidades distintas, HIF- α y HIF- β de 120-KDa y 91-94-KDa respectivamente. El motivo HLH y el dominio PAS serían necesarios para la formación de heterodímeros y la región básica para la unión al DNA. La subunidad HIF-1 α fue identificada como una nueva proteína de esta familia, mientras que la subunidad HIF-1 β resultó ser idéntica a ARNT (aryl

hydrocarbon receptor nuclear translocator), una proteína previamente descrita como mediadora en la respuesta a agentes xenobióticos.

1.3 UNA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN CADA CÉLULA.

Estaba claro, entonces, que HIF-1 era el Factor de Transcripción cuya abundancia aumentaba en hipoxia y de esto dependía el aumento de la transcripción del gen *epo*. La sorpresa vino cuando, utilizando reporteros con el *enhancer* de *epo*, se detectó actividad de HIF-1 en hipoxia en todos los tipos celulares en los que se probó, aún en aquellos en los que *epo* no se expresa (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1993). HIF-1 era entonces no sólo un Factor que controlaba la expresión de *epo*, sino un componente de un mecanismo general de respuesta a hipoxia conservado en diversas líneas celulares (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1993). Pronto se describieron en estas líneas genes blanco endógenos de HIF-1, que compartían con *epo* una secuencia típica HRE (Hypoxic Response Element) en sus regiones regulatorias; de este modo, las secuencias HRE se convirtieron en herramientas útiles a la hora de construir reporteros genuinos de la actividad de HIF. Dentro de los genes que contenían estas secuencias y que, por ende, eran inducidos por HIF estaban la gran mayoría de las enzimas glicolíticas (Semenza et al., 1994) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Forsythe et al., 1996; Shweiki et al., 1992), que juega un rol central en la angiogénesis y la neovascularización. Estos resultados demostraron el rol de HIF-1 como mediador adaptativo de la respuesta a hipoxia y empezó a cobrar fuerza la noción de que la homeostasis de las células individuales (inducción en hipoxia de enzimas glicolíticas como fuente alternativa de energía para la célula), pero también la de los organismos completos (EPO y VEGF funcionan disparando respuestas relevantes a nivel organismo más que a nivel celular) dependería de la expresión diferencial de distintos genes en respuesta a variaciones en los niveles de oxígeno.

1.4 LA REGULACIÓN POR HIPOXIA DE HIF.

La identificación de un número creciente de genes blanco de HIF-1 hacía más relevante el estudio de cómo es que este factor se acumulaba en hipoxia. ¿Cómo se *traducía* la caída en los niveles de oxígeno en el aumento de HIF-1? Se demostró que tanto los niveles de los mRNAs de *hif-1 α* como de *hif-1 β* no variaban en hipoxia respecto de normoxia. La subunidad HIF-1 β tampoco variaba sus niveles proteicos pero sí lo hacía la subunidad α : en hipoxia se acumulaba HIF-1 α , y si las células con altos niveles HIF-1 α eran reoxigenadas, los niveles de la proteína caían rápidamente (Huang et al., 1996). Estos resultados sugerían que la actividad reportada del complejo HIF-1 estaba regulada por algún mecanismo post-transcripcional que operaba sobre la subunidad α , probablemente involucrando un control sobre la estabilidad de la proteína. De hecho, experimentos utilizando inhibidores del proteasoma (un complejo multiproteico que degrada proteínas previamente marcadas con ubiquitina) revelaron que HIF-1 se acumulaba aún en condiciones de normoxia (Salceda and Caro, 1997). Experimentos complementarios demostraron que la subunidad HIF-1 α se encontraba ubiquitinada en cultivos crecidos en normoxia, pero no en cultivos crecidos en hipoxia (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Así, el modelo contemplaba

la ubiquitinación y subsiguiente destrucción de HIF-1 α en normoxia, mientras que en hipoxia la ubiquitinación no ocurría y la proteína se acumulaba. Pero, ¿por qué la proteína se ubiquitinaba únicamente en normoxia? y aparte, ¿cuál era el factor responsable de esa ubiquitinación? La respuesta a esta segunda pregunta llegó en el año 1999 cuando el grupo de Peter Ratcliffe de la Universidad de Oxford, en el Reino Unido, demostró que la proteína VHL (por *von Hippel-Lindau*) funcionaba como la subunidad de reconocimiento de un complejo E3 ubiquitina ligasa que marcaba a HIF-1 α para su degradación en normoxia (Maxwell et al., 1999). VHL era conocida por ser causal, en familias en las que se encuentra mutada, de la enfermedad de von Hippel-Lindau, caracterizada por la aparición de tumores altamente vascularizados y por un sobre-recuento de glóbulos rojos. Previamente se había descrito que líneas celulares aisladas de estos pacientes presentaban altos niveles de VEGF (Kaelin et al., 1998) y también de enzimas glucolíticas. Comenzó a sospecharse, entonces, una relación más general entre VHL y los genes cuyos niveles estaban aumentados en hipoxia y de hecho, se demostró que VHL era capaz de suprimir la actividad transcripcional sobre HREs en normoxia pero no en hipoxia. Finalmente, se demostró la interacción física entre HIF-1 α y VHL mediante ensayos de coimmunoprecipitación llevados a cabo en células crecidas en normoxia (Maxwell et al., 1999); más adelante se vería que esta interacción no ocurría en células crecidas en hipoxia (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

1.5 UN DOMINIO DE DEGRADACIÓN DEPENDIENTE DE OXÍGENO EN HIF- α .

Paralelamente, se llevaron a cabo estudios de estructura-función sobre HIF-1 α con la intención de aislar el dominio que le otorgaba la mencionada estabilidad diferencial en hipoxia respecto de normoxia. Distintas regiones de la proteína fueron fusionadas a GAL4 y se analizó la estabilidad de cada una de estas quimeras. Así, se aisló una región central en HIF-1 α que confería a GAL4 estabilidad diferencial en hipoxia; cuando esa región fue removida de HIF-1 α la proteína perdió su regulación por oxígeno, siendo estable y activa tanto en normoxia como en hipoxia (Pugh et al., 1997). Esta región se denominó, por sus características particulares, dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) (Huang et al., 1998). Pronto se encontraron otras proteínas con un dominio central ODDD que podían funcionar como subunidad α de HIF y presentaban regulación por hipoxia; las distintas subunidades HIF- α se denominaron HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α (Wenger, 2002). Entonces, se había descubierto por un lado un dominio responsable de la degradación en normoxia de HIF-1 α -el ODDD-, y por el otro, una proteína (VHL) que reconocía a HIF-1 α permitiendo el marcado para su degradación. Era evidente que ambos eventos podían estar relacionados y en esa línea, se demostró que el ODDD era esencial para la interacción física entre HIF-1 α y VHL, ya que cuando era removido esa interacción se perdía (Huang et al., 1998; Tanimoto et al., 2000)(Figura 2).

1.6 NATURALEZA DEL SENSOR DE OXÍGENO

Había un interrogante que continuaba sin ser resuelto: ¿Qué es lo que determinaba que HIF fuera reconocida por VHL únicamente en normoxia y no en hipoxia? ¿Cómo influía el oxígeno en esa interacción? Experimentos realizados *in vitro* proporcionaron una herramienta muy útil

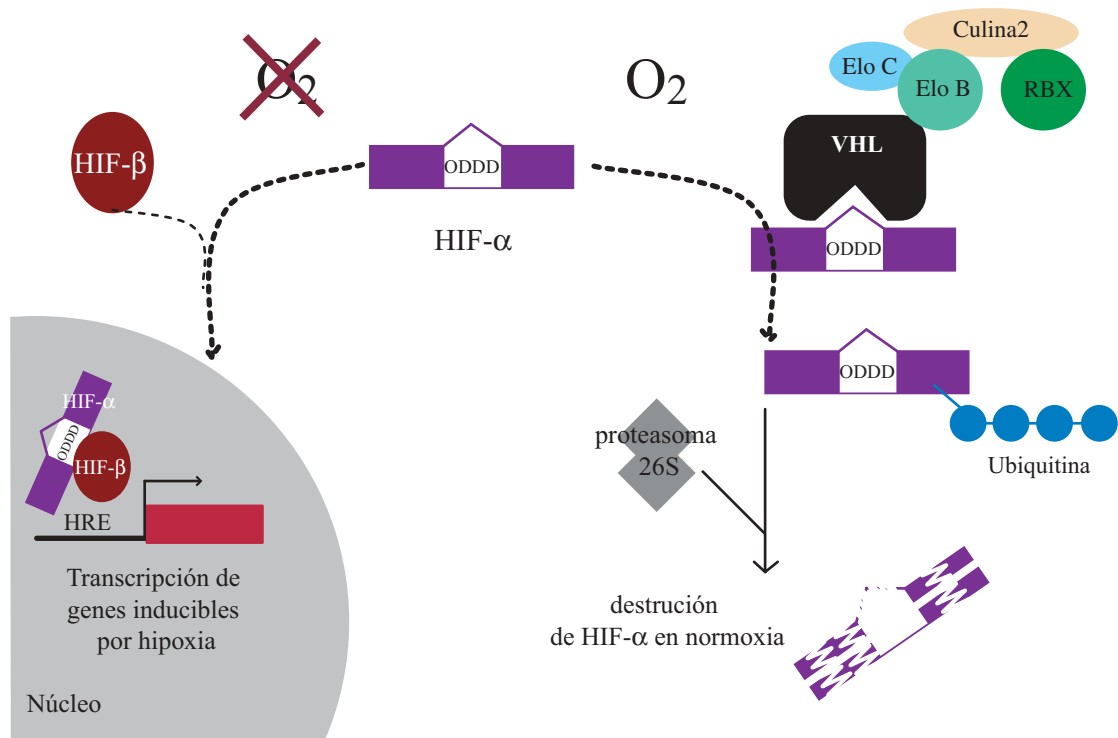


FIGURA 2. HIF- α se degrada en normoxia y se acumula en hipoxia. La proteína HIF- α se esquematiza con un dominio central ODDD. Si hay oxígeno disponible, HIF- α interactúa con VHL, unidad de reconocimiento de un complejo E3 ubiquitina ligasa formado por VHL, Cul1, Cul2 y Rbx. La interacción con el complejo resulta en la ubiquitinación y posterior destrucción de HIF- α por el proteasoma de 26S. Si no hay oxígeno, en cambio, HIF- α escapa a VHL, entra al núcleo, forma el heterodímero con HIF- β y transcribe genes blanco que poseen secuencias regulatorias HRE.

para analizar este evento, justamente por la naturaleza artificial de estos sistemas: cuando VHL y HIF-1 α eran generadas como proteínas recombinantes en *E. coli* ó en lisados de germen de trigo, la interacción entre ambas no ocurría. Ahora, si HIF-1 α recombinante se pre-incubaba con extractos celulares humanos, de ratón o de *Xenopus*, la interacción con VHL se restituía, dejando claro que había un componente celular regulando esta interacción (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Maxwell et al., 1999). Existían una serie de experimentos previos que permitían especular sobre la existencia de un Sensor de Oxígeno putativo e incluso sobre su posible naturaleza. En trabajos de fines de los 80's, células tratadas con el quelante de hierro desferrioxamina (DFO) o con iones cobalto resultaban en un aumento de los niveles de *epo*. La exposición a condiciones severas de hipoxia no inducía esta expresión aún más, indicando que probablemente la falta de oxígeno y estos agentes químicos estuvieran funcionando sobre un mismo proceso molecular (Goldberg et al., 1988). Más tarde se demostró que en células tratadas con DFO, HIF-1 α se encontraba estabilizado y la interacción con VHL no se daba (Maxwell et al., 1999), de modo que tanto el DFO como el cobalto fueron tomados como análogos de hipoxia. El razonamiento inmediato fue que si estos agentes químicos eran interpretados por la célula del mismo modo que la falta de oxígeno, el Sensor de Oxígeno putativo debería de ser una Ferro-Proteína y quizás hasta una hemo-proteína (ya que el cobalto puede reemplazar al hierro en las proteínas).

Pese a las discusiones y especulaciones que se mantenían al respecto, se seguía ignorando en el inicio de esta Tesis la identidad y la naturaleza del Sensor Molecular de Oxígeno que controlaba en última instancia la estabilidad de HIF-1 α . El móvil original de este trabajo de investigación fue entonces la búsqueda del Sensor de Oxígeno. Decidimos llevar a cabo un acercamiento genético utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo experimental.

1.7 LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN *D. MELANOGASTER*.

Los primeros estudios en insectos analizando su capacidad de respuesta a bajos niveles de oxígeno ambiental fueron acercamientos fisiológicos. A mediados del siglo pasado ya se había reportado que los insectos eran capaces de adaptarse a cambios en la concentración de oxígeno disponible (Stemler and Hiestand, 1951). Más tarde se describió que estos cambios podían inducir alteraciones morfológicas en el desarrollo de *Drosophila*, por ejemplo la reducción en el tamaño observada en moscas crecidas en hipoxia respecto a controles mantenidos en normoxia (Palos and Blasko, 1979). Estos experimentos generaron la noción de que en insectos debía existir algún modo de dar cuenta del oxígeno disponible y también mecanismos celulares o fisiológicos que respondan ante esa condición adversa. Cuando se identificó HIF-1 en células de mamíferos, diversos grupos se dedicaron a estudiar si la existencia del complejo, y las respuestas adaptativas disparadas por este Factor de Transcripción, estaban conservadas en distintos *phyla*. Se demostró rápidamente que en extractos de *Drosophila* existía un complejo capaz de unirse a oligonucleótidos conteniendo secuencias de reconocimiento para HIF (HREs) murinos (Nagao et al., 1996), aquellas mismas secuencias que se habían encontrado en todos los genes de mamíferos inducibles por HIF. Ese mismo año se describió también en *Drosophila* la existencia de una proteína muy relacionada tanto con HIF-1 α como con otras proteínas bHLH-PAS de la mosca, a la cual se llamó Similar (Sima) (Nambu et al., 1996). Por la misma época se clonó Tango, una proteína bHLH-PAS que funcionaba como subunidad β de algunas de las bHLH-PAS conocidas al momento, como Single Minded, Tracheless y Sima (Sonnenfeld et al., 1997). Tango presentaba alta homología con ARNT, subunidad β del heterodímero HIF-1 de mamíferos y de este modo, Sima y Tango fueron propuestos como HIF-1 α y HIF-1 β en *Drosophila*, respectivamente (Bacon et al., 1998; Nambu et al., 1996; Sonnenfeld et al., 1997). Más tarde, estudios funcionales realizados mediante fusiones proteicas a GAL4 en los que se analizaba la estabilidad de las quimeras resultantes en normoxia y en hipoxia revelaron que Sima confería a Gal4 inducibilidad por hipoxia (Bacon et al., 1998). Más interesante aún, no sólo la hipoxia sino también quelantes de hierro como el DFO y el cobalto inducían esta respuesta diferencial, sugiriendo que podría existir un Sensor de Oxígeno de naturaleza similar al de mamíferos. Finalmente, nuestro laboratorio reportó que Sima funciona como el HIF-1 α de la mosca (Lavista-Llanos et al., 2002): su estabilidad proteica y no la abundancia de su mRNA es regulada por hipoxia, posee un ODDD funcional –que al ser removido hace que la proteína resultante sea estable aún en normoxia- y opera como Factor de Transcripción induciendo la expresión de genes reporteros cuyos *enhancers* poseen secuencias HRE. En ese trabajo se crearon dos líneas transgénicas (ver Anexo 1: GENERACIÓN DE LÍNEAS TRASGÉNICAS) que llevaban inserto en su genoma reporteros transcripcionales inducibles por hipoxia y por

Sima, basados en el promotor de la *lactato dehidrogenasa (ldh)* murino, un gen inducible por hipoxia y por HIF. Una de esas construcciones tenía como gen testigo a *lacZ* (que codifica para la β -Galactosidasa), de modo tal que la expresión de β -gal en líneas transgénicas que portan esta construcción revelaba los sitios donde había actividad transcripcional sobre los HREs (FIGURA 3A). Una segunda construcción incluía un dímero de la región HRE del mismo gen y dirigía la expresión de GAL4 como gen testigo (*2xldhGal4*) (ver Anexo 2: SISTEMA GAL4/UAS Y EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES). GAL4 es un potente factor de transcripción de levaduras que funciona sobre secuencias UAS (*upstream activating sequence*); estas secuencias no están presentes en *Drosophila* de modo que no existen blancos transcripcionales endógenos en la mosca. Para “leer” la actividad de GAL4 se hacen cruza genéticas con una segunda línea transgénica que contiene secuencias UAS dirigiendo la expresión de –en nuestro caso– una proteína verde fluorescente (GFP), resultando en un reportero cuyo genotipo completo es *2xldhGal4 UASGFP* (FIGURA 3B). Este segundo reportero es de especial utilidad para estudiar la respuesta transcripcional a hipoxia en individuos vivos, ya que la sola observación de GFP bajo el microscopio o la lupa de fluorescencia en embriones, larvas o adultos INTACTOS revela los lugares y los estadios del desarrollo en los que existe una respuesta transcripcional mediada por los HREs. Por incluir el *enhancer* duplicado de la *ldh* y debido a la amplificación de la respuesta otorgada por el sistema GAL4/UAS, este segundo reportero de hipoxia es mucho más sensible que el primero.

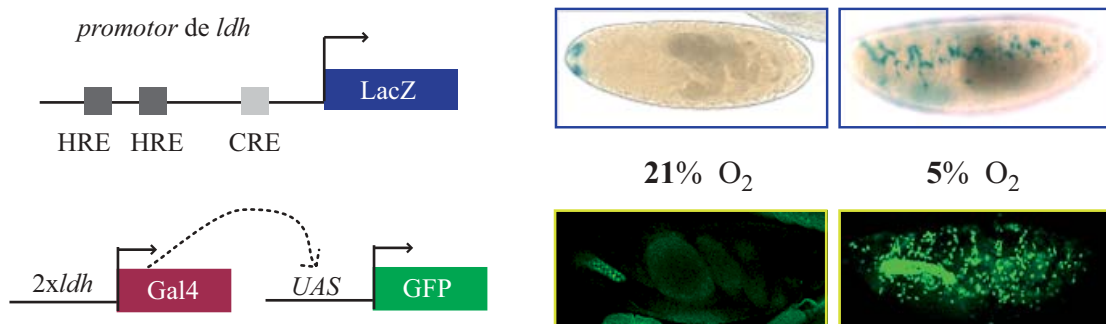


FIGURA 3. *Drosophila* monta una respuesta transcripcional a hipoxia. Los reporteros *ldhLacZ* y *2xldhGal4 UASGFP* ponen en evidencia la existencia en *Drosophila* de un Factor de Transcripción homólogo al HIF de mamíferos, que reconoce secuencias HRE en hipoxia. Embriones transgénicos para las construcciones descritas fueron colocados a 21% o 5% O₂ y teñidos con un anticuerpo anti- β Gal (en el caso de los *ldhLacZ*, A) o anti-GFP (para los *2xldhGal4 UASGFP*, B). Se observa la inducción de ambos reporteros en hipoxia.

El panorama en la mosca era similar al conocido en células de mamíferos: HIF-1 α /Sima se estabilizaba en hipoxia mediante algún mecanismo desconocido que involucraba una modificación en la zona central de la proteína, el dominio ODDD. Las incógnitas también se compartían: ¿Cómo un DESCENSO EN LOS NIVELES DE OXÍGENO impide que una proteína se degrade? ¿Cuál es la SEÑAL que causa esta estabilización diferencial? ¿Cuáles son los INTERMEDIARIOS CELULARES entre el oxígeno molecular y la estabilización de HIF-1 α /Sima? Estas preguntas fueron los móviles que dirigieron los experimentos que se mencionan a continuación.

2.- OBJETIVOS PARTICULARES

LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO DETALLADO EN ESTE CAPÍTULO SON:

2.1 ENCONTRAR EL SENSOR DE OXÍGENO EN *Drosophila melanogaster*

2.2 ESTUDIAR LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE ESTE SENSOR *IN VIVO* MEDIANTE ENSAYOS DE PÉRDIDA Y GANANCIA DE FUNCIÓN; GENERACIÓN DE MUTANTES Y LÍNEAS DE SOBRE-EXPRESIÓN.

3.- RESULTADOS

3.1 DISEÑO DE UN SCREEN DE MODIFICADORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA

El objetivo principal, al momento de comenzar la presente Tesis, era dar con la identidad del Sensor Molecular de Oxígeno. *Drosophila* proporcionaba un modelo ideal para su búsqueda dada la gran cantidad de colecciones de mutantes existentes y la facilidad para realizar experimentos genéticos *in vivo*. Dos elementos eran necesarios para encarar esta búsqueda mediante un rastreo genético: un REPORTERO TRANSCRIPCIONAL que dé cuenta de la falta de oxígeno (ya descrito en la introducción previa), y un CONJUNTO DE MUTANTES, -suficientemente amplio como para abarcar una cantidad significativa de genes, pero no tan amplio como para hacer irrealizable el experimento- en los cuales analizar el comportamiento de este reportero.

En *Drosophila*, el trabajo a gran escala con mutantes de distintos cromosomas a las que hay que agregarles construcciones de interés -en nuestro caso el reportero de hipoxia- se basa en la utilización de cromosomas balanceadores. En el Anexo 3: CROMOSOMAS BALANCEADORES se cuenta cómo surgieron y cuál es su utilidad a la hora de trabajar con mutantes letales.

3.1.1 LA HERRAMIENTA: UNA COLECCIÓN DE DELECCIONES CROMOSÓMICAS.

Los muchos años durante los que se ha estado utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo genético resultaron en un número varias veces milenario de mutantes disponibles. Existen varios centros donde estas mutantes se mantienen (Bloomington, Kyoto, Ehime, Szeged y Tucson), y de ellos se puede pedir el/los stock/s de interés. En el *Bloomington Stock Center* de la Universidad de Indiana existe una colección de deleciones cromosómicas (*Deficiency Kit*, <http://flystocks.bio.indiana.edu/df-kit.htm>) que consta de unas 200 líneas diferentes con grandes deleciones que abarcan varios cientos de *loci* cada una. En total, la sumatoria de todas la deleciones cromosómicas abarca el 80% del genoma de *Drosophila* (FIGURA 4).

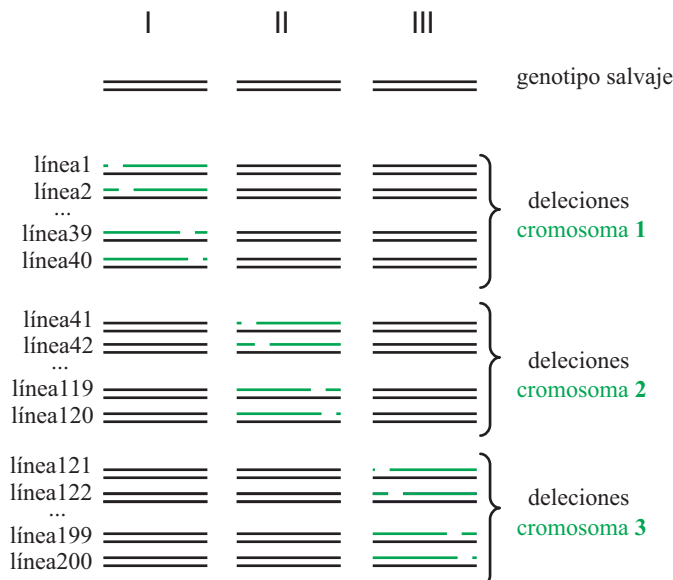


FIGURA 4. Colección de Deleciones Cromosómicas del Bloomington Stock Center. En el esquema están representados los distintos cromosomas de *Drosophila* (líneas enteras en negro). Los cromosomas afectados por cada una de las deleciones se muestran en verde, y las interrupciones en las líneas continuas esquematizan las deleciones. La colección de deleciones consta de aproximadamente 40 líneas para el cromosoma X, 80 para el cromosoma II y otras 80 para el cromosoma III.

La idea básica, entonces, consistía en testear la capacidad de respuesta a hipoxia de cada una de estas líneas que portan deleciones, utilizando el reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP*, con el objeto de individualizar regiones genómicas en las que se hallen reguladores de esta respuesta en *Drosophila*. Una inducción constitutiva del reportero en normoxia evidenciaría la presencia de un regulador negativo de la respuesta transcripcional a hipoxia dentro de la región abarcada por la deleción. Por el contrario, la imposibilidad de encender el reportero en hipoxia en otra de las líneas indicaría la presencia dentro de la zona genómica delecionada de un regulador positivo, indispensable para la respuesta a hipoxia.

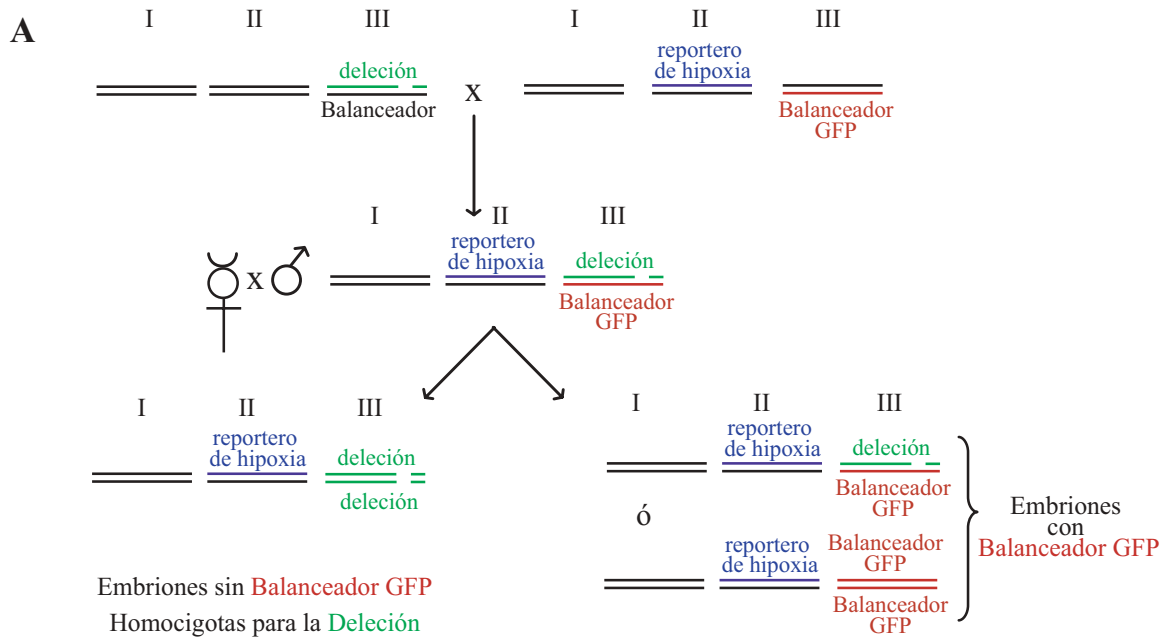
3.1.2 CRUZAMIENTOS GENÉTICOS PARA LOS DISTINTOS CROMOSOMAS.

La búsqueda de reguladores positivos y negativos se basaba en el análisis del reportero transcripcional de hipoxia en individuos homocigotas para las distintas deleciones cromosómicas. Dado que todas las líneas de esta colección de deleciones son letales en homocigocis, el análisis del reportero debía realizarse en estadios embrionarios. Deleciones que produjeran letalidad previa al estadio 14, que es el estadio más joven en el que se detecta inducción del reportero transcripcional por hipoxia, no podrían ser analizadas.

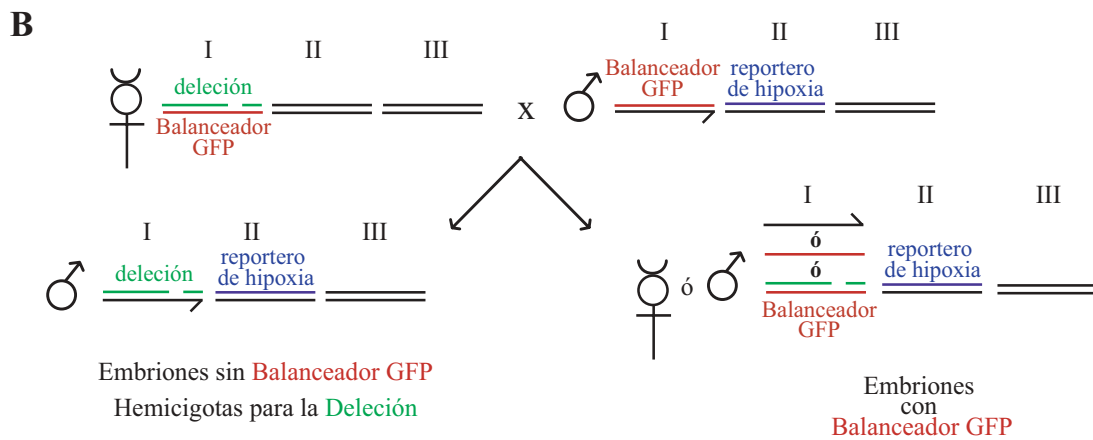
Para lograr embriones homocigotas para las distintas deleciones a analizar, que lleven además al menos una copia del reportero transcripcional de hipoxia, se procedió con el esquema de cruzamientos descrito en la FIGURA 5A. Brevemente, se cruzaron moscas que llevaban la construcción reportera *2xldhGal4 UASGFP* con moscas portando cada una de las deleciones cromosómicas (generación fundadora, F=0). Machos y hembras de la progenie (generación F=1) que llevasen el reportero y la deleción particular se cruzaron entre sí y el reportero se analizó en los embriones de esta nueva progenie (generación F=2). Este esquema se utilizó para los cromosomas II y III, mientras que para el cromosoma X (cromosoma I) se utilizó un esquema simplificado (FIGURA 5B). Dado que los machos presentan una única copia del cromosoma X, no era necesario un análisis en la F=2, sino que bastaba con analizar embriones machos de la F=1 que llevasen la deleción cromosómica en la única copia del cromosoma X (hemicigosis); estos machos representaban la mitad de los embriones que llevasen el reportero transcripcional.

3.1.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL CROMOSOMA X.

Dado que el análisis del cromosoma X era genéticamente el más sencillo y que requería la mitad del tiempo que el necesario para analizar los autosomas, fue el primero que se llevó a cabo. Cada una de las 40 líneas con deleciones en este cromosoma fue cruzada por la línea transgénica que llevaba el reportero transcripcional y la progenie fue analizada por microscopía de fluorescencia. Tres de las deleciones analizadas, (líneas 936, 940 y 3560, según numeración interna de *Bloomington Stock Center* en junio de 2000) presentaron un fenotipo característico de encendido del reportero en condiciones de normoxia, en una población de células ubicadas en la parte posterior de los embriones. Llamativamente, las deleciones abarcaban regiones del cromosoma X que no se solapaban. El fenotipo idéntico, entonces, podía deberse o bien a la disrupción de genes ubicados en distintos *loci* que estuvieran involucrados en un mismo proceso



Se analiza la expresión del Reportero en normoxia y en hipoxia



Se analiza la expresión del Reportero en normoxia y en hipoxia

FIGURA 5. Esquema de cruzamientos para la búsqueda de modificadores de la respuesta a hipoxia en cada uno de los cromosomas. El reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP* se colocó en el contexto genético de cada una de las deleciones del kit de deleciones cromosómicas, que deben estar contra un cromosoma balaceador marcado con GFP para permitir su identificación *in vivo*. **A.-** Esquema de cruzamientos para el tercer cromosoma. Las líneas que portan deleciones en el cromosoma III balanceadas contra GFP y con una copia del reportero de hipoxia en el cromosoma II (F_1) fueron cruzadas por sí mismas y los embriones resultantes fueron analizados para la expresión del reportero en normoxia y en hipoxia. Los individuos de la F_2 que no expresaban la GFP del balaceador fueron reconocidos como homocigotas para la deleción y en ellos se estudió la expresión del reportero en normoxia y en hipoxia. **B.-** ídem A, pero para deleciones en el cromosoma sexual. Se analizaron embriones resultantes de cruzar las líneas con deleciones balanceadas con GFP por moscas que llevaban el reportero transcripcional en el cromosoma II. Los embriones que no expresaban GFP eran machos hemizigotas para la deleción y en ellos se estudió la expresión del reportero en normoxia y en hipoxia.

celular/fisiológico, o bien a una mutación existente en las tres líneas, que fuera independiente de las deleciones genómicas. Un análisis genético detallado de estas tres líneas reveló que el cromosoma balanceador sobre el que se mantenían portaba ciertas mutaciones en común. Esto abría la posibilidad de que fuera alguna de las mutaciones presentes en el cromosoma balanceador y no la falta de los genes abarcados por las distintas deleciones cromosómicas la causa del fenotipo observado. De hecho, cuando el reportero se estudió en presencia del cromosoma balanceador -pero sin deleciones cromosómicas- se observó el mismo patrón de expresión del reportero en la parte posterior de los embriones (resultados no mostrados), asignándole entonces un rol causal a alguna de las mutaciones presentes en el cromosoma balanceador. Dada la complejidad estructural de este tipo de cromosomas, que incluye numerosas inversiones y/o duplicaciones cromosómicas y varias mutaciones génicas, no se prosiguió con la caracterización de estas líneas.

3.1.4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL CROMOSOMA 3.

Continuando con nuestro análisis, comenzamos con el estudio de las líneas con deleciones en el cromosoma III. De todas las deleciones genómicas analizadas, la Df(3R) 3-4 fue la que produjo un fenotipo más claro y reproducible. Embriones homocigotas para esta deleción presentaban en normoxia una clara expresión del reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP* (FIGURA 6), sugiriendo que en la zona cubierta por la deleción podría encontrarse un regulador negativo de esta respuesta transcripcional. La expresión constitutiva del reportero podía deberse a la falta de reguladores de naturaleza diversa, como por ejemplo represores de la transcripción mediada por Sima o moléculas involucradas en la degradación o el control de la vida media de Sima. Para comenzar a caracterizar funcionalmente esta respuesta alterada, decidimos realizar inmunotinciones con anticuerpos dirigidos contra la proteína Sima, que es indetectable en normoxia en embriones salvajes (FIGURA 6). Observamos que en embriones homocigotas para la deleción Df(3R) 3-4 la proteína Sima estaba estabilizada y era fácilmente detectable en las

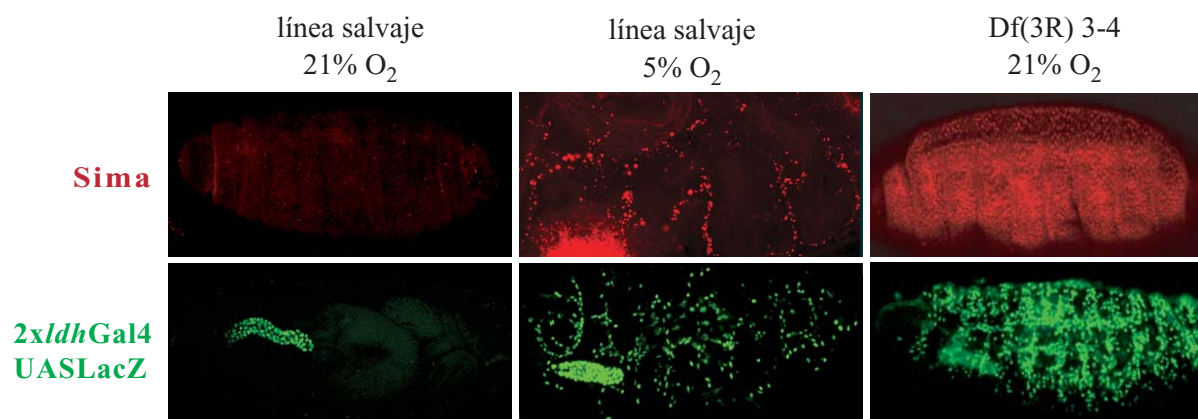


FIGURA 6. Embriones homocigotas para la deleción Df(3R)3-4 tienen desregulada la respuesta transcripcional a hipoxia. Embriones salvajes no expresan el reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP* en normoxia y la proteína Sima es indetectable. En hipoxia, el reportero se expresa en un patrón característico que se corresponde con el patrón en que Sima se estabiliza. Embriones homocigotas para la deleción Df(3R)3-4 presentan expresión ubicua y constitutiva del reportero y la proteína Sima aparece estabilizada en normoxia.

mismas células en las que se encendía el reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP* (FIGURA 6). Estos resultados sugerían fuertemente que dentro de la delección *Df(3R) 3-4* existía algún gen que participaba ya sea en la degradación de la proteína Sima, o en el marcado de la proteína previo a su degradación. Esta delección comprometía varias decenas de genes (FIGURA 7), muchos de los cuales estaban predichos pero no se tenía ningún tipo de información sobre ellos. El análisis subsiguiente consistiría entonces en analizar mutantes de cada uno de estos genes (estudiados o predichos por programas informáticos) con la intención de asignarle a un único gen el efecto observado en la expresión constitutiva del reportero transcripcional de hipoxia.

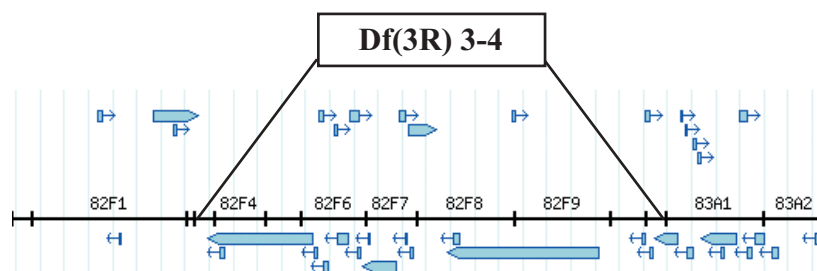


FIGURA 7. La delección *Df(3R) 3-4* abarca aproximadamente 30 genes predichos que se encuentran contenidos en la región 82F2-F10 del cromosoma III.

3.2 MUTANTES DEL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO PRESENTAN ALTERADA SU RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA.

3.2.1 IDENTIFICACIÓN DEL SENSOR DE OXÍGENO EN *Caenorhabditis elegans* Y SUS HOMÓLOGOS EN MAMÍFEROS.

En el transcurso de estos experimentos se produjeron avances significativos en el campo del sentido de oxígeno, dados a conocer en 2 publicaciones de los grupos de Peter Ratcliffe (con quien mantenemos una colaboración desde el año 1998) y William Kaelin (Jr.). Como ya se mencionó, la pregunta a responder en ese momento era: ¿qué modificación ó regulación ocurre sobre la molécula *HIF-1 α* que lleva a SU ESTABILIZACIÓN EN HIPOXIA y a SU DEGRADACIÓN EN NORMOXIA? La primer respuesta se dio a conocer en Abril de 2001 (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001): en normoxia, *HIF-1 α* sufría la HIDROXILACIÓN de 2 de sus prolinas (Pro 402 y Pro 564) dentro del ODDD y esta hidroxilación favorecía SU INTERACCIÓN CON VHL, proteína que reconocía a *HIF-1 α* para su ubiquitinación y posterior DEGRADACIÓN en el proteasoma. En hipoxia la hidroxilación en estas prolinas no se producía, de modo que *HIF-1 α* no era reconocido por VHL y por ende, no era degradado. Se esclarecía así cuál era el evento que regulaba la estabilidad diferencial de *HIF-1* en distintos niveles de oxígeno: la hidroxilación únicamente en normoxia de dos residuos de prolina en su subunidad α .

Aún cuando el avance proporcionado por estos datos fue inmenso, esto no respondía la pregunta original, sino que la llevaba un paso más arriba en la cascada de eventos: ¿qué es lo que hace que las prolinas clave se hidroxilen en normoxia pero no en hipoxia? En Octubre de ese mismo año, el grupo de Ratcliffe logró finalmente identificar la proli-hidroxilasa que modificaba a *HIF- α* en otro modelo genético sencillo, el gusano helminto *Caenorhabditis elegans*, mediante una aproximación que combinó la genómica funcional con análisis informáticos predictivos de estructuras (Epstein et

al., 2001). Brevemente, caracterizaron una respuesta transcripcional a hipoxia mediada por ceHIF-1 α y ceVHL en el gusano y por predicción de estructuras, identificaron posibles prolil hidroxilasas dentro de los genes predichos en el gusano (su genoma estaba completamente secuenciado desde 1998 (Consortium., 1998)). Gusanos mutantes para una de estas hidroxilasas, EGL-9, exhibían estabilización constitutiva de ceHIF-1 α y una respuesta a hipoxia activa aún en normoxia. A través de experimentos in vitro se observó que la proteína recombinante EGL-9 promovía la hidroxilación de al menos una prolina en ceHIF-1 que le permitía interactuar con ceVHL; se demostró que esta modificación dependía de 2-oxoglutarato (co-sustrato de la reacción), hierro, y oxígeno molecular, y que la enzima era inhibida directamente por cobalto (**FIGURA 8A**). En ese mismo trabajo, se identificaron 3 homólogos en Homo sapiens que compartían el mismo dominio catalítico los cuales fueron denominados PHD1, PHD2 y PHD3. Predicciones informáticas de estructura junto a datos de bibliografía con los que se contaba para enzimas similares (Hegg and Que, 1997; Schofield and Zhang, 1999) revelaron que estas dioxigenasas poseían una tríada catalítica de asociación a hierro (**FIGURA 8A**), explicando entonces por qué quelantes de este metal imitarían una condición de hipoxia. Cuando se expresaron estas enzimas de modo recombinante, se logró establecer una regulación gradual de su actividad en función del oxígeno disponible, por lo que las prolil-4-hidroxilasas que modifican a HIF- α fueron consideradas como verdaderos **SENSORES MOLECULARES DE OXÍGENO**. Estas enzimas constituyeron los primeros miembros de una nueva familia de proteínas con Dominios Prolil Hidroxilasa (PHDs), que utilizan ambos átomos del O₂ molecular para hidroxilar una prolina de HIF-1 α y una molécula de 2-oxoglutarato simultáneamente. No se puede dejar de notar un hecho sobresaliente de esta regulación: la reacción de hidroxilación es directamente dependiente de los niveles de O₂, ya que el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo que se agrega a la prolina proviene del oxígeno molecular. Con el descubrimiento de esta enzima, se estableció una relación directa entre los niveles de O₂ disponibles y el control de la regulación génica.

En resumen, el **SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO** consiste en una prolil-hidroxilasa que utiliza el Oxígeno Molecular y 2-oxoglutarato como sustratos, aparte de Fe⁺⁺ como co-factor. En condiciones de oxígeno normales (21% O₂, Normoxia), estas hidroxilasas operan sobre HIF- α y las prolinas hidroxiladas permiten la interacción con VHL y la posterior ubiquitinación y degradación. En hipoxia, cuando los niveles de Oxígeno Molecular están comprometidos, HIF- α escapa de la hidroxilación por parte de las PHDs, de modo tal que no es degradado y puede transactivar sus genes blanco en respuesta a hipoxia (**FIGURA 8B**).

La identificación de las prolil-4-hidroxilasas como reguladores fundamentales de la respuesta transcripcional a hipoxia traía aparejadas nuevas preguntas: ¿cuál era el patrón de expresión de estas enzimas en un individuo entero? ¿Cómo están reguladas en los distintos momentos de la vida de un individuo? ¿Qué funciones cumplen en los diferentes lugares y momentos del desarrollo? ¿Cuáles son las consecuencias de inactivar estos genes en organismos completos? Una vez más, la utilización de modelos genéticos sencillos para responder estos interrogantes parecía apropiada.

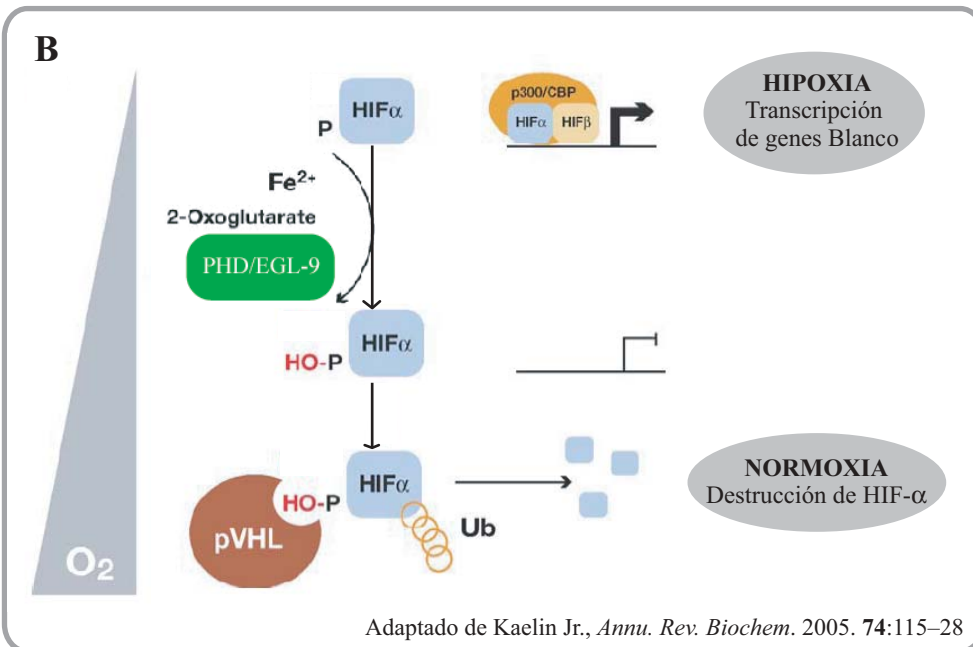
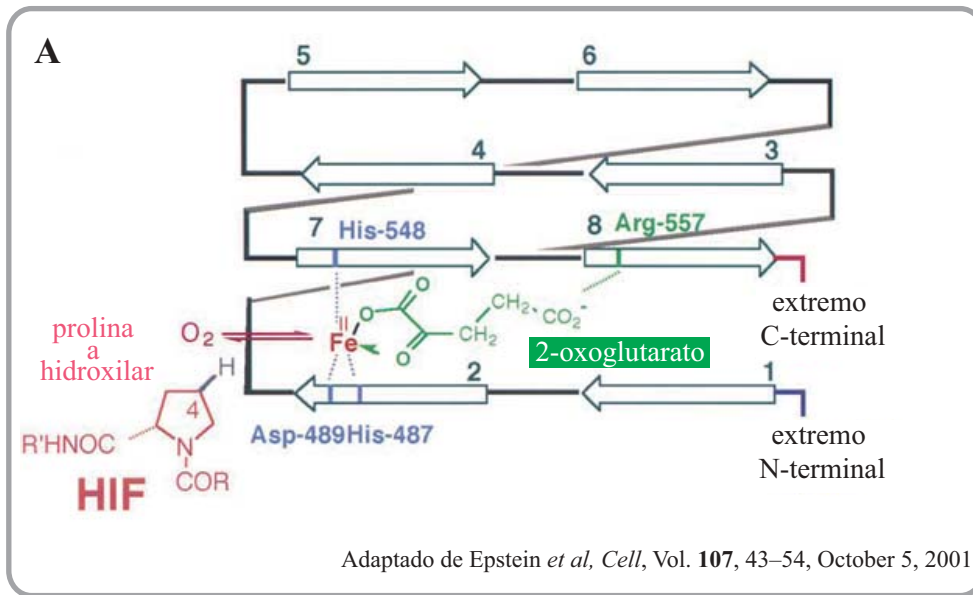


FIGURA 8. PHDs/EGL-9 son protil hidroxilasas dependientes de oxígeno y de 2-oxoglutarato. La hidroxilación de una prolina específica dentro del ODDD define la estabilidad de HIF- α . **A.-** Las PHDs tienen un requerimiento absoluto de oxígeno y 2-oxoglutarato, al que se unen por una arginina en su extremo C-terminal. Estas enzimas poseen una tríada catalítica de asociación a Fe, del tipo HxD...H. **B.-** En hipoxia, HIF- α es estable y puede heterodimerizar con la subunidad β y asociarse con co-activadores transcripcionales como P300 para disparar la respuesta transcripcional a hipoxia. A medida que los niveles de oxígeno aumentan, las PHDs pueden hidroxilar prolinas específicas en el ODDD de HIF- α permitiendo la interacción con VHL, la ubiquitinación y la subsiguiente destrucción en el proteasoma de 26S.

3.2.2 EL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO DE *DROSOPHILA*.

Conociéndose entonces el Sensor Molecular de Oxígeno en otras especies, tomamos las secuencias correspondientes a las protil hidroxilasas de HIF en *H. sapiens*, ratón y *C. elegans* e iniciamos una búsqueda informática comparando estas secuencias contra el genoma de *D. melanogaster*, que había sido secuenciado recientemente (Adams *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2000).

Encontramos que el gen codificado en el locus *CG1114* presentaba alta homología con las proliil hidroxilasas, siendo las secuencias particularmente homólogas en el dominio catalítico putativo de estas hidroxilasas (FIGURA 9). Este locus mapeaba en la región 82 F2-8 del 3^{er} cromosoma de la mosca, y cabe señalar que esta región estaba comprometida en la delección genómica Df(3R) 3-4, que fue la línea que presentó fenotipos más drásticos en nuestro *screen* genético. Los resultados observados en esta delección estaban en línea con lo que se esperaba para la pérdida del Sensor Molecular de Oxígeno; esto es: 1) Sima/HIF- α estabilizado por falta de la enzima que determina su degradación en normoxia; 2) una respuesta transcripcional a hipoxia permanentemente activa debido a la estabilización constitutiva de Sima. En definitiva, la línea portadora de la delección Df(3R) 3-4 parecían estar experimentando una “hipoxia genética” por falta de su Sensor Molecular de Oxígeno. Decidimos entonces realizar estudios para responder si los fenotipos observados en la delección Df(3R) 3-4 era debidos a la pérdida de este gen puntual y para ello, realizamos los experimentos de pérdida de función que se describen a continuación.

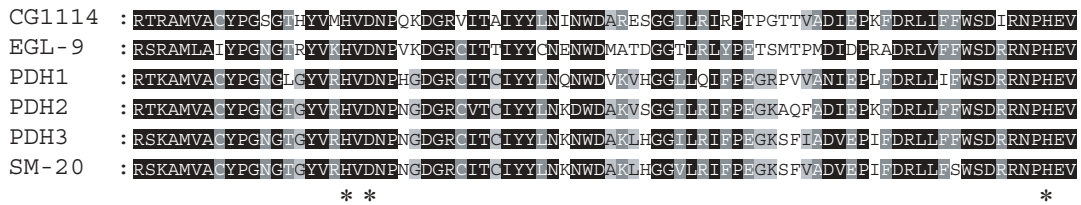


FIGURA 9. La PHD putativa de *Drosophila*. Alineamiento entre el producto predicho del gen *CG1114* de *Drosophila* y las proliil hidroxilasas reportadas en *C.elegans* (EGL-9), humano (PDH1, PDH2, PDH3) y en rata (SM-20). Se muestra la alineación de secuencias para el dominio catalítico donde la homología es notoria. Los residuos H D H de asociación a Fe se marcan con un asterisco (*).

3.2.3 EL SILENCIAMIENTO DEL SENSOR DE OXÍGENO EN LA MOSCA ALTERA SU RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA.

El caso particular que nos tocaba era, entonces, el de un gen homólogo a uno descrito en otros sistemas (*C. elegans*, rata, ratón, humano) incluido en una delección cromosómica que presentaba un fenotipo de interés en su respuesta transcripcional a hipoxia: GENÉTICA INVERSA Y DIRECTA nos dirigían a la misma región del genoma (FIGURA 10). Decidimos entonces estudiar la pérdida de función específica de este gen y ver si éramos capaces de fenocopiar lo observado en individuos homocigotas para la delección Df(3R) 3-4. Para silenciar el gen *CG1114* y estudiar la respuesta transcripcional a hipoxia, utilizamos inicialmente una estrategia de interferencia por RNA doble cadena (*dsRNA*), que había sido previamente probada con éxito en embriones de *Drosophila* (Kennerdell and Carthew, 1998). Diseñamos *primers* para amplificar la secuencia del gen *CG1114*, donde ambos oligonucleótidos (directo y reverso) llevaban sitios de unión para la RNA Polimerasa del fago T7, de modo tal que el producto de la reacción de RT-PCR era utilizado como molde en una reacción de síntesis *in vitro* de RNA, obteniéndose el *dsRNA* de interés (FIGURA 11A). El *dsRNA* del gen *CG1114* fue inyectado en embriones homocigotas para el reportero transcripcional *2xldh-Gal4 UASGFP*, para poder evidenciar los efectos del silenciamiento de este gen *in vivo*. Los embriones inyectados con este *dsRNA* presentaron una respuesta transcripcional

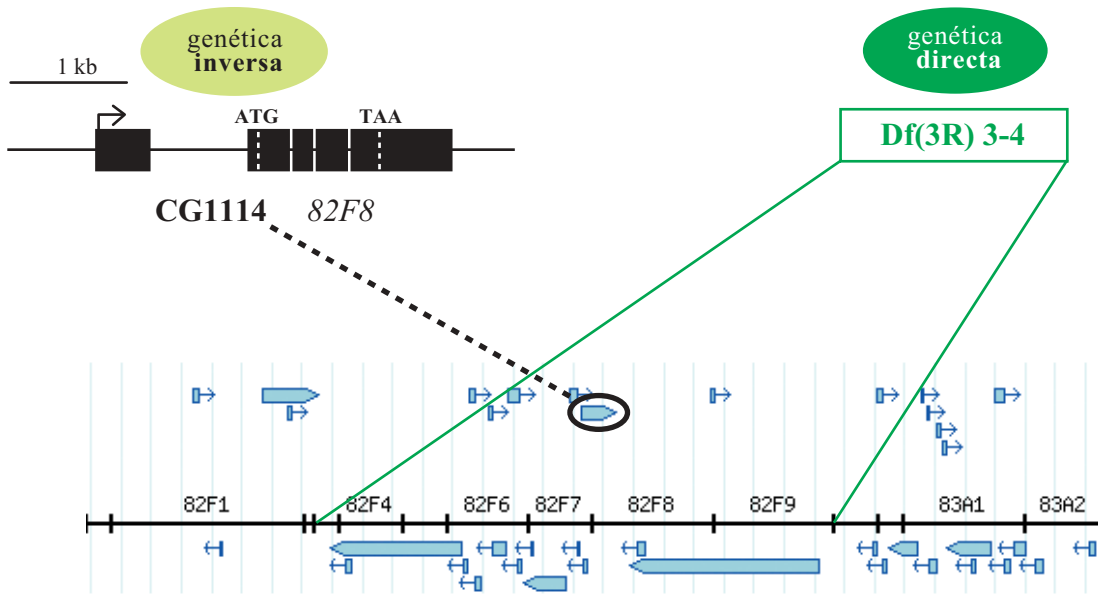


FIGURA 10. El locus *CG1114* está contenido dentro de la deleción *Df(3R) 3-4*. Posición en el genoma de *Drosophila* del locus *CG1114*, que codificaría para el sensor de oxígeno de *Drosophila*. Se observa que el gen

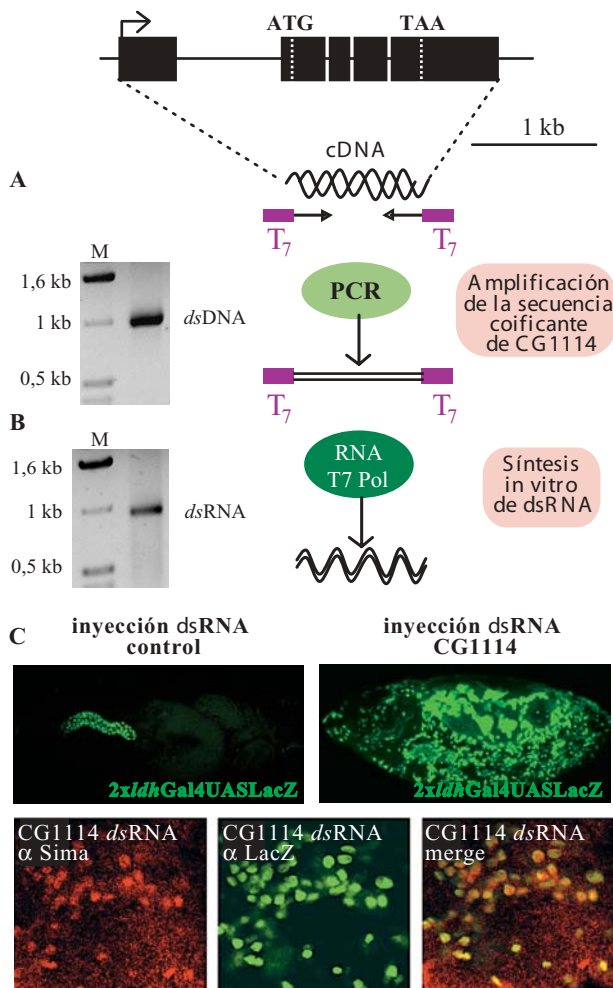


FIGURA 11. El silenciamiento de la expresión del gen *CG1114* causa la estabilización de la proteína Sima en normoxia, dando lugar a una respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activa. Esquema de la síntesis de RNA doble cadena contra el mensajero de *CG1114* y su inyección en embriones de *Drosophila*. **A.-** Se diseñaron dos *primers* sobre el *cDNA* de *CG1114* para amplificar la región codificante (ATG-TAA, aprox. 1kb). **B.-** Los oligonucleótidos utilizados contenían sitios de reconocimiento para la Polimerasa del fago T7 en sus extremos, de modo que el producto resultante de la reacción de PCR funcionó como templado para la síntesis de RNA doble cadena (*dsRNA*). **C.-** El *dsRNA* correspondiente al gen *CG1114* fue inyectado en embriones transgénicos para el reportero *2xldhGal4 UASGFP*. Los embriones resultantes presentaron activación constitutiva de la respuesta transcripcional a hipoxia, revelada por la expresión de este reportero en prácticamente todas las células del organismo. Las células que expresaban el reportero de hipoxia también presentaron estabilizada la proteína Sima en normoxia (panel inferior).

a hipoxia constitutivamente activa, del tipo de la observada en embriones homocigotas para la deleción Df(3R) 3-4 (FIGURA 11B). Como era de esperarse, en estos embriones detectamos a la proteína Sima estabilizada en normoxia (FIGURA 11C), mientras que embriones inyectados con un *dsRNA* control no presentaron diferencias con embriones sin inyectar. Estos resultados favorecían la hipótesis según la cual los fenotipos causados por la deleción original se debían a la falta del gen *CG1114*.

3.2.4 LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA ESTÁ CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA EN MUTANTES *fatiga*.

Para continuar con el estudio del gen *CG1114*, realizamos una búsqueda en Centros de Stocks de mutantes insercionales candidatos a alterar este gen en particular (típicamente, líneas mutantes en la que un transposón se encuentra insertado en proximidad del gen de interés). Encontramos una línea con estas características en el Bloomington Stock Center, la mutante *l(3)02255*, que presentaba un transposón inserto en una posición muy próxima al inicio de la transcripción del gen *CG1114* (FIGURA 12A). Esta mutante fue entonces analizada en cuanto a su capacidad de respuesta a hipoxia mediante el uso del reportero *2xldhGal4 UASGFP* y se observó una respuesta CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA, encendiéndose el reportero prácticamente en todas las células de los embriones homocigotas para esta mutante (FIGURA 12A). Estudios de inmunofluorescencia revelaron que la proteína Sima se hallaba ESTABILIZADA en estos mutantes en un patrón que se correspondía con el patrón en el que se encendía el reportero (FIGURA 12C); los fenotipos encontrados eran idénticos a los fenotipos observados previamente en la deleción cromosómica aislada en nuestro *screen*.

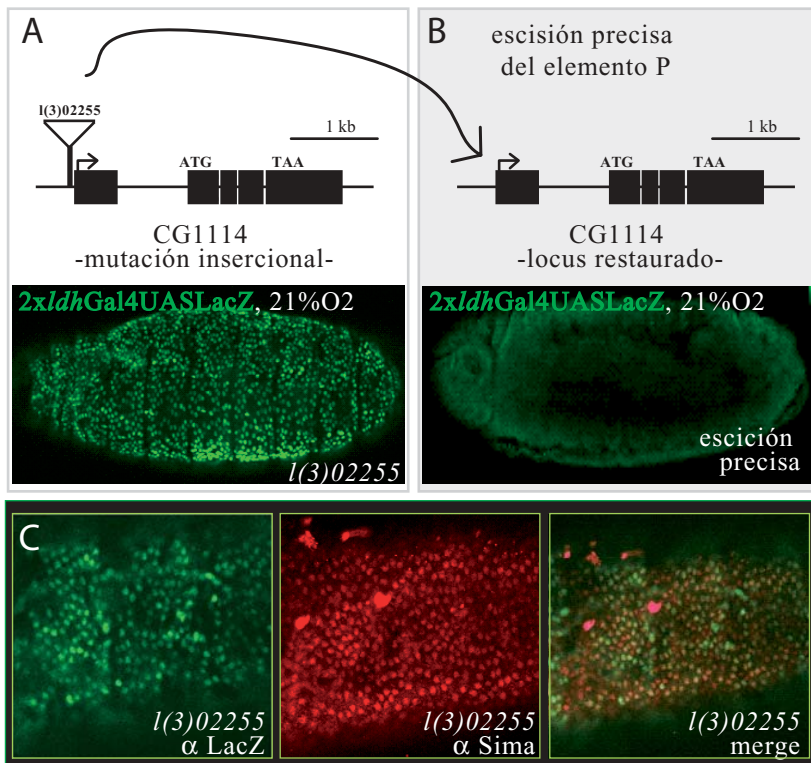


FIGURA 12. La inserción del Elemento-P *l(3)02255* causa los mismo fenotipos que el silenciamiento del locus *CG1114* por *dsRNA*. A.- El elemento *l(3)02255* está inserto río arriba del locus *CG1114*. Mutantes homocigotas para esta inserción presentan una expresión constitutiva del reportero *2xldhGal4 UASGFP* en normoxia. B.- La remoción del elemento P de un modo preciso restauró el fenotipo salvaje. C.- Embriones homocigotas mutantes para *l(3)02255* presentan estabilizada la proteína Sima en normoxia y exhiben una respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activa.

Para asignarle al transposón inserto en el gen *CG1114* un rol CAUSAL en estos fenotipos, realizamos cruzamientos genéticos para removerlo de su sitio y analizar si se restituiría la respuesta salvaje. Moscas en las que el transposón se había escindido de un modo preciso revirtieron el fenotipo observado en las mutantes y su respuesta transcripcional a hipoxia fue idéntica a la de los controles salvajes (FIGURA 12B). La inserción I(3)02255 era entonces responsable del fenotipo de activación constitutiva de la respuesta a hipoxia.

Dado que la respuesta a hipoxia se encontraba constitutivamente activada en embriones mutantes homocigotas para el gen *CG1114*, independientemente de la concentración de oxígeno a la cual eran crecidos, bautizamos a este gen como *fatiga (fga)*, por su fenotipo de FALTA CONSTITUTIVA DE OXÍGENO.

3.2.5 NUEVOS ALELOS DE *fatiga* PRESENTAN FENOTIPOS CON DISTINTO GRADO DE SEVERIDAD.

Para continuar con la caracterización del locus *fatiga*, decidimos generar en el laboratorio nuevos mutantes para este gen mediante la remoción imprecisa del elemento P I(3)02255. Se obtuvieron 3 nuevos alelos que se sumaron a la mutante original *fga*⁰²²⁵⁵: *fga*¹, *fga*⁹ y *fga*⁶⁴; los alelos generados fueron caracterizados molecularmente mediante experimentos de PCR sobre DNA genómico y estudios de Southern Blot. El alelo *fga*¹ conservaba una porción del elemento P original de aproximadamente 9 kb bases; el alelo *fga*⁹ conservaba una pequeña parte del transposón de aproximadamente 1,4 kb, y ensayos posteriores de RT-PCR revelaron que esta región estaba incluida en la región 5' no traducida (5'utr) del transcripto de *fga*; el alelo *fga*⁶⁴, por su parte, presentaba una deleción de alrededor de 6kb río arriba del gen y conservaba también una porción importante del transposón original (FIGURA 13A).

La caracterización de los nuevos alelos de *fatiga* mediante el uso del reportero *2xldhGal4 UASGFP* reveló en todos los casos que el reportero se encendía constitutivamente en condiciones de normoxia ya que la proteína Sima se estabilizaba también en normoxia (FIGURA 13B). La intensidad de la respuesta no era igual en todos los alelos: *fga*⁹ presentaba un encendido más débil del reportero que el resto de los mutantes, revelando que se trataba de un alelo hipomórfico. Notablemente, el patrón de expresión del reportero en embriones homocigotas para *fga*⁹ se restringía al sistema traqueal (FIGURA 13B) y curiosamente, el sistema traqueal es el primer tejido en el que el reportero se induce en hipoxia en moscas salvajes (Lavista-Llanos et al., 2002). Estos resultados sugieren una alta sensibilidad del sistema traqueal en la respuesta analizada; las consecuencias de esta sensibilidad particular serán retomadas en detalle en el Capítulo Tercero de esta Tesis. Otros alelos, como *fga*¹ y *fga*⁰²²⁵⁵ (el alelo original), presentaban una respuesta transcripcional a hipoxia constitutiva similar a la de la deleción Df(3R) 3-4, sugiriendo que eran alelos de pérdida de función fuertes o alelos nulos. Embriones homocigotas para *fga*⁶⁴ presentaban un encendido del reportero que era decididamente más fuerte que el de *fga*⁹, pero más débil que el de *fga*¹. El orden de penetrancia según el encendido del reportero de hipoxia era por lo tanto el siguiente: Df(3R)3-4=*fga*¹=*fga*⁰²²⁵⁵>*fga*⁶⁴>>*fga*⁹.

Contando con esta serie alélica de *fga*, estábamos en condiciones de comenzar a analizar qué consecuencias tenía la falta o la disminución de este gen en el desarrollo normal de *Drosophila*.

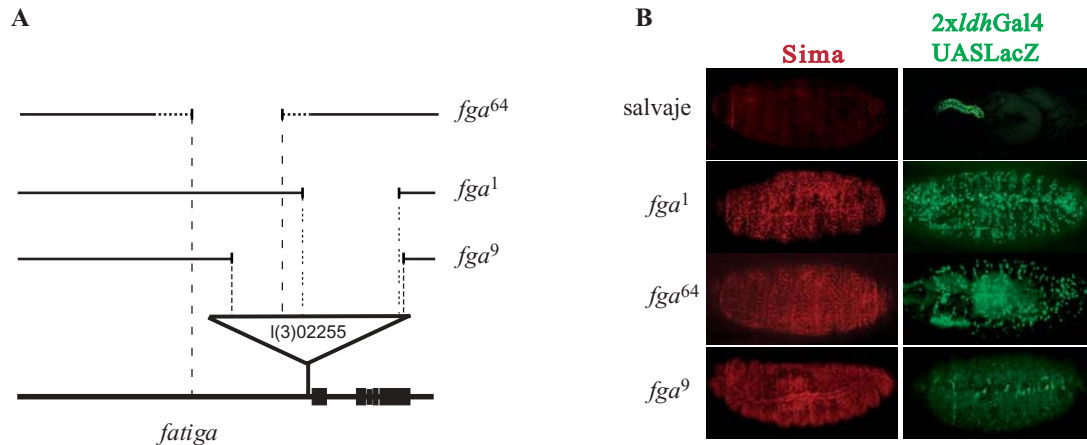


FIGURA 13. Nuevas mutantes *fga* presentan alterada la respuesta transcripcional a hipoxia. Escisiones imprecisas del elemento P1(3)02255 resultan en nuevos alelos de *fga*. **A.-** *fga*¹ y *fga*⁹ conservan distintas porciones del elemento P original, mientras que *fga*⁶⁴ perdió parte de este elemento y también 6 kb de la región genómica localizada río arriba del gen. **B.-** Embriones homocigotas para cada uno de los nuevos alelos de *fga* presentan estabilizada la proteína Sima en normoxia y el reportero 2xldhGal UASGFP constitutivamente expresado. La expresión del reportero en el alelo *fga*⁹ es notablemente más débil que en los otros dos alelos, revelando que *fga*⁹ es un alelo hipomórfico.

3.2.6 LOS MUTANTES *fatiga* SON LETALES EN ESTADIOS PRE-IMAGINALES.

Todos los mutantes homocigotas *fga* que generamos en el laboratorio resultaron ser letales durante el desarrollo. Esto es, ninguno de los homocigotas, así como ninguna de las combinaciones de alelos para *fga*, llegaba hasta estadios adultos. Un primer análisis consistió entonces en el estudio del momento del ciclo de vida en el que cada uno de los alelos moría. Para cada uno de los alelos, se colocó el cromosoma *fga* (el que lleva la mutación insercional o delecional) contra un Cromosoma Balanceador que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). De este modo, se generaron líneas que llevaban en uno de los homólogos la mutación *fatiga* en estudio y en el otro, el marcador GFP con expresión conocida observable *in vivo*. Si estos individuos heterocigotas se cruzaban por moscas de genotipo idéntico, los embriones de la progenie que no expresaran GFP serían homocigotas para la mutación *fga* (FIGURA 14A-B). Estos embriones fueron identificados bajo la lupa de fluorescencia y colocados en alimento fresco para seguir su desarrollo. Todos los mutantes *fga*, con excepción de la Df(3R)3-4 que es letal durante la embriogénesis, llegaron a estadios larvales. Mientras que los mutantes *fga*¹, *fga*⁰²²⁵⁵ y *fga*⁶⁴ murieron mayoritariamente en el primer estadio larval, los mutantes homocigotas *fga*⁹ podían completar su desarrollo larval y llegar a estadios pupales pero no al estadio adulto (N>600)(FIGURA 14C).

3.2.7 ¿ES FATIGA EL ÚNICO SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*?

La disponibilidad tanto de los mutantes *fga* como del reportero transcripcional 2xldhGal4 UASGFP nos permitía en ese momento hacer un análisis detallado de la respuesta a hipoxia. Decidimos investigar si Fga funcionaba como el único sensor molecular de oxígeno de la célula

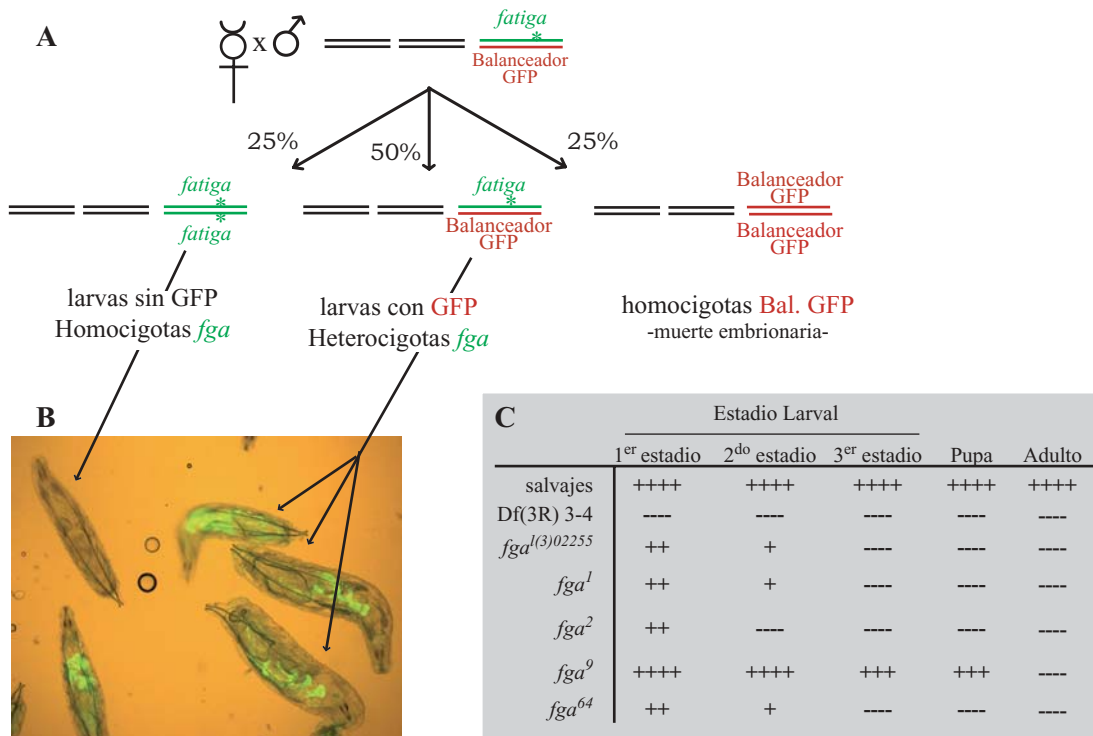


FIGURA 14. Los mutantes *fga* son letales en estadios larvales tempranos. El uso de Balanceadores GFP permite la identificación de mutantes homocigotas *fga*. **A.-** Los distintos alelos fueron colocados contra un cromosoma balanceador que expresa GFP. **B.-** El 25% de los embriones de esta línea dan lugar a larvas sin GFP, las cuales son identificadas como mutantes homocigotas *fga*. **C.-** Los distintos alelos de *fga* sobreviven hasta estadios diferentes del desarrollo, siendo *fga⁰* el alelo más débil y por lo tanto es capaz de alcanzar el estadio pupal.

colocando embriones homocigotas para *fga* en hipoxia. Ya mencionamos que los mutantes *fga* presentan una respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activada aún en normoxia; si Fga fuera el único Sensor de Oxígeno no sería posible inducir aún más la expresión del reportero al colocar los embriones mutantes *fga* en hipoxia, puesto que la única proteína a regular (Fga) estaría ausente. Alternativamente, si hubiera otro Sensor de Oxígeno funcionando en *Drosophila*, la expresión del reportero *2xldhGal4 UASGFP* debería ser más fuerte cuando los embriones mutantes *fga* fueran colocados a bajas concentraciones de oxígeno. Mediante tinciones fluorescentes observamos que incluso los alelos nulos de *fga* expresaban más fuerte el reportero en embriones crecidos en hipoxia que cuando se los crecía en normoxia. Lo mismo ocurría en embriones mutantes homocigotas para la delección Df(3R)3-4 (FIGURA 15). Estos resultados sugieren fuertemente que en ausencia de Fga existe otra proteína que sensa los niveles de oxígeno transmitiendo la información al reportero transcripcional dependiente de HIF.

Dos publicaciones aparecieron en ese momento demostrando la existencia de un Sensor de Oxígeno adicional en células de mamíferos (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Este Sensor era una Asparagina hidroxilasa dependiente de Oxígeno (FIH, por Factor Inhibiting HIF- α), que funciona regulando la actividad transcripcional de HIF: en condiciones de normoxia, FIH hidroxila un residuo asparagina en el C-terminal de HIF- α , y esta hidroxilación impide la interacción con P300, un co-

activador transcripcional. En hipoxia, esta Asparagina hidroxilasa no puede hidroxilar a HIF- α y la transcripción génica ocurre eficientemente. Así, funcionan dos hidroxilasas distintas sobre la misma molécula de HIF- α , donde una prolina hidroxilasa controla la estabilidad de la proteína y una asparagina hidroxilasa controla la actividad transcripcional de la molécula de HIF previamente estabilizada.

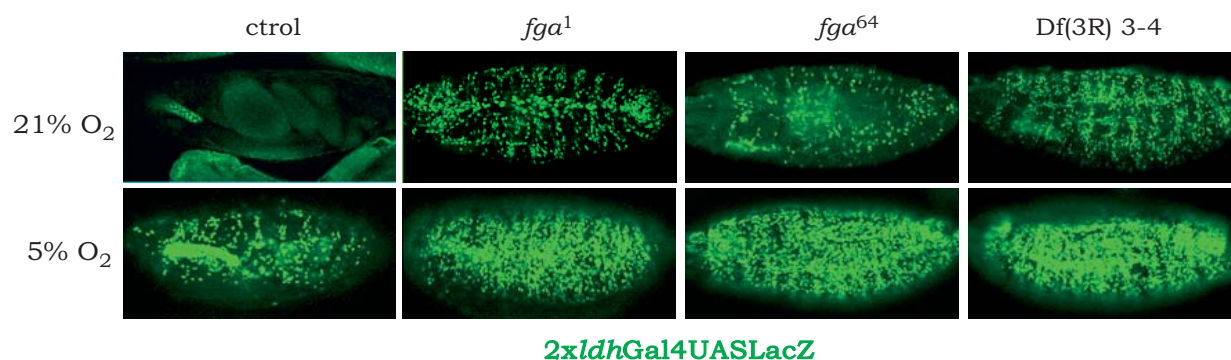


FIGURA 15. Mutantes *fga* expuestos a hipoxia presentan un mayor nivel de expresión del reportero 2xldhGal4 UASGFP que dichos mutantes mantenidos en normoxia. Todos los alelos de *fga* en homocigosis fueron colocados en hipoxia o mantenidos en normoxia. La intensidad de la expresión del reportero 2xldhGal4 UASGFP en hipoxia fue en todos los casos mayor que en normoxia.

Integrando entonces estos datos de la literatura con los resultados obtenidos en el laboratorio, cabe señalar que el efecto de pérdida de función de Fga es suficiente para desregular la respuesta transcripcional a hipoxia, sugiriendo que el otro sensor de oxígeno no basta para mantener la homeostasis celular. El sensor adicional en moscas es entonces compatible con un rol subordinado al accionar de Fga y probablemente mediado por el mismo Factor de Transcripción, de modo que podría ser un homólogo a FIH. Hasta la fecha los esfuerzos por encontrar en *Drosophila* un homólogo de esta asparagina hidroxilasa no han dado resultado (L.Franchini y P.Wappner, resultados no publicados).

3.3 *fatiga* CODIFICA PARA TRES TRANSCRIPTOS DISTINTOS

3.3.1 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE DISTINTOS TRANSCRIPTOS DE *fatiga*.

Decidimos estudiar el locus *fga* en mayor detalle, y para ello realizamos una búsqueda de ESTs (Expressed Sequence Tags) en las distintas colecciones existentes. Encontramos 28 ESTs correspondientes a *fga* distribuidos en bibliotecas de cDNA que provienen de distintos tejidos de *Drosophila*. Secuenciamos en el laboratorio 8 ESTs representativos e identificamos tres transcritos distintos para *fga* que presentaban tanto sitios de inicio de la transcripción como de splicing alternativos. Denominamos a estos tres transcritos *fgaA*, *fgaB* y *fgaC* (FIGURA 16A).

Las tres proteínas predichas codificadas por los tres transcritos distintos comparten el dominio catalítico C-terminal, en el que residiría la actividad hidroxilasa y difieren en su extremo N-terminal (FIGURA 16B). Fga B es idéntica a Fga C, pero presenta en su extremo N-terminal 33 aa adicionales. Buscamos en esta región tanto señales de localización a distintos compartimentos

celulares como posibles dominios proteicos, pero los programas que utilizamos no arrojaron ningún dato de interés. Fga A, en cambio, presenta alrededor de 200 aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal y encontramos en esta región un dominio zinc-finger C₆H₂ de tipo MYND (FIGURA 16B-C), postulado en otras proteínas como un dominio de interacción proteína-proteína. Este dominio está también presente en algunas de las prolil hidroxilasas dependientes de oxígeno tanto de *C. elegans* como de peces y mamíferos (Epstein et al., 2001). La existencia de un dominio MYND común en los Sensores de Oxígeno de especies tan distantes evolutivamente como el gusano y el humano es muy llamativa pero la función de este dominio no ha sido estudiada aún en profundidad (ver discusión).

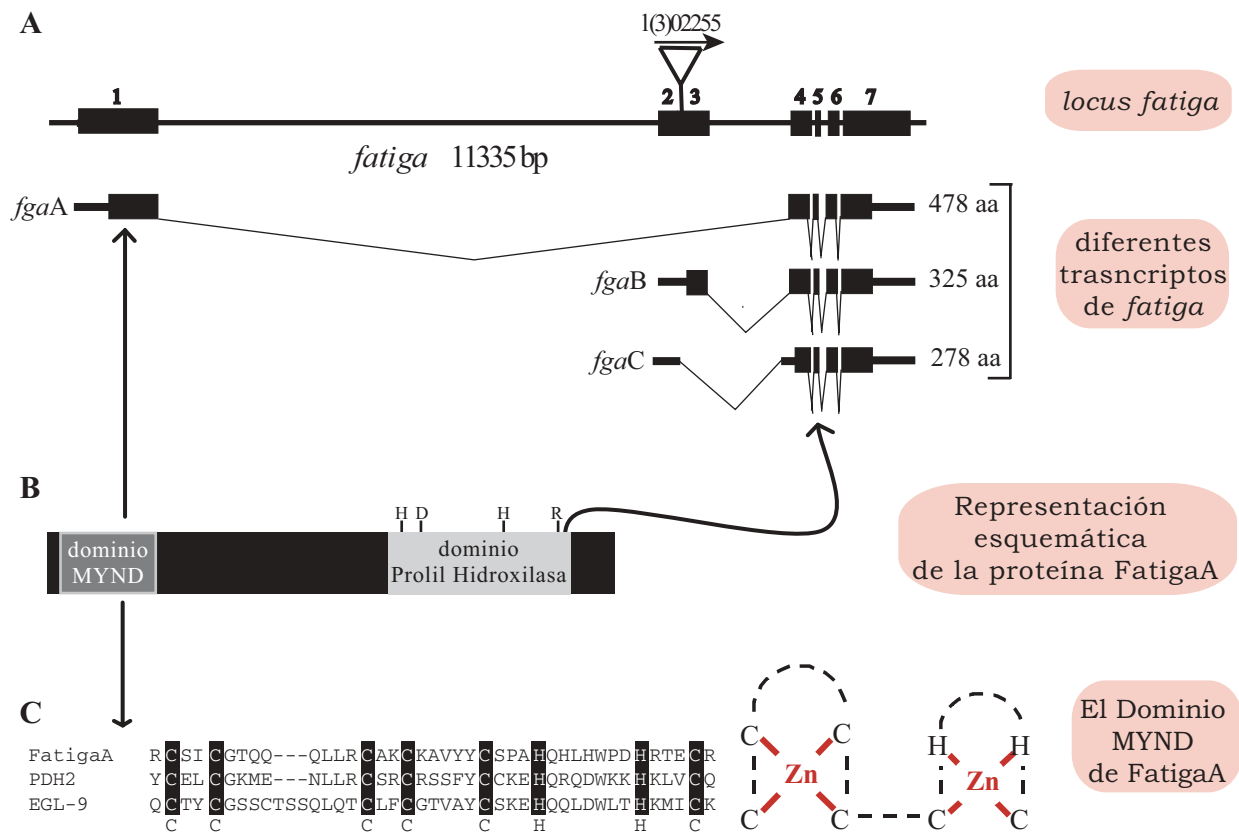


FIGURA 16. *fga* presenta al menos tres transcritos diferentes generados por una combinación de inicio alternativo de la transcripción y splicing alternativo. **A.-** El gen *fga* tiene 7 exones; el dominio que confiere actividad de prolil hidroxilasa estaría codificado en los exones 4-7 que son comunes a todas las isoformas. Por origen de la transcripción y *splicing* alternativos, *fga* genera tres transcritos distintos, *fgaA*, *fgaB* y *fgaC*. Los orígenes de la transcripción de *fgaA* y de *fgaB* y *fgaC* son distintos. **B.-** La proteína Fga presenta en su extremo N-terminal un dominio MYND, y en su extremo C-terminal el dominio prolil hidroxilasa. Este último dominio está codificado por los exones comunes a todas las isoformas. **C.-** Alineamiento de la región N-terminal de FgaA con PDH2 de humanos y EGL-9 de *C.elegans*; todas estas proteínas presentan un dominio MYND de tipo *Zinc finger*.

El hecho de que existan tres transcritos distintos de *fga* nos invitaba a formularnos una serie de preguntas: ¿Tienen estos transcritos funcionalidad diferencial? ¿Se expresan en distintos tejidos/órganos de la mosca? ¿Y en distintos momentos de su ciclo de vida? ¿Están las isoformas reguladas transcripcionalmente por distintos factores/estímulos/condiciones?

3.3.2 EXPRESIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL DE LOS DIFERENTES TRANSCRIPTOS DE *fatiga in vivo*

Para analizar la expresión de cada uno de los tres transcritos de *fga*, diseñamos distintos *primers* para llevar a cabo reacciones de RT-PCR. Se utilizó un mismo *primer* reverso para todos los transcritos (*fgaABCREV*) y dos *primers* directos diferentes (*fgaAFOR* y *fgaBCFOR*) (FIGURA 17A). Con esta estrategia detectamos los tres transcritos distintos en estadios embrionarios, larvales, pupales y adultos, indicando que cada una de las versiones del gen *fga* se expresa en todos los estadios del desarrollo de la mosca (FIGURA 17B).

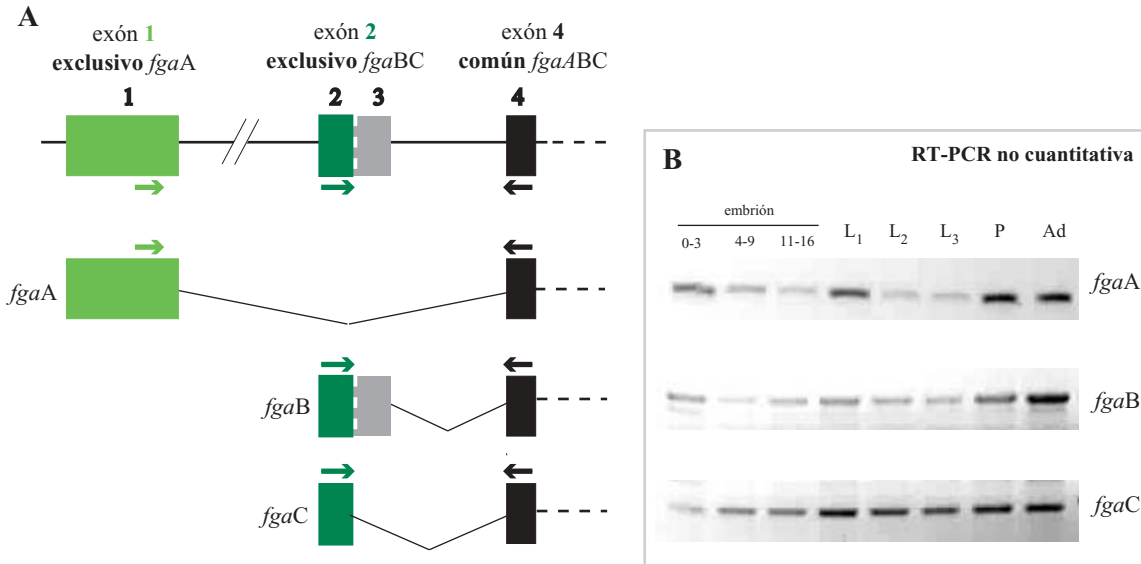


FIGURA 17. Todos los transcritos *fga* se expresan a lo largo de todo el desarrollo de la mosca. *Primers* diseñados sobre exones diferenciales de cada transcripto fueron utilizados para realizar reacciones de RT-PCR, utilizando como templado preparaciones de RNA extraído de cada uno de los estadios del ciclo de vida de *Drosophila*. A.- El par de *primers* 1-4 sólo amplifica el transcripto *fgaA*, mientras que el par 2-4 amplifica tanto *fgaB* como *fgaC*. B.- Los tamaños de los amplicones resultantes son diferentes, permitiendo reconocer la presencia de cada uno de los transcritos en geles de agarosa.

Decidimos luego analizar si los transcritos presentaban patrones de expresión espacialmente restringidos, y para esto diseñamos sondas exclusivas para *fgaA*, *fgaB* y una sonda común para *fgaA/B/C* a fin de utilizarlas en ensayos de hibridación *in situ* de mRNA (FIGURA 18A). Como el transcripto de *fgaC* no presentaba ninguna región no-compartida con *fgaA* ni con *fgaB*, una sonda común para *fgaB/C* debería revelar, de existir, patrones de expresión que correspondieran a *fgaC* pero que estarían ausentes cuando se utilizara la sonda *fgaB*. Embriones salvajes de estadios diversos fueron hibridizados con cada una de las sondas descritas y para todos los transcritos se detectó un patrón de expresión ubicuo (en la FIGURA 18B se muestra el patrón obtenido con la sonda común *fgaABC*). El hecho de que *fga* estuviera expresado ubicuamente en el embrión se correspondía con la expresión generalizada del reportero transcripcional *2xldh* en los mutantes *fga*, favoreciendo la noción de que todas las células son capaces de regular la respuesta transcripcional a hipoxia: como *fga* se expresa en todas las células del organismo, los mutantes *fga* expresan constitutivamente el reportero de hipoxia en todas esas células.

3.3.3 *fatigaB* y *fatigaC* SON TRANSCRIPTOS INDUCIBLES POR HIPOXIA.

Los estudios de expresión descritos en el punto anterior sugerían que *fatiga* se encontraba presente en todo momento y en todo lugar durante el ciclo de vida de la mosca. En ese contexto, una pregunta interesante era si existían estímulos externos capaces de alterar la expresión de *fga*. Dado que *fga* es un gen de sensado de oxígeno, lo primero que analizamos fue si la reducción en la concentración de oxígeno, alteraba sus niveles de expresión. Realizamos ensayos de hibridización *in situ* de mRNA utilizando una sonda común a *fgaA/B/C* sobre embriones crecidos en normoxia y en hipoxia (5% O₂). Observamos, como se muestra en la FIGURA 18B, que los embriones que habían sido crecidos en hipoxia presentaron mayor expresión del mRNA de *fga* que los crecidos en normoxia. Para analizar si esta inducción transcripcional era producto de la estabilización de Sima en hipoxia, decidimos sobre-expresar a Sima en un patrón fácilmente identificable y analizar los niveles de expresión de *fga* en ese patrón particular (ver anexo 2: SISTEMA GAL4/UAS Y EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES). El patrón que elegimos corresponde al del gen *engrailed*, que se expresa en 14 bandas que cruzan al embrión dorso-ventralmente (FIGURA 18C). De este modo, generamos 14 regiones de “hipoxia genética” (Sima acumulada genética y no fisiológicamente) que serían comparadas con las regiones de interbanda que no sobre-expresaban

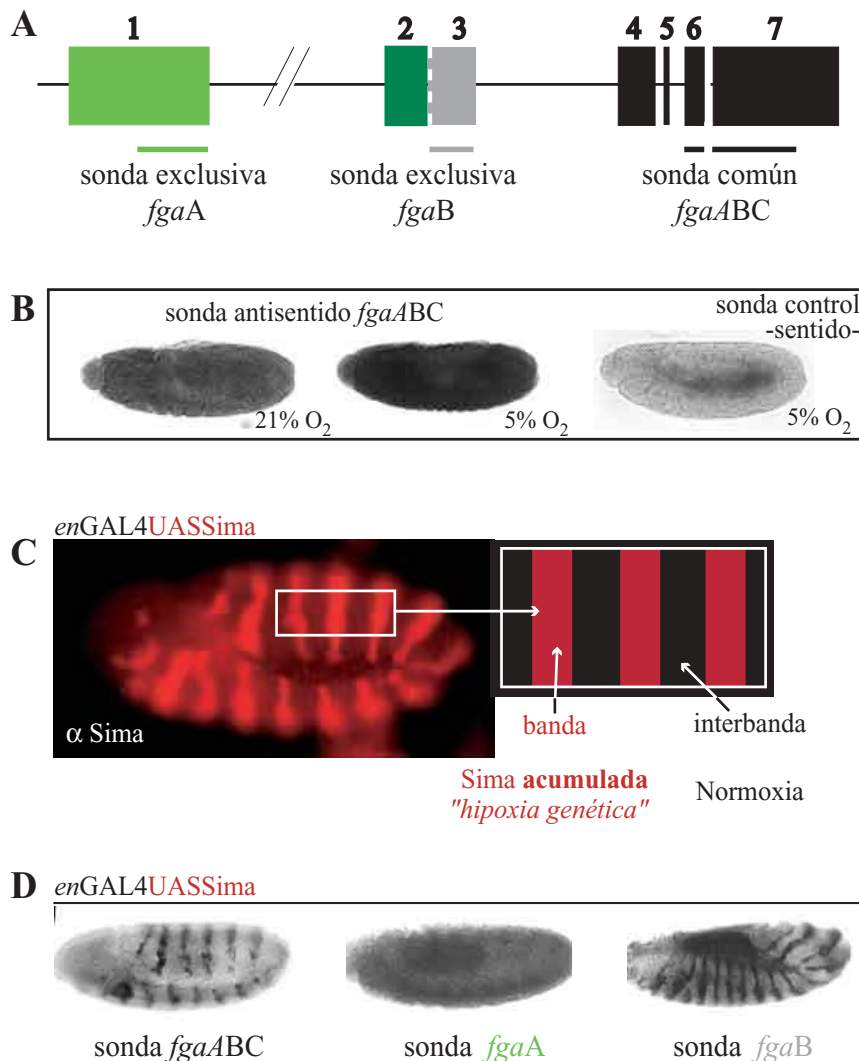


FIGURA 18. *fgaB* pero no *fgaA* se induce por hipoxia y por sobre-expresión de Sima. La inducibilidad de los distintos transcritos de *fga* fueron analizados por hibridización *in situ* de mensajeros. A.- esquema de las sondas utilizadas; se sintetizaron tres sondas distintas: una exclusiva para *fgaA* (verde), otra para *fgaB* (gris) y una última común a las tres isoformas (negro) B.- La hibridización con la sonda común reveló que *fga* se expresa ubicuamente en embriones y que sus niveles aumentan cuando éstos son expuestos a condiciones de hipoxia. Una sonda *sentido* que no hibridiza con el mensajero de *fga* reveló que la tinción de la sonda anti-sentido común es específica. C.- Sima fue hiper-expresado en el patrón del gen *engrailed*. La proteína Sima se expresa en 14 bandas a lo largo del embrión; las regiones de inter-banda funcionan como control negativo de las bandas que expresan Sima. D.- La utilización de sondas específicas para los distintos transcritos de *fga* revelan que *fgaB* pero no *fgaA* es inducible por Sima.

Sima. En esas 14 bandas se detectaron altísimos niveles de *fga*, en comparación con las regiones inter-banda (FIGURA 18D). Concluimos a partir de estos experimentos que *fga* es un gen inducible por hipoxia y blanco transcripcional de Sima.

Seguidamente, decidimos analizar si la inducibilidad de *fga* por Sima se daba sobre todos los transcritos o si únicamente operaba sobre alguno de ellos. Con ese objeto, sobre-expresamos Sima en bandas, pero esta vez utilizamos sondas exclusivas para *fgaA* y para *fgaB* en los ensayos de hibridización *in situ* de mRNA. Observamos el patrón de bandas con la sonda de *fgaB*, que fue idéntico al observado cuando utilizamos la sonda común a todos los transcritos, mientras que con la sonda para *fgaA* este patrón de bandas no se hizo aparente (FIGURA 18D). Estos resultados sugieren fuertemente que *fgaB* pero no *fgaA* es blanco transcripcional de Sima. Vale recordar que *fgaA* y *fgaB* se generan utilizando sitios distintos de inicio de la transcripción que están separados alrededor de 7 kb el uno del otro, de modo tal que era probable que existieran sitios HRE en la región reguladora de *fgaB* pero no en la de *fgaA*. La estudiante Julieta Acevedo está caracterizando funcionalmente en nuestro laboratorio las secuencias HRE cercanas al promotor de *fgaB* (J.Acevedo, L.Centanin, A.Dekanty y P.Wappner, datos no publicados). Para analizar si *fgaC* es también blanco transcripcional de Sima (dado que comparte el sitio de inicio de la transcripción con *fgaB*) no podíamos utilizar el mismo acercamiento por hibridización *in situ* de mRNA dada la imposibilidad de generar una sonda exclusiva para este transcripto, que no reconozca a *fgaB*. Decidimos entonces analizar la inducibilidad de *fgaC* mediante ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa, y para esto utilizamos dos estrategias con distintos pares de *primers*: **1.-*fgaBCFOR-fgaABCREV*** que amplifica regiones de *fgaB* y *fgaC* de distinta longitud, de modo que los amplicones son diferenciables por el peso molecular al correr un gel de agarosa; **2.-*fgaCFOR-fgaABCREV*** que levanta únicamente el transcripto *fgaC* ya que el *primer* directo fue diseñado sobre el sitio de splicing 2-4, (exclusivo de *fgaC*) que no reconoce ni a *fgaB* ni a *fgaA* (FIGURA 19 AyB).

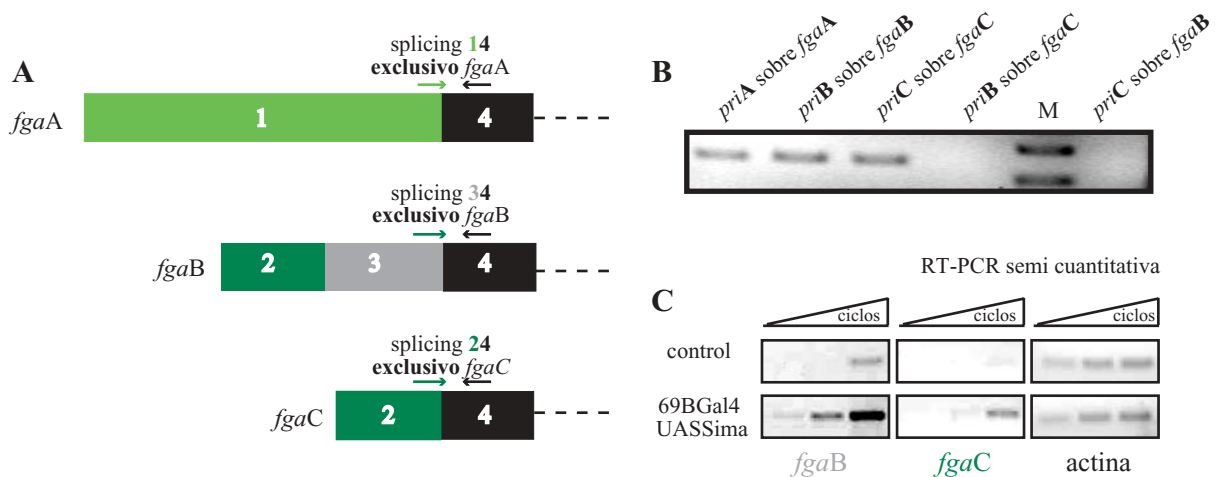


FIGURA 19. *fgaB* y *fgaC* son transcritos inducibles por Sima. La utilización de *primers* diseñados sobre sitios de *splicing* permitió el estudio individual de cada transcripto por separado en reacciones de PCR semi-cuantitativas. **A.-** Esquema mostrando cada uno de los *primers* utilizados, que hibridizan sobre combinaciones de exones exclusivas de cada transcripto. **B.-** control del experimento mostrando que cada uno de los *primers* funcionan sobre su transcripto correspondiente pero no sobre los demás transcritos de *fga*. **C.-** PCR semi-cuantitativa comparando niveles de *fgaB* y de *fgaC* en embriones salvajes y tras la hiper-expresión de Sima. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con diferentes cantidades de ciclos de amplificación, dentro de la fase exponencial de la reacción.

Los ensayos de RT-PCR se realizaron tomando como templado cDNA preparado a partir de embriones que hiper-expresaban Sima de manera ubicua inducida por un inductor genético 69B-Gal4; los resultados fueron comparados con los de embriones control que no sobre-expresaban Sima. En las reacciones de PCR se utilizó *actina42C* como RNA mensajero control, no inducible por hipoxia/Sima. Los resultados obtenidos con ambas estrategias fueron coincidentes, y demostraron que *fgaC* también es blanco transcripcional de Sima (FIGURA 19C). Concluimos entonces que *fgaB* y *fgaC* son transcritos inducibles por hipoxia y por la proteína Sima, mientras que *fgaA* no varía sus niveles de expresión en respuesta a los niveles disponibles de oxígeno.

3.4 LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE FATIGA SON FUNCIONALMENTE DIFERENTES

El hecho de que el Sensor Molecular de Oxígeno de *Drosophila*, Fatiga, estuviera codificado por un único gen con tres transcritos diferentes (*fgaA*, *fgaB* y *fgaC*), en lugar de los tres genes independientes (*phd1*, *phd2* y *phd3*) existentes en mamíferos (rata, ratón, líneas celulares humanas), constituía una ventaja para el análisis *in vivo* de estas distintas isoformas. Bastaba con generar una mutante de este único gen (y no de tres genes distintos) y restituir artificialmente la isoforma a ser analizada. En esta sección utilizamos dicha estrategia para analizar funcionalmente las isoformas FgaA y FgaB, aprovechando la existencia de los mutantes *fga* que generamos en el laboratorio.

3.4.1 GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS PARA CADA UNA DE LAS ISOFORMAS DE *fga*.

Para analizar *in vivo* la funcionalidad diferencial de FgaA, FgaB y FgaC era necesaria la generación de líneas transgénicas que expresasen cada una de las tres isoformas. Para ello, las secuencias de distintos ESTs correspondientes a *fgaA*, *fgaB* y *fgaC* fueron clonadas en vectores CasPer-UAS e inyectadas en embriones salvajes para generar líneas Transgénicas (ver anexo 1: “GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS”). Con el objeto de verificar la expresión de cada uno de los transgenes, cada una de las líneas UAS obtenidas fue cruzada por la línea *engrailedGAL4* y se realizaron ensayos de hibridización *in situ* de mRNA sobre la progenie utilizando la sonda común *fgaABC*. En una serie de experimentos paralelos, también se utilizaron sondas exclusivas para *fgaA* y *fgaB* a fin de confirmar que cada línea hiper-expresara su transcrito correspondiente, FIGURA 20A y B. Se observó que todas las líneas transgénicas expresaban los transcritos de acuerdo a lo esperado.

Para comenzar el análisis funcional de FgaA y FgaB estudiamos los efectos de la hiper-expresión de cada una de las isoformas en embriones salvajes, utilizando distintos tipos de inductores GAL4. No observamos ningún fenotipo llamativo en moscas que hiper-expresaban las distintas isoformas de *fga*, sugiriendo que los niveles de Fga no son limitantes para ningún evento endógeno durante el desarrollo de *Drosophila*.

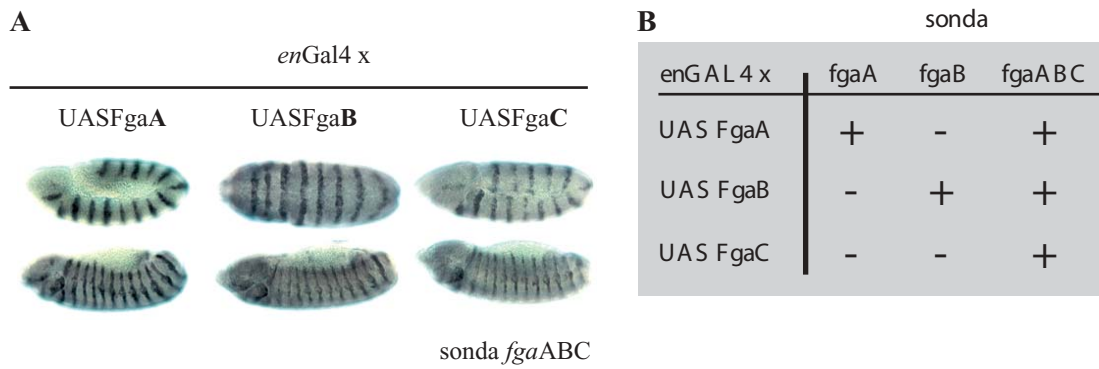


FIGURA 20. Obtención de líneas transgénicas que hiper-expresan cada una de las isoformas de Fga. Moscas salvajes fueron transformadas con construcciones UAS *fgaA*, B o C. **A.-** Las líneas UAS obtenidas fueron cruzadas por moscas *enGal4*. La utilización de una sonda común a las distintas isoformas reveló la expresión de *fga* en el patrón de bandas característico del gen *engrailed*, demostrando que cada uno de los transcritos de *fga* se expresa en estas líneas. **B.-** La utilización de sondas específicas para cada una de las isoformas confirmó que cada línea transgénica expresa el transcrito esperado.

3.4.2 LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE FATIGAB REVIERTE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA CONSTITUTIVAMENTE ACTIVA DE LOS MUTANTES *fatiga*.

Continuando con el análisis de la funcionalidad de cada una de las isoformas de Fatiga generamos, mediante cruzamientos genéticos, cromosomas recombinantes que tuvieran una mutación en el gen *fga* y que al mismo tiempo llevaran insertada una copia del transgén que expresaba a *fgaA* o a *fgaB*. *fga C* no fue recombinada mediante esta técnica porque obtuvimos una única línea transgénica en la que la inserción del transgén había ocurrido en un cromosoma (el 2^{do}) distinto al que contiene el gen *fga* (el 3^{ro}).

Los mutantes *fga*, como ya se ha descrito, presentaban desregulada su respuesta a hipoxia induciendo la expresión de los reporteros *2xldhGal4* y *ldhLacZ* en normoxia. El reportero *ldhLacZ* muestra un patrón de expresión más débil que el *2xldhGal4* (el enhancer no está dimerizado ni potenciado por el accionar de Gal4 sobre los UAS), y por lo tanto se expresa únicamente en las tráqueas de los mutantes *fga*. Decidimos entonces expresar las distintas isoformas del Sensor en las tráqueas de los mutantes *fga*¹ y observar si se revertía el encendido del reportero en normoxia. En la FIGURA 21 se observa que la expresión de FgaA no alteró el patrón del reportero en el mutante *fga*¹. Notablemente, la expresión de FgaB suprimió totalmente la expresión constitutiva del reportero en el mutante *fga*¹, revelando que FgaB es suficiente para controlar la

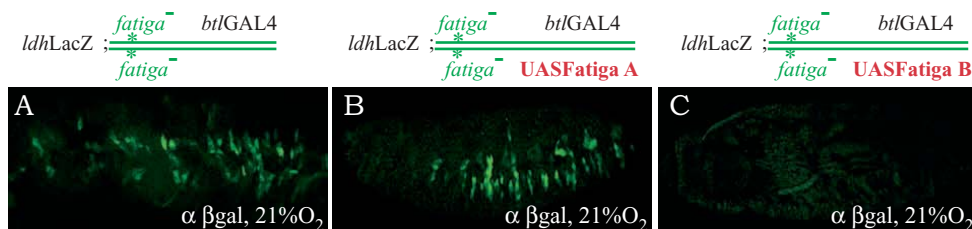


FIGURA 21. La expresión de fgaB en las tráqueas revierte el encendido constitutivo del reportero ldhLacZ en los mutantes fga. **A.-** Los mutantes *fga* expresan el reportero de hipoxia en las tráqueas de manera constitutiva, incluso a 21%O₂. **B y C.-** Mientras que la expresión de FgaA en las tráqueas de embriones mutantes para *fga* no tiene efecto sobre la expresión del reportero (B), la expresión de FgaB resulta en una reversión de la activación constitutiva del reportero (C).

abundancia de la proteína Sima y por lo tanto la magnitud de la respuesta transcripcional a hipoxia.

Como se mencionó, la sobre-expresión de FgaA no condujo a un rescate evidente de la respuesta transcripcional a hipoxia en el mutante *fga*. Sin embargo, dado que la detección por inmunofluorescencia no es un método cuantitativo, no podíamos establecer si los niveles de expresión del reportero se alteraban sutilmente tras la expresión de FgaA. Con el objeto de valernos de un método de análisis más sensible, llevamos a cabo las observaciones que se describen en el próximo punto.

3.4.3 FATIGAB REVIERTE LOS FENOTIPOS TRAQUEALES OBSERVADOS EN MUTANTES *fatiga*.

Los mutantes *fga* presentan diversos fenotipos, que serán analizados en detalle en los Capítulos Segundo y Tercero de esta Tesis. Uno de estos fenotipos es fácilmente visible en larvas de 1^{er} estadio y afecta la funcionalidad del sistema respiratorio (traqueal). El sistema traqueal de *Drosophila* es básicamente una red de túbulos que reparte oxígeno a todas las células del cuerpo. Estos tubos se forman durante el desarrollo embrionario, pero inicialmente no son funcionales porque contienen líquido en el espacio luminal. Ese líquido es absorbido por las mismas células traqueales cuando eclosiona la larva y el sistema traqueal se vuelve funcional, llenándose de aire (en realidad vaciándose de líquido). Los pulmones de los mamíferos también se forman durante la gestación embrionaria como compartimentos llenos de líquido; el líquido es absorbido en el momento del parto y los pulmones se vuelven funcionales. Curiosamente, los genes que median esta absorción están conservados molecular y funcionalmente entre moscas y mamíferos (Liu et al., 2003). Incluso se ha reportado que estos genes (DEG/ENaC, que codifican canales de Sodio) se inhiben a bajas concentraciones de oxígeno, lo cual puede provocar edemas pulmonares (experimentado por ejemplo por montañistas de altura). Contrariamente a lo que ocurre en moscas salvajes donde las tráqueas son observables fácilmente mediante microscopía de campo claro por estar llenas de aire, los mutantes *fga* presentan tráqueas difíciles de visualizar por estar llenas de líquido (FIGURA 22A y B); un fenotipo similar fue reportado en los mutantes para los genes *pickpocket*, que codifican los canales de sodio que controlan el vaciado traqueal (Liu et al., 2003). Este fenotipo fue observado en todos los alelos de *fga*, con niveles de penetrancia distintos que correlacionan con la fuerza de cada alelo, basándonos en el criterio del estadio en el que ocurre la letalidad, la fuerza del encendido de reportero de hipoxia y la estabilización de la proteína Sima (FIGURA 22F). Observamos también que los defectos en el vaciado de las tráqueas son provocados por la acumulación de Sima, ya que moscas que sobre-expresan Sima en las tráqueas manifiestan un fenotipo de vaciado idéntico (FIGURA 22C). Una observación interesante es que este fenómeno es autónomo de célula, ya que dirigiendo la expresión de Sima a una única célula del sistema traqueal, el fenotipo de vaciado anómalo se restringe a esa única célula (FIGURA 22D). La existencia de las tráqueas en estos individuos que, por la presencia de líquido no pueden ser visualizadas por microscopía de campo claro, se evidenció mediante la co-expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el mismo inductor traqueal con el que se sobre-expresó Sima. Como se ve en la FIGURA 22E estos individuos presentan tráqueas bien

formadas pero llenas de líquido, indicando que en estas larvas se afecta específicamente el proceso de vaciado y no la morfogénesis de los tubos. Este fenotipo dependiente de Fga y Sima, por ser de muy fácil observación (no requiere fijaciones, tinciones, preparación de extractos, ni sacrificar a los especímenes) constituía una herramienta sencilla y apropiada para el análisis funcional de la actividad de las distintas isoformas de *fga*.

El esquema experimental utilizado fue el mismo que en el punto anterior; se intenta rescatar el fenotipo de larvas de primer estadio mutantes para *fga* mediante la expresión transgénica de las distintas isoformas del Sensor. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los observados en el punto 3.4.2 ya que la expresión de FgaB revirtió casi completamente el fenotipo de vaciado de tráqueas observado en los mutantes *fga*¹. Es interesante destacar que con este diseño experimental, fuimos capaces de detectar cierto nivel de actividad por parte de FgaA, puesto que la expresión de esta isoforma redujo la incidencia del fenotipo de vaciado de los mutantes *fga*¹, aunque sin llegar a revertirlo completamente. (FIGURA 22G). En su conjunto, este último punto lleva a considerar que si bien ambas isoformas pueden revertir en distinto grado los fenotipos observados en los mutantes *fga*¹, la isoforma FgaB parece ser más activa que FgaA.

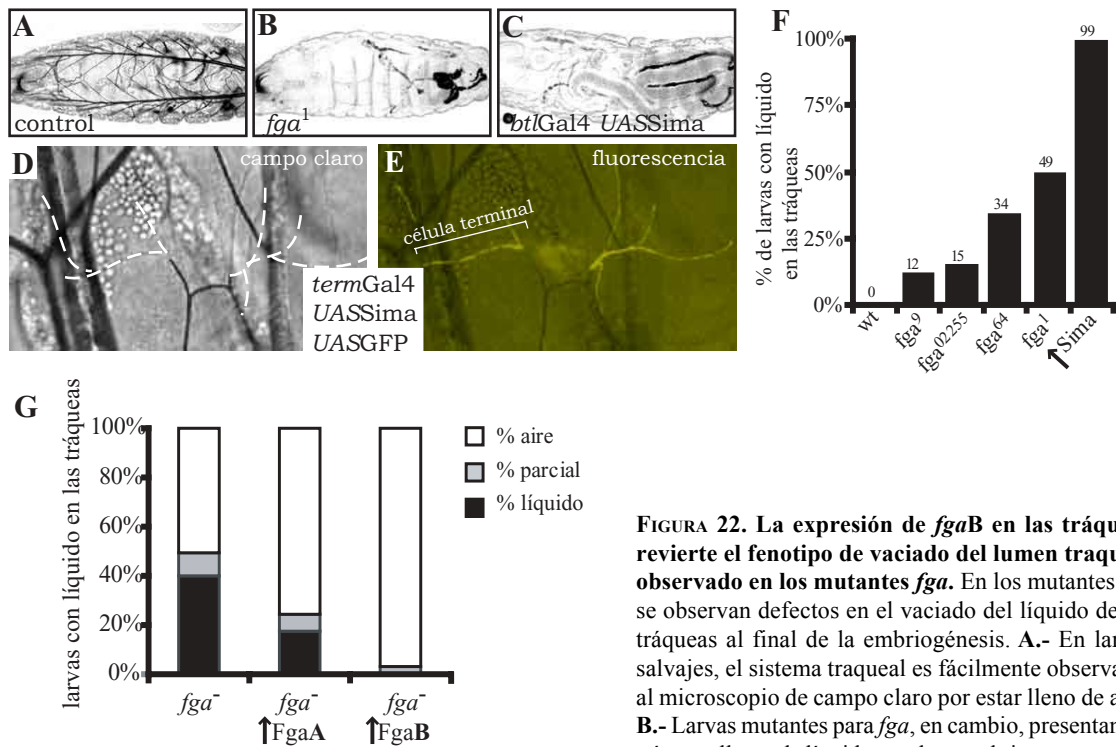


FIGURA 22. La expresión de *fgaB* en las tráqueas revierte el fenotipo de vaciado del lumen traqueal observado en los mutantes *fga*. En los mutantes *fga* se observan defectos en el vaciado del líquido de las tráqueas al final de la embriogénesis. **A.-** En larvas salvajes, el sistema traqueal es fácilmente observable al microscopio de campo claro por estar lleno de aire. **B.-** Larvas mutantes para *fga*, en cambio, presentan las tráqueas llenas de líquido, por lo que el sistema traqueal es difícil de observar al microscopio de campo claro.

C.- Larvas que sobre-expresan la proteína Sima en las tráqueas (*btGal4 UASSima*) muestran los mismos fenotipos de vaciado traqueal que los mutantes *fga*. **D.-** Cuando la proteína Sima fue hiper-expresada en una única célula traqueal mediante la utilización del promotor específico *TermGal4*, generó los fenotipos de vaciado de un modo célula-específico. La línea de puntos indica el lumen lleno de líquido exclusivamente en la célula terminal. **E.-** La co-expresión en la célula terminal de las tráqueas de GFP junto con Sima reveló que si bien el lumen de esta célula terminal no se puede observar al microscopio de campo claro por estar lleno de líquido, sí pueden visualizarse por microscopía de fluorescencia a través de la expresión de GFP; estas ramas traqueales presentan una morfología normal. **F.-** los diferentes alelos de *fga* tienen distintos grados de penetrancia en cuanto al fenotipo de vaciado traqueal. **G.-** Los distintos transcritos de *fga* fueron hiperexpresados en las tráqueas de larvas mutantes para *fga*, y se analizó la proporción de larvas con tráqueas llenas de líquido en cada caso. La sobre-expresión de *fgaB* revirtió casi totalmente los defectos de vaciado de tráqueas de los mutantes *fga*; tras la expresión de Fga A, la reversión del fenotipo de vaciado fue parcial.

3.4.4 FATIGAB REVIERTE LA LETALIDAD DE MUTANTES *fatiga*.

La reversión de los fenotipos observada tras la sobre-expresión de FgaB en los mutantes *fga* nos llevó a preguntarnos si la re-expresión de esta isoforma era suficiente para restaurar el desarrollo de mutantes *fga*. Se analizó entonces si este era el caso; mutantes *fga* que expresaban ubicuamente FgaA o FgaB fueron comparados con mutantes simples en función del estadio del desarrollo en el que morían. Mientras que en los mutantes *fga*¹ las larvas no se desarrollan más allá del 2^{do} estadio larval, los mutantes *fga*¹ que expresaban FgaA llegaban hasta estadios pupales, pero no alcanzaban el estadio adulto. Los mutantes *fga*¹ que expresaban FgaB, en cambio, revirtieron totalmente la letalidad, recobrando la capacidad de desarrollarse hasta el estadio adulto (FIGURA 23). También utilizando el criterio de reversión de letalidad, concluimos por lo tanto que FgaB es más activo que FgaA.

$$hsGal4 ; \frac{fatiga^-}{*} / BalGFP \times \frac{fatiga^- \text{ UASFatiga A, B ó C}}{*} / BalGFP$$

	L ₁	L ₂	L ₃	Sorting ↓ P	Ad
<i>fga</i> ¹	+	-	-	-	-
hsGal4; UASFgaA <i>fga</i> ¹	++	++	++	+	-
hsGal4; UASFgaB <i>fga</i> ¹	++	++	++	++	+

FIGURA 23. La expresión ubicua de *fgaB* revierte la letalidad de los mutantes *fga*. Las construcciones UASFgaA y UASFgaB se recombinaron genéticamente en un cromosoma que presenta la mutación *fga*¹. Las moscas se cruzan por una línea transgénica que posee una construcción donde el promotor de la HSP70 murino, que es inducible por calor, dirige la expresión de Gal4 (*hsGal4*). La progenie resultante fue sometida a golpes de calor diarios de 30 minutos de duración modo que expresaba ubicuamente sólo una de las isoformas de Fga en un contexto mutante para el resto de las isoformas del Sensor. La inducción diaria de estas construcciones resultó en un incremento en la supervivencia de los mutantes, siendo máxima para el caso de *fgaB*. (+) denota la presencia de larvas mutantes en el estadio analizado; (-) significa que no se encontraron larvas del estadio analizado.

4.- DISCUSIÓN

4.1 IDENTIFICACIÓN DEL SENSOR DE OXÍGENO DE *DROSOPHILA* Y LOS EFECTOS DE LA PÉRDIDA DE SU FUNCIÓN

En el presente capítulo se describió la estrategia utilizada para identificar moduladores de la respuesta a hipoxia y cómo dicha estrategia nos llevó a individualizar una región genómica de interés, que luego resultó albergar al gen que codifica para el Sensor de Oxígeno de la mosca. Hasta aquel momento, no se tenía información sobre cuál era la consecuencia fisiológica de la falta del Sensor Molecular de Oxígeno en metazoos superiores. La generación de mutantes específicos nos permitió realizar experimentos genéticos que brindaron datos interesantes sobre las consecuencias que tiene en un animal intacto la falta de sensado de oxígeno.

4.1.1 REQUERIMIENTO DE FATIGA PARA LA PROGRESIÓN DEL DESARROLLO.

Demostramos que el gen que codifica para el Sensor de Oxígeno, al que denominamos *fatiga*, es necesario para la progresión del desarrollo de la mosca. Los mutantes *fga* mostraron estabilizada a la proteína Sima, único blanco de hidroxilación reportado para las PHDs hasta el momento y la estabilización constitutiva de Sima les lleva a tener la respuesta transcripcional a hipoxia permanentemente activada. Un punto particularmente interesante fue que la activación de la respuesta transcripcional en alelos hipomórficos débiles de *fga* no es ubicua, sino que está acotada al sistema traqueal, tal como lo evidenció la expresión en ese tejido del reportero transcripcional *2xldhGal4 UASGFP*. Estos resultados van de la mano con observaciones realizadas sobre moscas salvajes expuestas a hipoxia, en las que la respuesta transcripcional dependiente de Sima también se hace evidente primero en tráqueas, posicionando a este tejido como el más sensible a caídas en los niveles de oxígeno. De esta manera, el sistema responsable de llevar O₂ a las distintas células del organismo es el primero en responder a disminuciones en la concentración de O₂. Más adelante, en el Tercer Capítulo de esta Tesis, veremos que la respuesta transcripcional a hipoxia que ocurre dentro de las tráqueas es importante en la remodelación de este sistema de distribución de oxígeno, cuando los niveles de oxígeno se encuentran comprometidos.

4.1.2 EFECTOS DE LA FALTA DE FATIGA EN EL VACIADO DE LAS TRÁQUEAS.

Dentro de los fenotipos inesperados que encontramos en los mutantes *fga*, están las fallas en el VACIADO DEL LUMEN DE LAS TRÁQUEAS. Revisando la escasa literatura existente sobre el tema, nos llamó la atención que los genes involucrados en este proceso codifican para canales de sodio y son homólogos a los genes que participan en el VACIADO DEL LÍQUIDO DE LOS PULMONES en los mamíferos (Liu et al., 2003). La disfunción de estos canales de sodio en humanos llevan a patologías diversas tales como los edemas pulmonares que ocurren cuando los alpinistas se encuentran a alturas extremas. Curiosamente, se demostró que los niveles de oxígeno regulan la ubiquitinación de estos canales mediada por la E3 ubiquitin ligasa Nedd4 (Debonneville and Staub, 2004; Fouladkou et al., 2004; Planes et al., 2002; Richard et al., 2003; Snyder et al., 2004). En el laboratorio analizamos reporteros transcripcionales de los genes *pickpocket*, que en *Drosophila* codifican

para los homólogos de estos canales de sodio, y no detectamos anomalías en la expresión de estos reporteros en las tráqueas de los mutantes *fga* (resultados no mostrados). Los fenotipos observados, entonces, podrían deberse tal vez a modificaciones post-transcripcionales de los canales de sodio *pickpocket*.

4.2 CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LOS SENSORES MOLECULARES DE OXÍGENO DE LAS DISTINTAS ESPECIES

4.2.1 FUNCIONALIDAD DIFERENCIAL DE LAS HIDROXILASAS.

En la gran mayoría de los mamíferos analizados se encontraron al menos tres PHDs codificadas por genes diferentes. Pronto se comenzó a estudiar el posible rol diferencial de cada una de ellas, como así también a analizar cuáles podían ser los tejidos particulares en los que se expresen y cuáles los estímulos que controlan la transcripción de cada uno de estos genes. Se reportó que aún cuando todas las hidroxilasas son funcionales sobre HIF- α , la actividad catalítica es muy distinta dependiendo de la subunidad α analizada (Appelhoff et al., 2004). Se encontró que PHD2 tendría un efecto mayor sobre HIF-1 α mientras que PHD1 y PHD3 lo tendrían sobre HIF-2 α , sugiriendo que PHD1, PHD2 y PHD3 podrían ser no redundantes. En *Drosophila*, nosotros encontramos que existe un único locus para PDHs, el locus *fga*. Curiosamente, de este locus se originan al menos tres transcritos diferentes que dan origen a tres proteínas también diferentes. Uno de estos transcritos, Fga A, es homólogo a PHD2 por la presencia de un dominio presente en el extremo N-terminal, llamado MYND. Los otros dos transcritos codifican isoformas similares a PHD3, que si bien dan origen a proteínas distintas que difieren en 33 aminoácidos la una de la otra, no hemos sido capaces de encontrar en esta región secuencias relevantes o péptidos señal que otorguen una localización subcelular diferencial.

En *Drosophila* las tres isoformas de Fga están codificadas por un mismo gen, de modo que la disrupción de ese único locus resulta en la pérdida de todas las isoformas. Mediante la generación de líneas transgénicas que expresan FgaA ó FgaB por separado, restauramos a cada una de ellas en una mosca mutante para todas las isoformas de Fga, y analizamos así si existe funcionalidad diferencial. Siguiendo esta estrategia experimental, pudimos inferir que la actividad de FgaB es mayor que la actividad de FgaA, a juzgar por los fenotipos de encendido de reportero *2xldhGal4 UASGFP*, el rescate de los defectos en el vaciado de tráqueas y la capacidad de completar el desarrollo hasta estadios adultos. Estos resultados sugieren que en *Drosophila*, al igual que en mamíferos, las PHDs podrían tener funciones diferenciales.

4.2.2 LA POSIBLE FUNCIÓN DEL DOMINIO MYND DE FGAA/PHD2/EGL-9.

Otro dato curioso lo constituye la existencia de un dominio proteico adicional al dominio de hidroxilación en al menos una de las PHDs descriptas en cada organismo. Tanto la única hidroxilasa de *C. Elegans*, EGL-9 como FgaA de *Drosophila* y la PHD2 humana poseen un dominio MYND en el extremo N-terminal, que debe su nombre a las primeras proteínas en las que este dominio fue identificado, Myeloid translocation protein 8, Nery, y DEAF1. El dominio MYND es rico en Cisteínas y forma estructuras del tipo DEDOS DE ZINC, donde Cisteínas o Histidinas se

asocian con un átomo de ese metal formando las estructuras características mostradas en la FIGURA 8A.

4.2.2.1 EL DOMINIO MYND COMO REPRESOR TRANSCRIPCIONAL. Históricamente, se consideró al dominio MYND como un dominio involucrado en interacciones proteína-proteína, pero más adelante se demostró que proteínas conteniendo dominios MYND se unen a secuencias PxLxP de Factores de Transcripción reprimiendo la actividad transcripcional. La proteína BS69, una proteína nuclear presente en cultivos de células de mamíferos, contiene un dominio MYND característico, y reprime la actividad transcripcional de varios factores de transcripción distintos como E1A, EBNA2 (Epstein-Barr virus oncoprotein) y MGA (Myc-related cellular protein) (Ansieau and Leutz, 2002). Por reprimir la actividad de factores de transcripción oncogénicos, BS69 está considerado como un supresor de tumores. El mecanismo mediante el cual se genera la represión transcripcional mediada por el dominio MYND de BS69 no ha sido caracterizado, pero recientemente se reportó que la interacción entre BS69 y E1A a través del dominio MYND resulta en la inhibición de un evento de ubiquitinación sobre E1A, el cual controla la vida media de esta proteína. Es interesante destacar que existen entonces similitudes entre las proteínas E1A y Sima: ambas son Factores de Transcripción cuya estabilidad está regulada por ubiquitinación. Adicionalmente, hemos detectado en Sima dos regiones que presentan la secuencia característica de interacción con el dominio MYND, PxLxP, existentes también en E1A y responsables de la interacción física y funcional BS69-E1A.

La existencia de una PHD que incluye el dominio MYND en cada uno de los modelos en los que se reportó la presencia de las hidroxilasas de HIF- α (EGL-9 en *C.elegans*, FgaA en *Drosophila*, y PHD2 en mamíferos) sugiere que este dominio tiene una relevancia funcional que se ha mantenido a lo largo de la evolución. Se puede entonces especular sobre una posible función de FgaA/PHD2 ejercida sobre Sima/HIF- α dependiente del dominio MYND pero independiente de su actividad prolil hidroxilasa. En este sentido, se reportó recientemente que PHD2 puede funcionar sobre HIF- α como represor transcripcional de un modo independiente de su dominio prolil hidroxilasa (To and Huang, 2005). Curiosamente, los autores ni siquiera especulan sobre la posibilidad de que el dominio MYND sea el responsable de la represión transcripcional que reportan, aún cuando es el único dominio exclusivo de PHD2. Será interesante analizar en un futuro, para descartar o confirmar al dominio MYND como responsable de la represión transcripcional sobre HIF-1, si variantes de PHD2 sin el dominio MYND son igualmente capaces de silenciar la transcripción de HIF.

4.2.2.2 EL DOMINIO MYND COMO INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD HIDROXILASA. Existe un reporte sobre el dominio MYND de PHD2 que lo propone como un dominio inhibitorio de la actividad hidroxilasa: si bien PHD2 es la más activa de las PHDs humanas, en un experimento en el que se le quitó el dominio MYND su actividad aumentó más aún (Choi et al., 2005). Sin embargo, no se conoce aún el mecanismo mediante el cual el dominio MYND ejerce la inhibición parcial sobre el dominio de hidroxilación en la PHD2. Estos datos permiten un nuevo análisis de los experimentos de funcionalidad diferencial de las isoformas FgaA y FgaB. En nuestros estudios iniciales, asumimos

que FgaA era homóloga a PHD2 por la presencia del dominio MYND, mientras que FgaB sería homóloga a PHD3, una hidroxilasa más pequeña que PHD2 y sin dominios adicionales al dominio prolil hidroxilasa. Un segundo análisis, a la luz de los resultados presentados por Choi y colaboradores (Choi et al., 2005), sería que FgaB podría ser una variante de FgaA pero sin el dominio MYND. Nuestros experimentos utilizando las distintas hidroxilasas para rescatar los fenotipos observados en los mutantes homocigotas *fga* indicaron que FgaB es más activa que FgaA, y esto es compatible con la mayor actividad reportada para la PHD2 desprovista del dominio MYND (Choi et al., 2005). En esta misma línea, se ha reportado para otras proteínas que presentan dominios MYND, la existencia de isoformas idénticas que no tienen este dominio (variantes MYND-less). Estas variantes MYND-less se generan, al igual que en el caso de Fga, por un mecanismo de splicing alternativo donde el exón que codifica el dominio MYND no se incluye en el mensajero maduro (Kozu et al., 2005). La regulación de la actividad proteica por la presencia o exclusión de este dominio particular recién está comenzando a ser estudiada (Kozu et al., 2005).

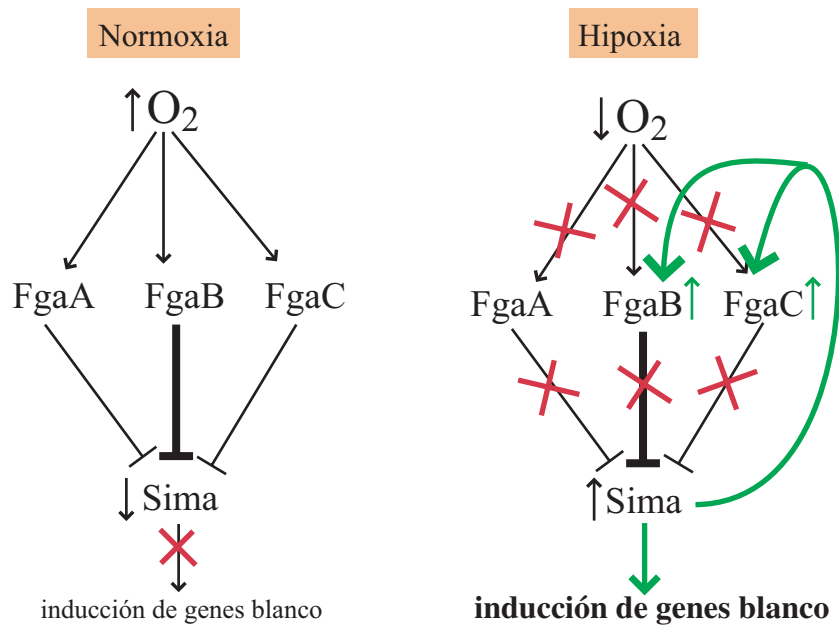
4.2.3 DETECCIÓN DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DEL SENSOR.

Uno de los acercamientos llevados a cabo durante el presente trabajo de Tesis para el estudio del Sensor de Oxígeno de la mosca fue la generación de anticuerpos específicos para cada una de las isoformas de Fatiga, trabajo que se realizó en el contexto de la Tesina de Licenciatura del ahora Licenciado Juan Mondotte –presentada en Marzo de 2005. Juan Mondotte generó un anticuerpo policlonal específico contra Fga A –de hecho, contra el dominio MYND (Ab α MYND)- y otro anticuerpo, también policlonal, que reconocía una región de la proteína común a todas las isoformas (Ab α FgaComún). Estos anticuerpos funcionaban reconociendo específicamente a cada una de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* -Ab α Fgacomún reconocía a FgaA, FgaB y FgaC, mientras que Ab α MYND reconocía sólo a FgaA. Cuando sobre-expresamos cada una de las isoformas en moscas transgénicas, notamos con sorpresa que a pesar de detectarse altos niveles de mRNA de cada una de ellas en las líneas transgénicas correspondientes, sólo podíamos detectar con el anticuerpo a la proteína FgaA, y en ningún caso a FgaB o a FgaC. Un fenómeno similar fue reportado en cultivos celulares humanos donde, pese a detectarse altos niveles del mRNA de PHD3, los niveles proteicos se encontraban siempre cerca del límite de detección (Appelhoff et al., 2004). Decidimos entonces investigar si había algún tipo de control post-transcripcional sobre alguna de las isoformas en particular. En ese sentido, las posibilidades eran: **1.-** un control de la estabilidad proteica, donde FgaB y FgaC fueran rápidamente degradadas, ó **2.-** algún mecanismo que bloqueara la traducción de esos mensajeros particulares (*fgaB* y *fgaC*, que codifican para las proteínas no detectables, comparten gran parte del 5'utr, mientras que *fgaA* tiene un 5'utr distinto). Ensayos de *pulse-chase* con aminoácidos marcados con ³⁵S-Metionina en células S2 de *Drosophila* revelaron que las vidas medias de la FgaA, FgaB y FgaC no difieren significativamente, siendo en todos los casos superior a los 60 minutos (datos no mostrados) – hecho observado luego en las PHDs de mamíferos (Nakayama et al., 2004)- por lo que la hipótesis de una estabilidad diferencial de las PHDs fue descartada. La posibilidad de que exista un

mecanismo de control traduccional mediado por los *utrs* de *fgaB* y *fgaC* está siendo testeada en la actualidad en el laboratorio.

4.2.4 ISOFORMAS DEL SENSOR INDUCIBLES POR HIPOXIA.

En ensayos utilizando sistemas celulares de mamíferos, se encontró que dos de las tres hidroxilasas eran inducibles por hipoxia y que esta inducibilidad dependía de las líneas celulares analizadas. En la mayoría de las líneas celulares, PHD2 y PHD3 son inducibles por hipoxia de manera dependiente de HIF mientras que PHD1 no lo es (Epstein et al., 2001). En *Drosophila*, nosotros encontramos que *fgaB* y *fgaC* son inducibles en hipoxia mientras que *fgaA* no se induce. Si bien no se mantiene el patrón de inducibilidad reportado en mamíferos sobre la hidroxilasa que presenta el dominio MYND, sí se mantiene el hecho de que sólo algunas de las hidroxilasas son inducibles por HIF (ver Modelo Capítulo 1).



MODELO 1. Fatiga, el Sensor de oxígeno en *Drosophila*, es un gen inducible por hipoxia y por Sima. En NORMOXIA, el oxígeno disponible permite la hidroxilación de Sima por las distintas isoformas de Fatiga, promoviendo la degradación de Sima. En HIPOXIA, la actividad enzimática de las hidroxilasas se encuentra disminuída por se el oxígeno un co-sustrato de la reacción de hidroilación. La proteína Sima entonces no es degradada y funciona como factor de transcripción induciendo la expresión de un gran número de genes, entre los que se encuentran los transcritos *fgaB* y *fgaC*.

Mucho se ha especulado sobre el significado fisiológico de la inducción de las hidroxilasas en hipoxia, debido a la naturaleza un tanto contradictoria de esta regulación: es necesario estar en una condición (hipoxia) en la que las hidroxilasas no funcionen sobre HIF- α para que éste se estabilice y transactive genes blanco entre los que están las propias PHDs y, por otro lado, en esta situación (hipoxia) no se espera que las nuevas moléculas de las PHDs inducidas tengan actividad catalítica. Diversas líneas de investigación tratan de explicar este fenómeno desde distintos acercamientos: **1.-** análisis farmacológicos llevaron a proponer que las proil hidroxilasas

dependientes de oxígeno y 2-oxoglutarato son enzimas de “no-equilibrio”, o sea, que la abundancia proteica afectaría su actividad, esto es la tasa de hidroxilación sobre HIF- α . **2.-** estudios celulares demostraron que HIF- α se degrada más rápido cuando las células en las que se expresa estuvieron previamente expuestas a hipoxia debido a la inducción de las PHDs, lo que posiciona a estas enzimas como relevantes en procesos de re-oxigenación celular –la acumulación de las PHDs en hipoxia permite un silenciamiento más rápido de la transcripción dependiente de HIF. **3.-** Se demostró luego que estas hidroxilasas pueden ser FUNCIONALES SOBRE HIF-A AÚN EN CONDICIONES DE HIPOXIA (Appelhoff et al., 2004), pero a un nivel menor que en normoxia. Cultivos celulares mantenidos en hipoxia y depletados de alguna de las PHDs inducibles muestran mayores niveles de HIF- α que los que no han sido depletados. **4.-** recientemente se reportó que PHD2, que en sistemas celulares es inducible en hipoxia por HIF, PUEDE FUNCIONAR COMO REPRESOR TRANSCRIPCIONAL aún en hipoxia de un modo independiente de su actividad hidroxilasa (To and Huang, 2005) . Todas estas observaciones experimentales aportan datos para encontrarle un sentido biológico a la inducibilidad de las hidroxilasas en hipoxia y todos ellos tienen que ver con la existencia de un circuito de control negativo que controla en cierta medida la estabilidad y la actividad de HIF- α en hipoxia.

5.- CONCLUSIÓN.

En este Capítulo hemos reportado la generación de nuevos mutantes para el Sensor de Oxígeno de *Drosophila*, Fatiga, y determinamos que el Sensor es necesario para la progresión del desarrollo y el vaciado de las tráqueas hacia el final de la embriogénesis. La mosca tiene un único locus génico para *fga*, pero por inicio alternativo de la transcripción y *splicing* alternativos genera tres transcritos distintos, *fgaA*, *fgaB* y *fgaC*, y sólo dos de ellos, *fgaB* y *fgaC*, son inducibles por hipoxia. Las proteínas resultantes tienen funcionalidad diferencial, donde la única de ellas capaz de restaurar la viabilidad a un mutante *fga* es FgaB, producto de uno de los transcripos inducibles por bajos niveles de oxígeno.

CAPÍTULO SEGUNDO

LA VÍA DE RESPUESTA A HIPOXIA FGA/SIMA

MODULA EL CRECIMIENTO CELULAR

1.-INTRODUCCIÓN

En el capítulo previo se reportó la identificación del SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO de *Drosophila*, Fatiga, y se describieron fenotipos asociados a la falta de función de este gen, incluyendo una respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activa, problemas en el vaciado del sistema traqueal y letalidad en estadios larvales. Vimos también que estos fenotipos descriptos para la pérdida de función de Fatiga se correspondían con los de ganancia de función de Sima: allí donde Sima se acumulaba, las tráqueas mostraban acumulación del líquido y la respuesta transcripcional a hipoxia se activaba. Por otra parte, la sobre-expresión ubicua de Sima producía letalidad temprana, coincidiendo con la letalidad temprana observada en los mutantes *fga*. De todos modos, estos datos sólo nos permitían correlacionar el fenotipos de pérdida de función de *fga* con el fenotipo de ganancia de función de Sima. Para investigar si Sima era realmente el causante de los fenotipos observados en los mutantes *fatiga*, necesitábamos mutantes para Sima, los cuales no existían en ese momento.

1.1 SISTEMAS CELULARES VS MODELOS ANIMALES.

Como se detalló más arriba, la mayoría de los avances en la identificación de componentes celulares de la maquinaria de respuesta a hipoxia se produjeron mediante la utilización de sistemas de células en cultivo. Sin dudas, estos sistemas resultan muy prácticos a la hora de estudiar los requerimientos y mecanismos celulares de un proceso determinado. Sin embargo, una vez identificados los componentes principales, es necesario el estudio de estos componentes en organismos enteros para definir su función fisiológica en los distintos tipos celulares, órganos y sistemas funcionales. Estudios celulares no pueden responder –aunque sí permiten inferir o especular- qué sucederá cuando un individuo carezca de determinada molécula, o de cierta vía de señalización. De allí la utilidad de poder modelar procesos/respuestas/enfermedades en organismos sencillos que permitan estudios que vayan más allá de lo que pueda acontecer en un único tipo celular. Se puede evidenciar en cultivos celulares que la transcripción de VEGF aumenta en respuesta a la estabilización de HIF-1 α , pero sólo puede apreciarse en un organismo intacto que los vasos sanguíneos responden dirigiéndose al área que experimenta hipoxia. En cultivos celulares también puede medirse la inducibilidad de la EPO en hipoxia, pero sólo en un individuo entero es posible analizar cómo esto resulta en un incremento del hematocrito. Lo mismo vale para otros sistemas: en neuronas en cultivo puede analizarse el procesamiento del péptido amiloide, por ejemplo, pero las consecuencias conductuales de este clivaje -o de su falta- sólo pueden analizarse en el contexto de un sistema nervioso intacto y funcional. ¿En qué sitios del cerebro ocurre? ¿En qué momento de la vida se es más vulnerable? ¿Ante qué estímulos fisiológicos se desencadena?

1.1.1 HIF-1 EN LOS DISTINTOS MODELOS ANIMALES.

Para el caso de los genes con los que se trabajó en esta Tesis, *sima/hif- α* y *fatiga/phd*, existían en los modelos de vertebrados clásicos -Zebrafish, Rata, Ratón- varias isoformas para cada uno de ellos. Se han reportado por lo menos cuatro subunidades α distintas para HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , HIF-4 α) y también tres Prolil-Hidroxilasas que modifican a HIF (PHD-1, PHD-2, y PHD-3), todas ellas codificadas por distintos genes. Estudios de pérdida de función mediante la utilización de ratones *knock-out (KO)* presentaban el inconveniente de la redundancia génica, donde mutantes para alguno de estos genes podían tener fenotipos menos aparentes por la existencia de otra isoforma que pudiera suplir las funciones del mutante. Aún así, se han reportado líneas de ratones *KO* para HIF-1 α donde los mutantes presentan alteraciones en el sistema vascular, en la formación del corazón, del cerebro, de cartilagos y de la placenta (Adelman et al., 2000; Covello and Simon, 2004; Iyer et al., 1998; Pfander et al., 2004; Tomita et al., 2003). Estos fenotipos se originan durante el desarrollo temprano de modo tal que los mutantes son letales en estadios embrionarios, no obteniéndose adultos HIF-1 α *-/-*. Sigue sin estar claro hasta qué punto estos ROLES DESCRIPTOS PARA HIF-1 α en el desarrollo dependen de la concentración de oxígeno disponible en el útero murino durante la embriogénesis o si, por el contrario, responden a mecanismos de regulación independientes de O₂. Tampoco está claro si las hidroxilasas juegan algún rol en este proceso, ya que ratones *KO* para cada una de las distintas PHDs no presentan fenotipos evidentes (Peter Ratcliffe, comunicación personal), no existiendo aún mutantes triples para PHD-1, PHD-2 y PHD-3. La existencia en *Drosophila* de un único locus tanto para *fatiga* como para *sima* permitía un análisis de mutantes más sencillo donde, a pesar de la existencia de múltiples transcritos con funciones diferenciales, bastaba con mutar un único locus para analizar la falta de función del gen elegido –que de hecho es lo que se hizo en el capítulo previo para el gen *fga*. En el presente capítulo se llevará a cabo un acercamiento similar para el otro gen involucrado, *sima*, y se irá luego un paso más adelante, combinando las dos mutaciones para ver cuáles de los efectos de la falta de *fga* se deben a la sobre-acumulación de Sima y qué efectos de la pérdida de *fga* son independientes de Sima.

1.2 LA FALTA DE OXÍGENO RESULTA EN DEFECTOS EN EL CRECIMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE LA INACTIVACIÓN DE FATIGA

1.2.1 LOS NIVELES DE OXÍGENO DISPONIBLE AFECTAN EL TAMAÑO CORPORAL.

Hacia fines de la década de los 70's se realizaron estudios fisiológicos que demostraban que el porcentaje de oxígeno al cual una mosca era crecida influía en su tamaño corporal (Palos and Blasko, 1979). En ese trabajo se midieron además parámetros generales como la tasa de ovipuesta, el porcentaje de sobrevivida y el tamaño corporal de las larvas crecidas a distintas concentraciones de oxígeno. Niveles reducidos de O₂ resultaron en larvas más chicas, indicando que existiría una correlación entre el oxígeno disponible en el ambiente y la tasa de crecimiento posible bajo esas condiciones particulares. Más tarde, se demostró que moscas crecidas en hiperoxia (40% O₂) exhibían el fenotipo contrario, es decir eran más grandes que los controles

crecidos en normoxia (Frazier et al., 2001). En este último trabajo, se vio además que los fenotipos de crecimiento en hipoxia reportados previamente podían resultar más severos si las moscas eran crecidas a temperaturas mayores. De todos modos, cómo es que la condición ambiental podía repercutir en el tamaño final de estos insectos permaneció como una incógnita sin respuesta. Las especulaciones apuntaban a que, a bajas concentraciones de oxígeno, las mitocondrias fallarían en generar suficiente energía (ATP) y esto se traduciría en una deficiencia en el crecimiento –como para varios otros procesos demandantes de ATP. Sin embargo, experimentos llevados a cabo en embriones de *Drosophila* demostraron que una exposición prolongada a 2 %O₂ –una hipoxia mucho más severa que la que producía los fenotipos de crecimiento- no generaba una reducción en los niveles de ATP celulares (DiGregorio et al., 2001). De este modo, supusimos que debería existir algún mecanismo directo que vincule los niveles de oxígeno disponibles y la tasa de crecimiento corporal y celular.

1.2.2 CRECIMIENTO CELULAR VS. PROLIFERACIÓN.

Cuando se habla de crecimiento, es importante establecer una diferencia entre dos fenómenos diferentes: **1.-** eventos que lleven a producir células más grandes, esto es células con MAYOR MASA, y **2.-** eventos que lleven a producir un MAYOR NÚMERO de células mediante un aumento en la proliferación celular. Ambos procesos contribuyen al tamaño final que adopte un tejido, un órgano o un organismo. Como se describió previamente en el punto 6 de la Introducción General, los estadios larvales de los insectos se caracterizan por su alta tasa de crecimiento. La mayor parte de este fenómeno resulta del crecimiento celular -y no del aumento en el número de células- en los tejidos endorrepletivos. El crecimiento celular en estos tejidos viene acompañado de un aumento en el número de copias del genoma que exhiben estas células, puesto que en los tejidos endorrepletivos, las células atraviesan múltiples rondas de síntesis de DNA sin división celular. Así, cada una de las células de la epidermis, de las tráqueas, de las glándulas salivales, del cuerpo graso o de los intestinos de una larva de tercer estadio pueden llegar a tener más de mil copias de su genoma. De este modo, en tejidos endorrepletivos el tamaño del núcleo es buena medida del tamaño total de la célula, puesto que el crecimiento de la última depende del tamaño del primero.

Por otro lado, hacia finales del último estadio larval también se da un incremento de la proliferación celular, puntualmente en los discos imaginales -aquellos primordios celulares que darán origen a las estructuras adultas. En el disco imaginal de ojo, por ejemplo, sólo existen alrededor de 40 células en los primeros estadios larvales, que durante la metamorfosis dan origen a las más de 5000 células que forman el ojo adulto. Entonces, tanto el tamaño celular como la proliferación celular son procesos abordables durante la vida de la mosca, aunque en estadios y/o tejidos diferentes.

1.2.3 LAS DISTINTAS VÍAS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO DE *DROSOPHILA*.

Drosophila ha sido un modelo muy utilizado en el estudio de cómo el crecimiento celular está controlado genéticamente, e innumerables *screens* tanto de pérdida como de ganancia de función

llevaron a la identificación de varias vías clásicas que controlan el crecimiento, las cuales resultaron estar conservadas en vertebrados: la vía Insulina/Akt/Tor (Oldham and Hafen, 2003), la vía Salvador/Warts/Hippo (Hay and Guo, 2003), y las proteínas c-Myc y RAS (Stocker and Hafen, 2000). Además, la CiclinaD/Cdk4 ha sido propuesta como otro factor regulador del crecimiento que funciona de un modo independiente de los mecanismos antes mencionados (Datar et al., 2000; Meyer et al., 2000).

1.2.4 FATIGA MEDIA LOS EFECTOS DE LA CICLINA D/CDK4 EN *DROSOPHILA*.

Moscas mutantes para *cdk4*, el gen de la CiclinaD/Cdk4, son viables en homocigosis pero presentan alterado su crecimiento, de modo que son más pequeñas que los controles salvajes. Por el contrario, la hiper-expresión de CiclinaD/Cdk4 provoca tanto sobre-proliferación como crecimiento celular, dependiendo la naturaleza de las células en las que se la hiper-expresa (Datar et al., 2000; Meyer et al., 2000): **1.**-Cuando la CiclinaD/Cdk4 es hiper-expresada en células pre-mitóticas (que son capaces de seguir dividiéndose) induce la sobre-proliferación celular -típicamente en células proliferativas del disco de ala. **2.**-En cambio, cuando la CiclinaD/Cdk4 es hiper-expresada en células post-mitóticas (células que han dejado de dividirse) provoca un aumento en la masa celular que resulta en células más grandes (típicamente en células diferenciadas de ojo y en tejidos endorreplcativos). Se especuló que los fenotipos de SOBREPROLIFERACIÓN CELULAR causados por la hiper-expresión de CiclinaD/Cdk4 son debidos a su actividad kinasa sobre la proteína Retinoblastoma (pRB). pRB es una proteína que en mamíferos controla la progresión del ciclo celular inhibiendo a los factores de transcripción E2F. La fosforilación de CiclinaD/Cdk4 sobre pRB libera la inhibición que éste ejerce sobre E2F, permitiendo la progresión del ciclo celular y la consecuente proliferación (Korenjak and Brehm, 2005).

Sobre los fenotipos de crecimiento celular causados por la hiper-expresión de CiclinaD/Cdk4, sin embargo, no se tenían siquiera indicios de factores putativamente involucrados. Para encontrar mediadores de esa respuesta, Frei y colaboradores (2004) iniciaron un *screen* genético en el cual expresaron la CiclinaD/Cdk4 EN CÉLULAS POSTMITÓTICAS del ojo de la mosca, generando un claro fenotipo de SOBRECRECIMIENTO CELULAR (FIGURA 24A). Este sobre-crecimiento fue luego analizado en distintos entornos genéticos de pérdida de función, típicamente en moscas heterocigotas para deleciones cromosómicas -en un acercamiento relativamente similar al descrito en el primer Capítulo de esta Tesis. Así, encontraron que la deleción genómica Df(3R) 3-4 revertía los fenotipos de crecimiento del ojo producidos por la hiper-expresión de CiclinaD/Cdk4 y caracterizaron como responsable de esta reversión al gen *fga*, el Sensor de Oxígeno Molecular de *Drosophila* (FIGURA 24A) (Frei and Edgar, 2004). Establecieron que Fga era necesaria para ambos tipos de crecimiento mediados por CiclinaD/Cdk4; crecimiento celular (en el cuerpo graso y en células postmitóticas de ojo) y proliferación celular (células proliferativas en el disco imaginal del ala). También mostraron que células de tejidos endorreplcativos mutantes para *fga* eran MÁS PEQUEÑAS QUE LAS CÉLULAS CONTROL (FIGURA 24B) (Frei and Edgar, 2004). En ese trabajo, Frei y colaboradores discuten sobre los mecanismos mediante los cuales Fga regularía el crecimiento y sugieren que, si bien los efectos están mediados por la actividad hidroxilasa del

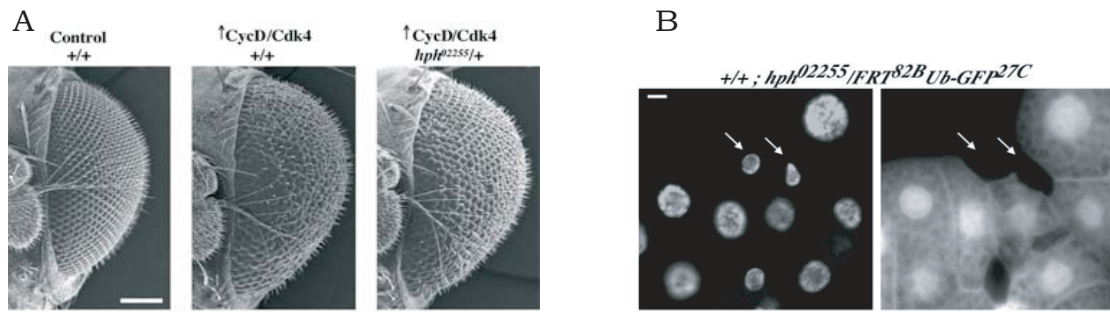


FIGURA 24. Los fenotipos de hiper-expresión de CiclinaD/Cdk4 se revierten por falta de Fga (tomado de Frei and Edgar, 2004). **A.-** Cuando se hiperexpresa CiclinaD/Cdk4 en células postmitóticas del ojo de la mosca, éstas crecen más que las células salvajes, desorganizando la prolija sucesión de omatidias típica del ojo de *Drosophila*. La reducción de los niveles de *fga* revierte este fenotipo, dando lugar a ojos casi normales. **B.-** Células mutantes para *fga* en tejidos endorreproductivos, como el cuerpo gordo, son más pequeñas y presentan núcleos más chicos que las células salvajes. En la figura se identifican a las células mutantes para *fga* por ausencia del marcador molecular GFP (flechas en panel izquierdo y derecho).

Sensor, serían independientes de Sima, su único sustrato conocido. Demostrar si Sima estaba o no mediando los efectos de sobre-crecimiento celular producidos por una caída en los niveles de Oxígeno ó en células deprivadas de Fga constituía un punto saliente en la comprensión de cómo una condición ambiental puede modular el desarrollo y el crecimiento de un organismo entero.

1.3 UNA ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS *IN VIVO* DE LAS FUNCIONES DE FATIGA DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE SIMA.

En el presente capítulo se describe la caracterización del primer mutante de *sima* y se estudian cuáles son las consecuencias funcionales de perder la capacidad de responder a hipoxia en un organismo entero e intacto. Caracterizada esta mutante, generamos una mosca en la que tanto Fga como Sima estuvieran ausentes, construyendo de este modo una herramienta ideal para analizar cuáles de los fenotipos reportados para las mutantes *fga* dependen de la estabilización de Sima y cuáles no. Además, nos permitiría estudiar ahora las consecuencias de suprimir la vía entera de respuesta transcripcional a hipoxia y analizar el desarrollo de los individuos mutantes, a fin de abordar preguntas de fundamental interés en el campo, como por ejemplo: ¿Qué procesos están controlados por Fga de un modo independiente de Sima? ¿Es Sima causante de los fenotipos de CRECIMIENTO CELULAR observados en mutantes *fga*? ¿Qué tan necesaria es la vía de respuesta a hipoxia si el organismo no se encuentra con situaciones adversas en las cuales esta vía es teóricamente requerida?

2.- OBJETIVOS PARTICULARES

LOS OBJETIVOS PROPUESTOS PARA ESTE CAPÍTULO SON:

.-AISLAR UN MUTANTE *sima*

.-ESTUDIAR LAS CONSECUENCIAS DE LA FALTA DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN UN ORGANISMO INTACTO.

.-COMBINAR LAS MUTANTES DE FATIGA Y DE SIMA EN UN MISMO INDIVIDUO PARA PONER EN EVIDENCIA LAS FUNCIONES DE FATIGA DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE LA ACUMULACIÓN DE SIMA.

3.- RESULTADOS

3.1 MOSCAS MUTANTES *sima* VIVEN EN NORMOXIA PERO NO EN HIPOXIA

3.1.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PRIMER MUTANTE *sima* DE *DROSOPHILA*.

Al momento de comenzar esta Tesis, no existía ningún mutante *sima* reportado. Sin embargo, *Sima* estaba propuesto como el homólogo funcional de HIF- α en *Drosophila melanogaster*, principalmente por estudios funcionales *in vitro* (Bacon et al., 1998) y de comparación de secuencias con homólogos de mamíferos (Nambu et al., 1996). En el laboratorio contábamos con líneas de moscas transgénicas que sobre-expresaban *Sima*, y estudios de hiper-expresión mostraron que *Sima* era SUFICIENTE para inducir la respuesta transcripcional a hipoxia de un modo autónomo de célula (Lavista-Llanos et al., 2002). Esto es, allí donde artificialmente se dirigía la expresión de *Sima* se observaba *in vivo* el encendido de un reportero transcripcional inducible por hipoxia.

Para asignarle a *Sima* un rol inequívoco como Factor de Transcripción NECESARIO para la respuesta a hipoxia, se requería un análisis *in vivo* de esta respuesta transcripcional en un contexto genético de pérdida de función de *Sima*. Comenzamos entonces realizando una búsqueda en colecciones de líneas mutantes no caracterizadas, para tratar de identificar alguna que tuviera inserto un transposón dentro del locus *sima* o en su proximidad. Esta búsqueda *in silico* la realizamos en distintas colecciones de mutantes, y encontramos 2 líneas con transposones insertos dentro del locus *sima* (la líneas P12162 del *Bloomington Stock Center* que tiene inserto el elemento Pj11B7, y la línea KG07607 del Laboratorio de Hugo Bellen, Baylor College of Medicine, Houston, USA; de aquí en adelante, *sima*¹²¹⁶² y *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ respectivamente)(FIGURA 25A). Estudios preliminares sugirieron que *sima*¹²¹⁶² no era mutante ya que la proteína era detectable en ensayos de inmunofluorescencia (datos no mostrados). Analizamos entonces a nivel molecular la línea *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ y encontramos en ensayos de Northern blot que larvas homocigotas para esta inserción no expresaban niveles detectables del RNA mensajero de *sima*, a diferencia de controles salvajes que presentaban una banda del tamaño esperado (aprox. 5800 bp) (FIGURA 25A).



FIGURA 25. La inserción KG07607 provoca la pérdida de función de *Sima*. **A.-** locus del gen *sima* mostrando los sitios de inserción de los dos elementos-P candidatos a ser mutantes. **B.-** Northern Blot sobre RNA total extraído de larvas salvajes y de mutantes homocigotas *sima*⁰⁷⁶⁰⁷. No hay niveles detectables del transcrito de *sima* en los mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷.

3.1.2 MUTANTES *sima* TIENEN IMPEDIDA LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA.

Para caracterizar la respuesta transcripcional a hipoxia en las mutantes *sima* y por ende, el rol de Sima en esta respuesta *in vivo*, colocamos la construcción reportera de hipoxia *ldh-LacZ* en el contexto genético de *sima*⁰⁷⁶⁰⁷. Como se ha descrito previamente, embriones salvajes encienden este reportero transcripcional cuando son colocados en hipoxia (3% O₂) durante 4 horas (FIGURA 26). Por el contrario, embriones homocigotas para *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ fueron incapaces de encender el reportero (FIGURA 26). Hasta aquí, entonces, la ausencia de expresión de *sima* se correlaciona con la imposibilidad de una respuesta transcripcional a hipoxia. El experimento definitorio consistiría entonces en restituir una copia del gen *sima* en estas mutantes y recuperar el efecto en la respuesta a hipoxia. Mediante cruzamientos genéticos, generamos una mosca mutante *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ que expresara Sima suplementada transgénicamente. Embriones con este genotipo mostraron una respuesta transcripcional a hipoxia idéntica a la de embriones salvajes, evidenciada por el encendido del reportero transcripcional *ldh-LacZ* (FIGURA 26). Estos resultados indican que Sima es NECESARIA para la respuesta transcripcional a hipoxia en *Drosophila*.

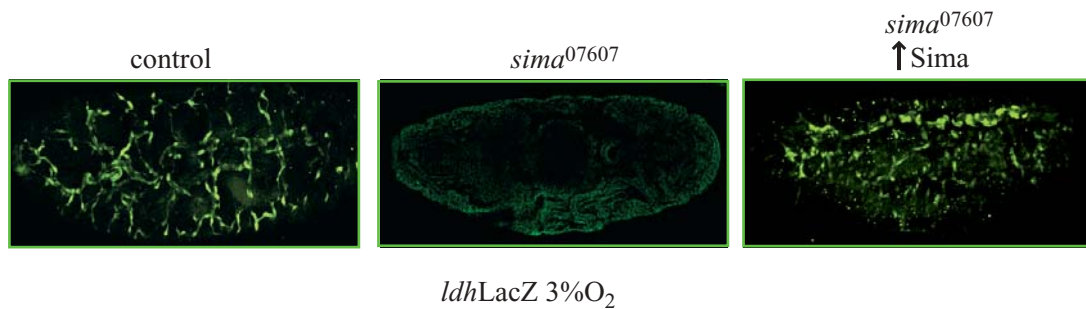


FIGURA 26. Los mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ no responden transcripcionalmente a hipoxia. Mientras que embriones salvajes expresan el reportero *ldhLacZ* en las tráqueas cuando son expuestos a 3% O₂, los mutantes *sima* no lo expresan. Cuando se restauró transgénicamente Sima en los mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ mediante un Gal4 de expresión ubicua e inducible *-hsGal4-*, la respuesta transcripcional a hipoxia se recuperó.

3.1.3 MUTANTES *sima* SOBREVIVEN EN NORMOXIA PERO NO EN CONDICIONES DE HIPOXIA.

La disponibilidad de la mutante *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ nos permitía analizar el rol de este Factor de Transcripción durante el desarrollo normal de *Drosophila*. En otras palabras, nos permitía contestar si la respuesta transcripcional a bajas concentraciones de oxígeno era vital para el desarrollo normal de esta mosca. Para esto, seleccionamos larvas de 1^{er} estadio homocigotas para *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ y analizamos su desarrollo a través del tiempo. Estas mutantes resultaron ser viables hasta estadios adultos y fértiles en ambos sexos (FIGURA 27). La pregunta siguiente era: ¿esta sobrevida de los mutantes *sima* se ve comprometida en condiciones de hipoxia? Para esto, larvas salvajes (controles) y homocigotas mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ fueron colocadas en viales que se expusieron a 21%O₂ ó 5%O₂. Luego de 10 días, se contó cuántas de las larvas de cada genotipo habían alcanzado el estadio pupal. Observamos que, en el caso de los controles, no había diferencias significativas en la sobrevida a 21%O₂ respecto de 5%O₂ (FIGURA 27). En las mutantes *sima*, en cambio, la capacidad de desarrollarse a 5%O₂ estaba seriamente comprometida (FIGURA

27) y en condiciones de hipoxia más severas ninguna larva alcanzó el estadio pupal. Para demostrar que este fenotipo de sobrevivida reducida en hipoxia era debido a la inserción del transposón en el locus *sima*, realizamos cruzamientos genéticos para escindir el transposón y analizar si se recuperaba el fenotipo salvaje. Estas moscas en las que el transposón *KG07607*

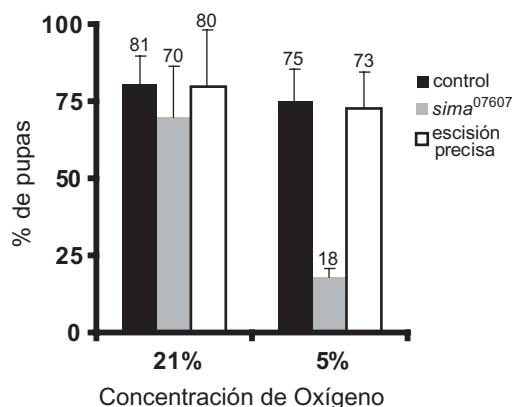


FIGURA 27. Los mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ son viables en normoxia pero no en hipoxia. Porcentajes de sobrevivida de larvas expuestas a 21% ó 5% O₂. Larvas salvajes (barras negras) no vieron afectada la viabilidad hasta estadios pupales cuando fueron crecidas a 5% O₂. Las mutantes *sima* (barras grises) son viables en normoxia (21% O₂) pero murieron mayoritariamente a 5% O₂. Larvas a las que se les escindió el elemento-P causante de la mutación de manera precisa (barras blancas) restauraron el fenotipo salvaje.

fue removido del locus *sima* presentaron una sobrevivida similar a la de las moscas salvajes (FIGURA 27).

En conjunto, los datos de esta sección demuestran que la proteína Sima, y por lo tanto la respuesta transcripcional a hipoxia, no es necesaria para el desarrollo normal de *Drosophila*, pero sí se requiere para que las larvas puedan desarrollarse en condiciones de escasez de O₂.

3.2 EL ENCENDIDO CONSTITUTIVO DEL REPORTERO TRANSCRIPCIONAL DE HIPOXIA EN MUTANTES *fatiga* SE SUPRIME EN DOBLE MUTANTES *fatiga sima*.

En este punto de la Tesis, contábamos con mutantes de las dos principales moléculas de la respuesta transcripcional a hipoxia. Por un lado, habíamos caracterizado mutantes para Sima, la proteína responsable de transcribir genes necesarios para sobrellevar una condición de hipoxia y por otro, habíamos generado en el laboratorio mutantes para el Sensor de Oxígeno Fga que son incapaces de detectar cuánto oxígeno disponible hay. Como recién se mostró, los mutantes *sima* son incapaces de responder transcripcionalmente a hipoxia, aún en condiciones severas de falta de oxígeno. Los mutantes *fga*, por su parte, presentan una respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activada, independientemente de los niveles de oxígeno a los que se encuentren. Ahora, si esta respuesta transcripcional constitutiva de los mutantes *fga* se debía únicamente a la estabilización de Sima, entonces generando un mutante *fga* al que también le faltase Sima deberíamos ver una reversión de este fenotipo particular sobre la respuesta transcripcional a hipoxia. Mediante cruzamientos genéticos generamos una línea que tuviera la dos mutaciones *fga*¹ y *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ en el mismo cromosoma. La presencia de la mutación *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ se evidenció por marcadores del color de la cutícula y de color de ojo presentes dentro del

transposón *KG07607*. Para detectar la presencia de la mutación *fga*¹ se utilizó el criterio de letalidad en homocigosis y se la confirmó luego mediante experimentos de Southern Blot.

Los doble mutantes *fga*¹*sima*⁰⁷⁶⁰⁷ fueron combinados con el reportero transcripcional de hipoxia *2xldhGal4-UASGFP* y la expresión del reportero fue analizada en los embriones resultantes. A diferencia de los mutantes *fga*¹, que tienen constitutivamente activada la respuesta a hipoxia, los doble mutantes *fga*¹*sima*⁰⁷⁶⁰⁷ no expresaron el reportero (FIGURA 28), confirmando que la

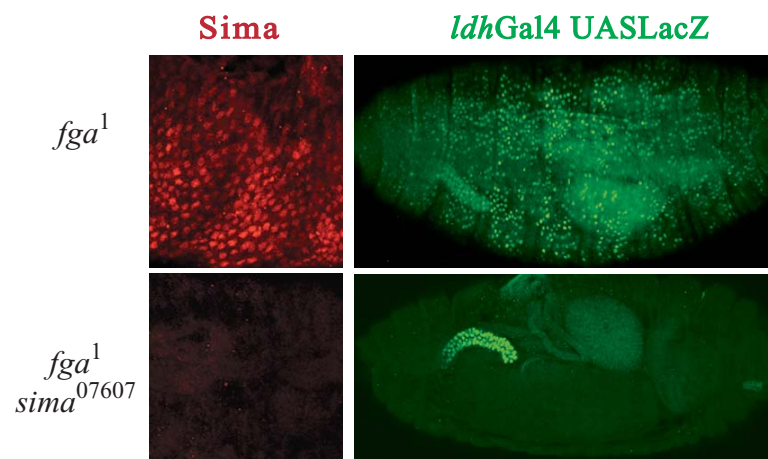


FIGURA 28. La respuesta transcripcional a hipoxia constitutivamente activa de los mutantes *fga* se revierte en los doble mutantes *fga sima*. La tinción por inmunofluorescencia contra Sima reveló que los mutantes *fga* acumulan esta proteína aún en normoxia, lo que resultó en la expresión constitutiva del reportero transcripcional de hipoxia *2xldhGal4 UASGFP*. Los doble mutantes *fga sima* revierten al fenotipo salvaje, ya que ni Sima ni el reportero transcripcional de hipoxia fueron detectables.

desregulación de Sima por falta Fatiga es la causa del fenotipo de activación constitutiva de la respuesta en los mutantes *fga*.

3.3 REVERSIÓN DEL FENOTIPO DE VACIADO TRAQUEAL EN DOBLE MUTANTES *fatiga sima*

Los doble mutantes *fga*¹*sima*⁰⁷⁶⁰⁷ (en adelante *fga sima*) nos permitían entonces analizar cuáles de los fenotipos observados en los mutantes *fga* se debían a la desregulación de Sima. Como se describió más arriba, el llenado de aire del sistema traqueal en larvas era un criterio válido para analizar la funcionalidad del sistema de Sensado Molecular de Oxígeno. Como se ha dicho, larvas salvajes presentan sus tráqueas llenas de aire, lo que hace de estas tráqueas un tejido fácilmente observable al microscopio de campo claro (FIGURA 29A). Las larvas mutantes *fga* presentan líquido en las tráqueas en lugar de aire (FIGURA 29B), lo que las hace apenas visibles y por otro lado, la expresión de Sima en tráqueas es SUFICIENTE para generar este mismo fenotipo (FIGURA 29C). En la FIGURA 29D se muestra que los doble mutantes *fga sima* presentan un fenotipo idéntico al de las larvas salvajes, lo que demuestra que Sima es efectivamente responsable de la acumulación del líquido en las tráqueas observado en los mutantes *fga*.

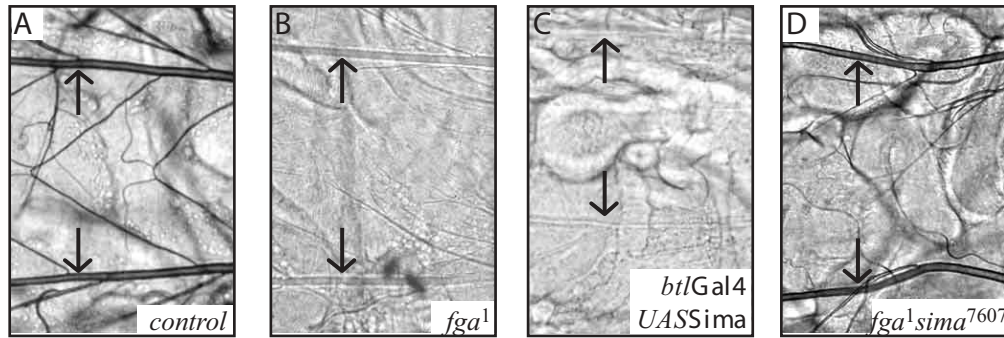


FIGURA 29. El fenotipo de vaciado del lumen traqueal observado en los mutantes *fga* se revierte en doble mutantes *fga sima*. Las tráqueas de los mutantes *fga* continúan llenas de líquido aún en estadios larvales (flechas en **B**), en contraposición a las tráqueas de larvas salvajes que están llenas de aire y son fácilmente observadas al microscopio de campo claro (flechas en **A**). Las larvas *btlGal4 UASSima* que expresan altos niveles de Sima en las tráqueas también tienen las tráqueas llenas de líquido (flechas en **C**). Las tráqueas de los doble mutantes *fga sima* recobran la capacidad de vaciar las tráqueas de líquido y por lo tanto se las ve llenas de aire (flechas en **D**).

3.4 SIMA TAMBIÉN MEDIA LOS EFECTOS DE FATIGA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR Y CORPORAL

La pregunta, una vez más, y ahora enfatizada por los dos resultados anteriores, era: ¿serían todos los efectos de Fga mediados por la estabilización de Sima o por el contrario, Fga tendría roles independientes de Sima? La existencia de un modelo animal en el que existían mutantes para cada uno de los genes involucrados en este proceso (el Sensado de Oxígeno, y la Respuesta Transcripcional a hipoxia), y mutantes combinados de estos mismos genes, proporcionaba un sistema único para responder esta pregunta.

3.4.1 LOS MUTANTES *fatiga*, PERO NO LOS DOBLE MUTANTES *fatiga sima*, TARDAN MÁS TIEMPO EN DESARROLLARSE.

Durante los estadios larvales *Drosophila* se alimenta y crece de tamaño. Este crecimiento en tamaño, y el almacenamiento energético aparejado, es fundamental para enfrentar posteriormente la metamorfosis, evento en el que los tejidos adultos se generan a expensas de la destrucción activa de los tejidos larvales. Existe cierta tolerancia respecto al tamaño final que una larva debe alcanzar para comenzar la metamorfosis pero definitivamente hay tamaños corporales incompatibles tanto con las mudas previas (L1 a L2, L2 a L3) como con la entrada a la pupariación. O sea, la larva debe crecer hasta llegar a un tamaño determinado (tamaño crítico), proceso que en larvas salvajes toma típicamente unos 4 o 5 días desde la eclosión del huevo. En caso de situaciones en las que la tasa de crecimiento se ve disminuida (nutrientes insuficientes, sobrepoblación, etc.), las larvas suelen permanecer como tales durante un período de tiempo adicional, hasta superar el tamaño crítico para luego pupariar. Asimismo, se ha observado que los mutantes de genes que participan en el control del crecimiento celular y corporal (típicamente

mutantes de genes que participan en el control del crecimiento celular y corporal (típicamente mutantes en genes de la vía de respuesta a insulina y en la vía TOR) permanecen como larvas más días que los controles salvajes (Radimerski et al., 2002; Stocker et al., 2003).

De las mutantes *fga* generadas en el laboratorio, la mayoría no podía desarrollarse más allá del 1^{er} estadio larval. Sin embargo, *fga*⁹, un alelo hipomórfico, completaba su desarrollo larval y moría como pupa. Decidimos analizar si en dicha mutante había retraso en el momento de la pupariación. Para ello, 40 larvas de 1^{er} estadio salvajes o *fga*⁹ fueron colocadas en viales con comida fresca, dejadas desarrollar a 25 °C y las pupas resultantes fueron contadas durante 10 días consecutivos (recordar que típicamente los controles puparían 5 días después del 1^{er} estadio larval). Observamos en estos experimentos que las mutantes *fga*⁹ tardan 2 días más que las larvas salvajes en llegar a la pupariación (FIGURA 30), esto es 7 días contra los 5 días que permanecen como larvas los controles. Notablemente, las doble mutantes *fga*¹*sima*⁰⁷⁶⁰⁷ reversionaron este retraso (FIGURA 30), no presentando diferencias significativas con los controles.

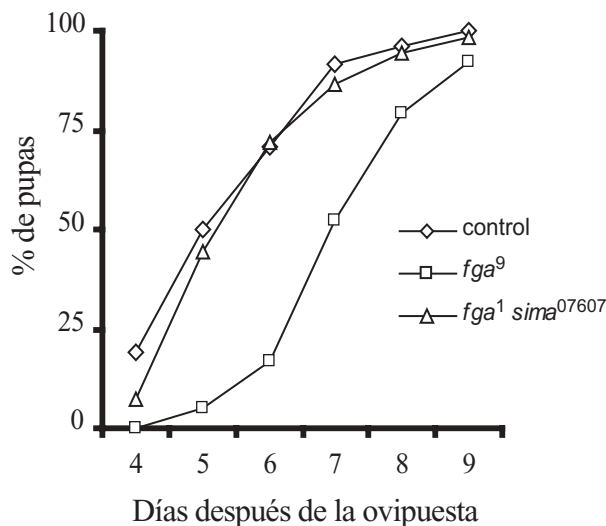


FIGURA 30. El retraso en el desarrollo de los mutantes *fga* se revierte en los doble mutantes *fga sima*. Larvas de distintos genotipos fueron analizadas en cuanto al tiempo que tarda insumen hasta llegar al estadio pupal. Mientras que las larvas *fga*⁹ tardan más que las salvajes en alcanzar el estadio pupal, los doble mutantes *fga sima* se desarrollan en un tiempo idéntico al de los controles salvajes.

Esto demuestra que el retraso en el tiempo de desarrollo observado en las mutantes *fga* depende de la presencia de la proteína Sima.

3.4.2 MOSCAS MUTANTES *fatiga*, PERO NO DOBLE MUTANTES *fatiga sima*, SON MÁS PEQUEÑAS QUE LAS MOSCAS SALVAJES.

Otra medida del crecimiento celular es, claramente, el peso de las pupas luego de finalizados los estadios larvales, cuando ya se ha alcanzado el máximo peso corporal (no hay crecimiento corporal en *Drosophila* durante los estadios pupales y de adulto). Decidimos entonces llevar a cabo experimentos como los descritos en el punto anterior, sólo que esta vez pesáramos las pupas salvajes y las pupas mutantes *fga*⁹ para ver si esas moscas que tardaban más tiempo en pupariar eran además más pequeñas. Observamos que sí, que las mutantes homocigotas para *fga*⁹ eran efectivamente más PEQUEÑAS y más LIVIANAS que los controles salvajes o que los heterocigotas *fga*⁹/TM3 Sb *actGFP* (FIGURA 31). Para analizar si estos fenotipos eran debidos a la

sobre-acumulación de Sima, realizamos los mismos experimentos con doble mutantes *fga¹sima⁰⁷⁶⁰⁷*. Como se muestra en la FIGURA 31, las pupas doble mutantes no presentaron

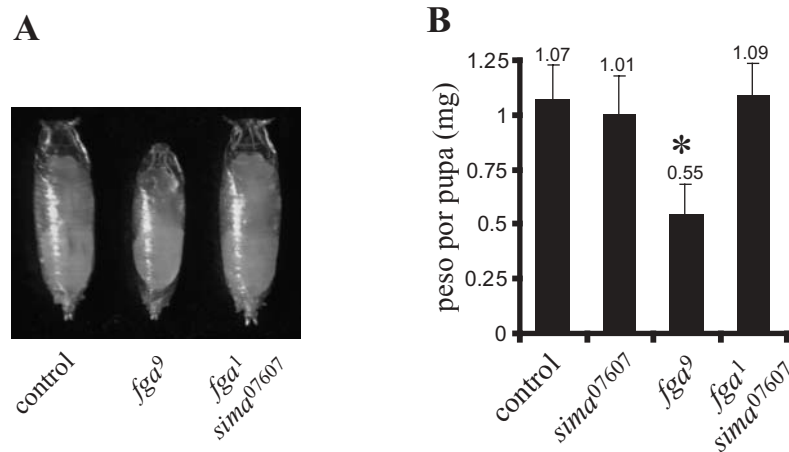


FIGURA 31. Las mutantes *fga* son más pequeñas que las larvas salvajes y el fenotipo es dependiente de la acumulación de la proteína Sima. Larvas mutantes *fga*, doble mutantes *fga sima* y larvas control fueron colocadas en viales frescos y se permitió el desarrollo hasta la pupariación. Las pupas resultantes de cada genotipo fueron colectadas en el primer día luego de la inmovilización, fotografiadas, y pesadas en una balanza de precisión. La falta de *fga* en mutantes homocigotas *fga⁹* resultó en pupas más pequeñas que las salvajes (control) (A) las cuales fueron también más livianas (B). Las doble mutantes *fga sima* presentaron un tamaño (A) y peso (B) igual al de los controles salvajes (N>100).

diferencias significativas con los controles salvajes, sugiriendo fuertemente que Sima juega un rol decisivo en los fenotipos de crecimiento observados en los mutantes *fga*.

3.4.3 LAS CÉLULAS QUE SOBRE-EXPRESAN SIMA SON MÁS PEQUEÑAS

Los resultados descriptos favorecían un modelo en el que Fatiga controla el crecimiento mediante su regulación negativa sobre Sima. Mutantes *fga* (donde Sima está desregulada) resultan más chicos, mientras que estos mismos mutantes, ahora sin Sima, ya no muestran fenotipos de reducción de tamaño. Sin embargo, faltaba aún el experimento que demostrara que la sola acumulación de Sima era SUFICIENTE para generar los fenotipos de reducción de tamaño descriptos más arriba. Lamentablemente, la sobre-expresión de Sima utilizando inductores generales provocaba letalidad temprana, generalmente en el primer estadio larval (los mismos estadios en los que mueren los mutantes *fga¹*, *fga⁶⁴* y *fga⁰²²⁵⁵*, todos ellos alelos fuertes de pérdida de función).

Frei y Edgar (2004) habían reportado un rol de Fatiga en el control del crecimiento celular, donde mediante la generación de clones mutantes lograban crear células mutantes para *fga* en un contexto de células salvajes, y encontraron que las células mutantes *fga* eran más pequeñas que sus vecinas no-mutantes (Frei and Edgar, 2004). Decidimos entonces sobre-expresarnos Sima en células individuales al azar, y comparar el tamaño de estas células con el de las células vecinas que no sobre-expresaran Sima. Para ello, utilizamos la técnica de *flip-out* (ver ANEXO 4 “EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES DE INTERÉS EN CÉLULAS AISLADAS AL AZAR”), en la que las células al azar que sobre-expresan Sima aparecen marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP). La sola expresión de GFP en células al azar (control) no afectó el tamaño celular ya que las células

marcadas presentan un tamaño igual al de las células no-marcadas con GFP (FIGURA 32A, panel izquierdo), con núcleos con la misma cantidad aparente de ADN según la tinción con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Por el contrario, la acumulación de Sima en células aisladas resultó en una clara disminución del tamaño celular, siendo estas células más chicas que sus vecinas y con núcleos notablemente más pequeños (el 71% de los núcleos de células que expresaban

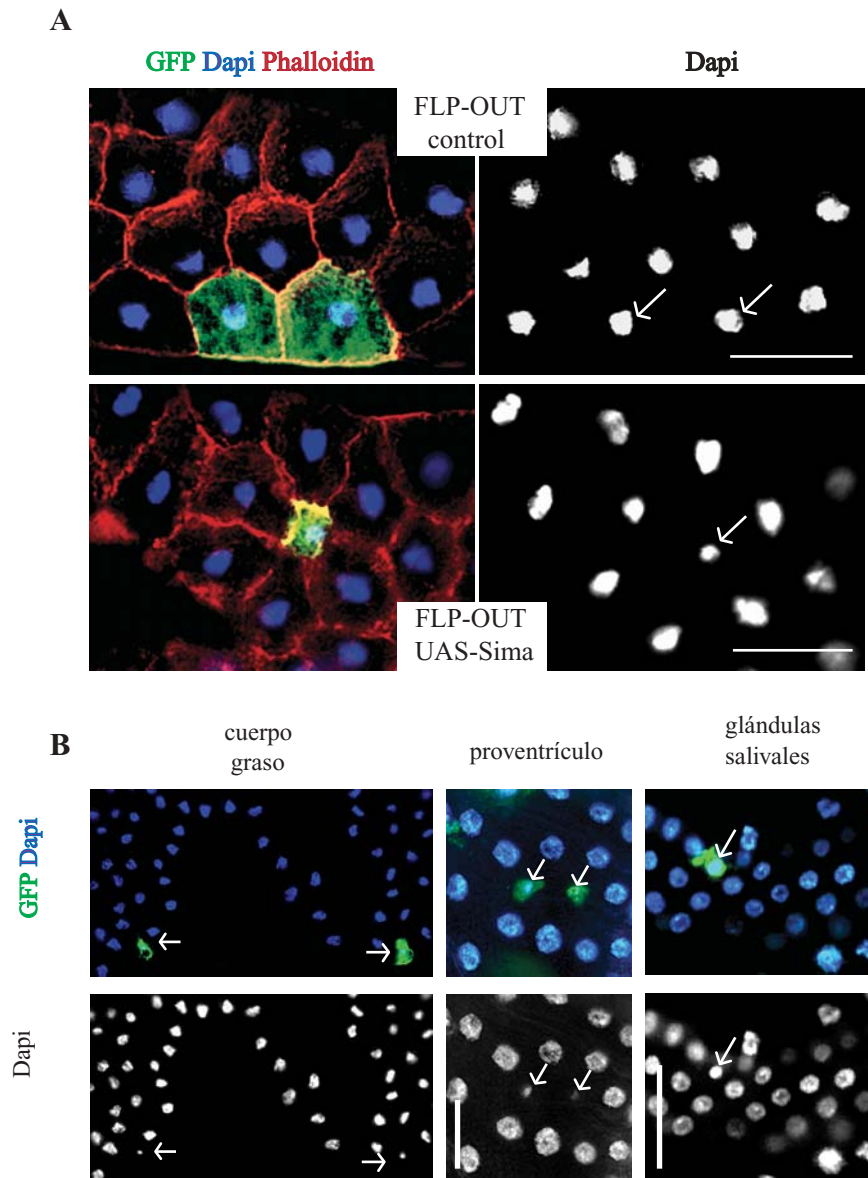


FIGURA 32. La expresión de Sima en células aisladas de tejidos endorreplicativos causa una reducción del tamaño celular. Sima fue expresado en células al azar mediante la utilización del sistema *flip-out* y se analizaron células en cuerpo graso (A) glándulas salivales y pro-ventrículo (B). La expresión de Sima fue evidenciada por la co-expresión de GFP. Las células que expresaron Sima fueron más pequeñas que los controles que expresaban GFP solamente (A), y presentaron núcleos también más pequeños que los de las células que no sobre-expresan Sima (indicados con flechas en A y B).

Sima resultaron más pequeños que los núcleos de células control, $N > 70$) (FIGURA 32A, panel derecho y FIGURA 32B).

Las células de los tejidos endoreplicativos llevan a cabo numerosas divisiones mitóticas incompletas, en donde ocurre la duplicación del genoma pero no la división celular. El tamaño de los núcleos resultantes es en definitiva una medida de cuánto estas células se han endorreplicado. El hecho que los núcleos de las células que sobre-expresaban Sima fueran más pequeños que los núcleos de las células control sugería que el número de divisiones incompletas experimentado había sido menor. Al momento, no hay datos ni propios ni de otros laboratorios que describan a través de qué mecanismo Fga y Sima podrían controlar el crecimiento celular. Dos líneas de investigación dentro del laboratorio están actualmente dedicadas a estudiar la posible interacción de la vía Fga/Sima con vías clásicas de crecimiento como lo es la vía de la insulina (esto se discute más adelante, en el punto 4.3.1 de este Capítulo). De todos modos, los resultados descritos en esta sección nos permiten concluir que Sima es un REGULADOR NEGATIVO del crecimiento celular.

3.5 LA FALTA DE SIMA REVIERTE LA LETALIDAD DE LOS MUTANTES *fatiga*

Hasta aquí, entonces, hemos demostrado que tanto los fenotipos de encendido transcripcional de la respuesta a hipoxia, como los fenotipos traqueales y de crecimiento observados en mutantes *fatiga* fueron revertidos por la falta concomitante de Sima. Esto nos llevó a preguntarnos si la reversión de todos estos fenotipos no traería aparejado una sobrevida mayor de los mutantes *fga* en ausencia de Sima. Esto es, ¿en qué medida la letalidad asociada a la falta de Fatiga se debe a Sima y en qué medida se debe a algún otro factor todavía no reportado? Decidimos entonces comparar el progreso del desarrollo de moscas salvajes con el de moscas homocigotas para *fga*, para *sima* y de moscas doble mutantes *fga sima*. Para ello dispusimos en viales independientes larvas de primer estadio de los genotipos mencionados y contamos durante días 15 sucesivos cuántas alcanzaban el estadio pupal y cuántas el estadio adulto. Como ya hemos reportado, en ningún caso fuimos capaces de detectar pupas o adultos en viales con mutantes homocigotas para *fga*, mientras que los mutantes *sima* se desarrollaban normalmente. Notablemente,

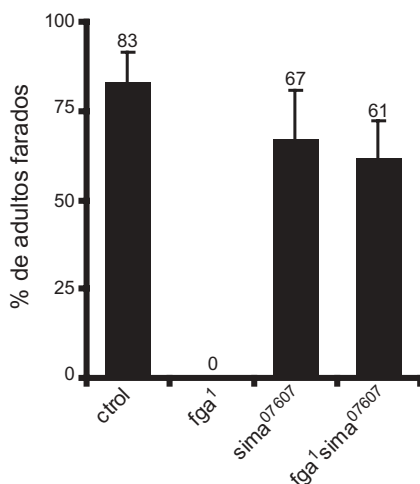


FIGURA 33. La falta de Sima revierte la letalidad de los mutantes *fga*. Moscas de distintos genotipos fueron analizadas en cuanto a su capacidad de llegar al estadio de adulto farado. Larvas de primer estadio fueron colocadas en viales con alimento fresco y se siguió su desarrollo por los siguientes 10 días. Los mutantes *fga* no alcanzan nunca el estadio de adulto farado, mientras que los doble mutantes *fga sima* revierten la letalidad y alcanzan estadios adultos.

individuos doble mutantes *fga sima* fueron capaces de completar el ciclo de vida al igual que los controles salvajes, resultando en moscas adultas que emergen del pupario (FIGURA 33).

Esto es, moscas sin la capacidad de Sensor Oxígeno podían completar su desarrollo siempre y cuando no estuvieran expuestas a hipoxia. Este resultado favorece un modelo en el que los fenotipos más relevantes asociados a la pérdida de función de Fatiga son mediados por la proteína Sima y sugiere que la maquinaria molecular de Sensado y Respuesta Transcripcional a hipoxia NO ES NECESARIA para completar el desarrollo de *Drosophila*.

3.5.1 FENOTIPOS DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE FATIGA, INDEPENDIENTES DE SIMA.

En el punto anterior se mostró que los doble mutantes *fga sima* podían alcanzar el estadio adulto, a diferencia de los mutantes *fga* que morían tempranamente en estadios larvales. Los adultos resultantes, sin embargo, no eran idénticos a los adultos salvajes, presentando fenotipos que podrían ser asignables a roles del Sensor de Oxígeno Fatiga independientes de la proteína Sima. Dos fenotipos de los doble mutantes *fga sima* fueron particularmente interesantes: **I) DEFECTOS EN EL DESARROLLO DEL ALA:** Las alas de los doble mutantes presentan en su parte distal una serie de pliegues que no se observaban en los controles salvajes (FIGURA 34A). Durante el desarrollo, en la formación del ala operan varias vías de señalización (Klein, 2001) y la desregulación de alguna de ellas probablemente contribuya a los fenotipos que observamos. **II) ARRESTO DE LA OVOGÉNESIS:** Analizamos la fertilidad de los doble mutantes *fga sima* y encontramos que si bien los machos eran capaces de fecundar a hembras salvajes, las hembras doble mutantes *fga sima* eran totalmente estériles. Realizamos entonces disecciones de los ovarios de estas moscas y los comparamos con ovarios de hembras salvajes. Los ovarios de las hembras salvajes consisten en una serie de cadenas -ovariolas- compuestas por distintas unidades independientes llamadas folículos (Horne-Badovinac and Bilder, 2005; Spradling, 1993) ordenadas antero-posteriormente con folículos de edades crecientes. La ovogénesis puede dividirse en 14 estadios en base a características morfológicas que va adquiriendo el folículo a medida que se desarrolla. A partir del estadio 8 el vitelo del ovocito comienza a crecer por acumulación de proteínas y lípidos, proceso que se conoce como vitelogénesis. Cuando analizamos los ovarios de hembras doble mutantes *fga sima* observamos que los ovocitos fueron incapaces de desarrollar vitelo permaneciendo arrestados en estadios pre-vitelogénicos (FIGURA 34B). Concluimos por lo tanto que Fga interviene en la ovogénesis de un modo independiente de Sima, y determinamos que la incapacidad de generar huevos que se desarrollen más allá de los estadios previtelogénicos es la causa de la esterilidad observada en las hembras doble mutantes *fga sima*.

Las observaciones aquí reportadas sobre los fenotipos que ocurren en las alas y en los ovarios de los doble mutantes *fga sima*, y que no se ven en individuos mutantes para *sima*, implican necesariamente que Fga participa tanto en la morfogénesis de las alas como en el desarrollo del ovario a través de un mecanismo independiente de Sima (ver punto 4.5.1 de la Discusión de este Capítulo). Actualmente en el laboratorio se está trabajando en la caracterización de los fenotipos de ala y de ovario a nivel molecular, para intentar de este modo la identificación de posibles vías de señalización en las que participa Fatiga de un modo independiente de Sima.

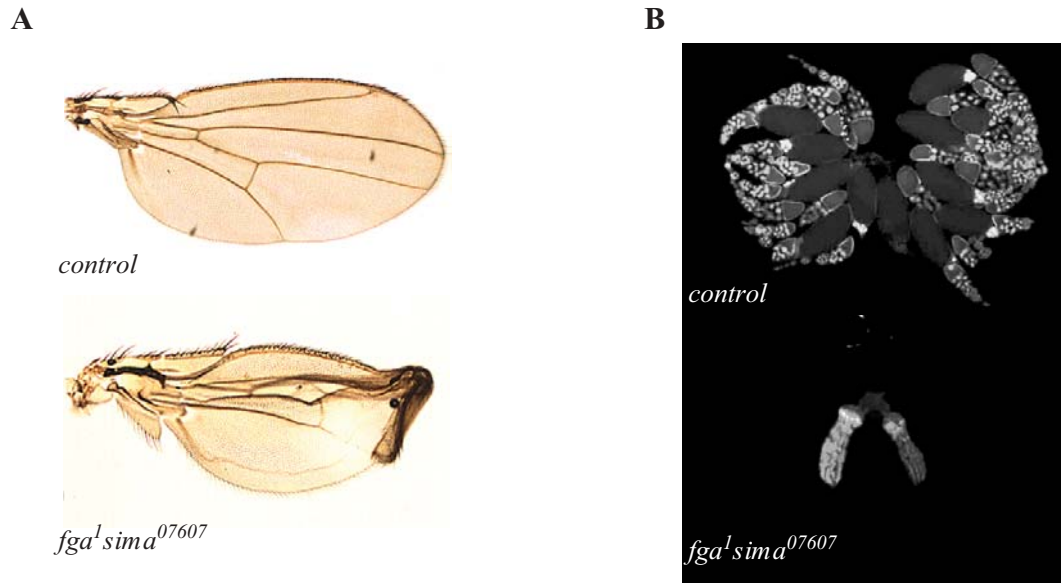


FIGURA 34. Los doble mutantes *fga sima* revelan posibles funciones de Fatiga independientes de Sima. Los adultos doble mutantes *fga sima* presentan anomalías en el desarrollo del ala (A) y del ovario (B) que no se encuentran en los mutantes *sima* (control).

4.- DISCUSIÓN

4.1 LOS MUTANTES *sima* SON VIABLES EN NORMOXIA

En el presente capítulo se describió la identificación y caracterización del primer mutante *sima* de *Drosophila*. Ensayos de Northern Blot revelaron que *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ presenta niveles indetectables del transcrito correspondiente a ese gen, por lo que asumimos se trata de un mutante nulo o al menos un alelo muy fuerte. La existencia de este mutante nos permitió estudiar cuáles eran las consecuencias de anular la respuesta transcripcional a hipoxia en un organismo entero: observamos que estos individuos eran capaces de completar su desarrollo en normoxia, pero al exponer los mutantes *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ a una condición de hipoxia, es decir, a una condición que demande una respuesta transcripcional adaptativa a bajo oxígeno, las moscas son incapaces de compensar la caída en los niveles de oxígeno y mueren durante los estadios larvales.

Si bien podría asumirse entonces que la falta de Sima no tiene consecuencias fisiológicas, a menos que el individuo mutante sea colocado en hipoxia, hay una serie de datos que nos inducen a ser cuidadosos en las conclusiones. Los experimentos de sobrevida a distintas concentraciones de oxígeno fueron realizados aislando larvas jóvenes homocigotas para *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ y colocándolas en un número controlado en viales frescos donde los 40 individuos que conviven son todos homocigotas. Ahora, cuando la línea *sima*⁰⁷⁶⁰⁷ se mantiene como un stock heterocigota en viales con un número no controlado de larvas (donde co-existen homocigotas y heterocigotas), la inmensa mayoría de los individuos adultos que emergen son heterocigotas para la mutación - sólo 1 de cada 30 pupas es homocigota para *sima*- y en general los adultos *sima* resultantes mueren intentando salir del pupario. La diferencia observada con la sobrevida al crecer los mutantes *sima* de manera aislada y en números controlados nos llevó a pensar que quizás individuos que carecen de Sima están desfavorecidos cuando deben competir con individuos no-mutantes. El punto era ¿cuál es el recurso por el que estaban compitiendo, ante el cual los mutantes *sima* estaban desfavorecidos? ¿Larvas crecidas en poblaciones numerosas compiten por el Oxígeno? ¿Estaba Sima mediando una respuesta transcripcional a otro tipo de estímulo - *quorum sensing*, escasez de nutrientes? Estudios preliminares analizando individuos salvajes crecidos en poblaciones numerosas nos permitieron observar que los fenotipos que éstos presentan tienen puntos en común con los individuos que crecieron en hipoxia. En particular, los individuos crecidos a alta densidad son más pequeños, encienden el reportero transcripcional *2xldhGal4* y presentan un aumento en las ramificaciones traqueales (abordado en detalle en el Capítulo Tercero). Más interesante aún, todos estos fenotipos se siguen observando si las larvas crecidas en alta densidad son expuestas a hiperoxia (60% O₂). Sospechamos por lo tanto, que el oxígeno no es el factor limitante por el que compiten los individuos en poblaciones numerosas y que una respuesta mediada por Sima es requerida ante situaciones que no tienen que ver con la falta de O₂ (ver el punto 4.4.1, más adelante en esta misma Discusión). Actualmente se está analizando en el laboratorio el desarrollo de mutantes *sima* alimentadas con medios restringidos en calorías o cantidad de proteína, los cuales permitirán esclarecer si la adaptación a condiciones

cambiantes de alimentación requiere de una respuesta trascricional adaptativa mediada por Sima. En este sentido, es de especial interés determinar si esos otros putativos estímulos son sentidos por la misma enzima que detecta los niveles de oxígeno, Fatiga. Es particularmente interesante notar que Fatiga utiliza no sólo oxígeno, sino también 2-oxoglutarato como co-sustrato, lo que la posiciona también como un posible sensor del estado nutricional de la célula. Esta posibilidad se discute más abajo, cuando se analiza el rol de Fatiga en el control del crecimiento celular.

4.2 FATIGA COMO SENSOR DE OXÍGENO DEDICADO A SIMA

4.2.1 EL SISTEMA DE SENSADO DE OXÍGENO ES PRESCINDIBLE PARA EL DESARROLLO EN NORMOXIA.

La existencia de los mutantes *sima* nos permitió diseñar una estrategia para revelar cuáles de los fenotipos de pérdida de función de Fga se debían a la acumulación de Sima y cuáles ocurrían de un modo independiente de este factor de transcripción. Combinando las mutaciones *sima* y *fga* en un mismo individuo, observamos que los individuos doble mutantes *fga sima* mostraron reversión de todos los fenotipos que habíamos reportado para los mutantes *fga*, incluyendo la respuesta trascricional a hipoxia constitutivamente activa, los defectos de vaciado traqueal, los fenotipos de crecimiento y la letalidad temprana. Más aún, los doble mutantes logran completar su desarrollo y dar origen a moscas adultas, demostrando que la vía Fga/Sima no es necesaria para la progresión del desarrollo de *Drosophila* -siempre que no se enfrente a las moscas con tensiones de oxígeno disminuídas. Estos resultados nos llevan a concluir que la función más importante de Fga durante el desarrollo de *Drosophila* es probablemente mantener bajos los niveles de Sima.

Los resultados presentados aquí pueden analizarse también en otro contexto. Durante los últimos años, se ha comenzado a esclarecer la íntima relación existente entre los procesos de desarrollo básico y los sistemas de respuesta inducibles por estímulos del medio ambiente. Estos sistemas de respuesta a estímulos ambientales son críticos para mantener la homeostasis del organismo en situaciones desfavorables (Britton et al., 2002). Los resultados presentados tanto en este Capítulo como en el Capítulo previo, muestran que una activación desmedida de la vía de respuesta a hipoxia –por falta del Sensor de Oxígeno, por ejemplo- tiene consecuencias deletéreas como los fenotipos mostrados en el sistema traqueal y las anomalías en el crecimiento celular. Ahora, si la vía de respuesta a hipoxia se inactiva completamente, esto es, si la falta del Sensor de Oxígeno se acompaña con la falta del Factor de Transcripción efector de la Respuesta, los fenotipos desaparecen y el desarrollo puede progresar dando origen a un individuo adulto. Es decir, la progresión del desarrollo ES POSIBLE en ausencia de Fga y Sima, aún cuando esta progresión esté restringida a situaciones donde el estímulo externo al que el sistema responde –falta de oxígeno- no se presente.

Que la desregulación de la vía de respuesta a hipoxia por falta del Sensor Molecular de Oxígeno tenga consecuencias más severas que la REMOCIÓN TOTAL de los componentes que la integran,

implica que la señalización disparada por bajos niveles de oxígeno interactúa con otras vías que participan en el desarrollo. En este sentido, cada uno de los fenotipos descrito para los mutantes *fga* refleja al menos una vía con la que la maquinaria de respuesta a oxígeno está interactuando. La identidad de las vías de señalización con las que interactuaría Fga es de sumo interés biológico, puesto que son vías candidatas a ser controladas por el ambiente en el que el individuo se está desarrollando. Caracterizar a qué nivel ocurre la interacción (es decir, cuáles son las moléculas involucradas en cada caso) ayudará a comprender de qué modo las VÍAS DE SENSADO de condiciones externas (oxígeno disponible, comida, luz, temperatura) resultan en mecanismos que facilitan la adaptación a condiciones adversas (hipoxia, hambreado, oscuridad, frío).

4.2.2 SEMEJANZA CON OTROS SISTEMAS DE RESPUESTA A ESTÍMULOS AMBIENTALES.

El fenómeno discutido en el párrafo anterior, en donde la remoción de una proteína reguladora (Fga) causa fenotipos más severos que la ablación total de la vía (Fga/Sima) ha sido reportado también en otros sistemas que tienen clara relación con las respuestas de un organismo al medio ambiente que lo rodea. Tal es el caso de p53 –un supresor de tumores que responde induciendo apoptosis cuando el DNA está demasiado dañado para que sea seguro mantener la célula con vida (Carr et al., 1992; Lane, 1992)- y de la vía Insulina/PKB/PTEN –implicada en la respuesta a condiciones nutricionales (Hafen, 2004). También en estos dos ejemplos se observó que la remoción de un REGULADOR negativo, que lleva a que la vía correspondiente quede constitutivamente activada, CAUSA LA LETALIDAD del individuo, mientras que la remoción del REGULADOR y el EFECTOR simultáneamente RESTAURA LA VIABILIDAD: **1.-** La vida media de p53 es extremadamente corta en situaciones normales. Su estabilidad está controlada por una E3 ubiquitin ligasa llamada MDM2. Ratones KO para la MDM2 tiene altos niveles de p53 estabilizada y mueren temprano en el desarrollo. Ahora, si se analizan ratones doble KO, donde aparte de MDM2 falta p53, estos mutantes son capaces de desarrollarse normalmente resultando en adultos fértiles (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). Recapitulando un comportamiento similar al de los mutantes de la vía de respuesta a hipoxia, los doble mutantes *mdm2 p53* son particularmente vulnerables a irradiación UV, estímulo típico que dispara la respuesta mediada por p53 (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). **2.-** El supresor de tumores PTEN funciona como inhibidor de la vía intracelular de respuesta a Insulina, regulando la actividad de la kinasa PKB. Moscas mutantes *pten* son letales en estadios tempranos del desarrollo debido a una sobre-activación de la vía. También en este caso, moscas doble mutantes *pten pkb* pueden desarrollarse y llegar hasta estadios adultos (Stocker et al., 2002).

Entonces, la DESREGULACIÓN de las vías de respuesta a condiciones externas causa fenotipos aberrantes, probablemente por estar transmitiendo a ciertos programas de desarrollo información sobre una condición ambiente extrema que en realidad no existe -los mutantes *fga* experimentan una condición de hipoxia inexistente. Sorprendentemente, la REMOCIÓN TOTAL de estas vías permite la progresión de la vida en un organismo multicelular complejo, demostrando que los programas de desarrollo (aún aislados de lo que suceda en el entorno) son de por sí SUFICIENTES para la formación de un individuo y la mantención de la vida.

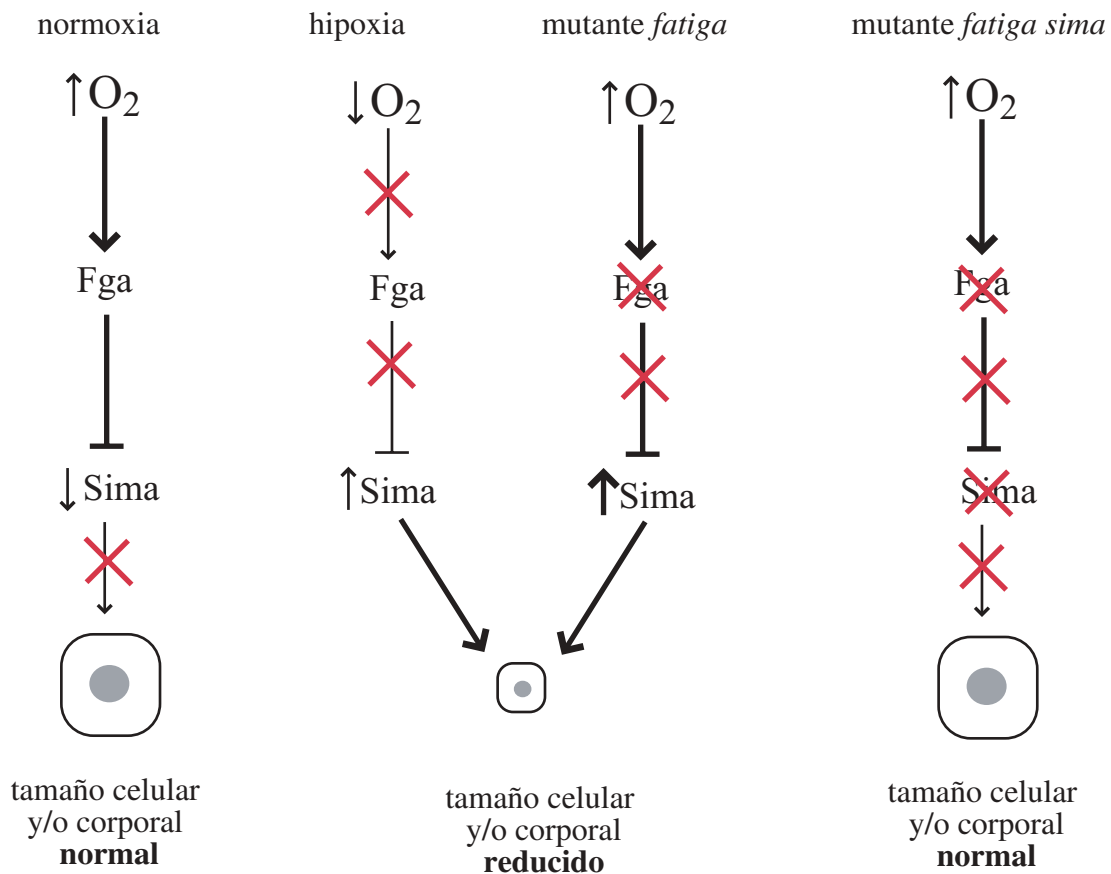
4.3 SIMA ES UN REGULADOR NEGATIVO DEL CRECIMIENTO CELULAR

Como se mencionó en la introducción, Frei y Edgar (2004) habían reportado que células mutantes para *fga* eran más pequeñas que las células control. Mediante experimentos de epistasia genética posicionaron a Fga mediando los efectos de la Ciclina D/Cdk4, reportándola como el primer componente río abajo de esta Ciclina y como un posible efector de su función en el control del crecimiento y la proliferación. Aún siendo Sima el único blanco de hidroxilación reportado para Fga en ese momento –y en la actualidad- los autores sugirieron que Fga controlaría el crecimiento celular de un modo independiente de Sima (Frei and Edgar, 2004). Los resultados presentados en este Capítulo respondieron el interrogante respecto a la dependencia o no de Sima para los fenotipos de crecimiento observados en los mutantes *fga*.

4.3.1 SIMA ES RESPONSABLE DE LOS FENOTIPOS DE CRECIMIENTO REPORTADOS PARA *fga*.

En el laboratorio hemos generado un alelo hipomórfico de *fga*, *fga^o*, que permite la sobrevivencia hasta estadios pupales. Estos mutantes demoran más tiempo en llegar a estadios pupales – probablemente por un retraso en el crecimiento y por ende en el tiempo en alcanzar el tamaño crítico para la pupariación- y las pupas resultantes son más pequeñas que las pupas control. Más importante aún, demostramos que estos dos fenotipos, el retraso en el crecimiento y la disminución del tamaño corporal, dependen de Sima, puesto que en un doble mutante *fga sima* se restablecen los fenotipos salvajes (ver Modelo Capítulo 2). Además, demostramos que Sima es suficiente para generar fenotipos de reducción de tamaño celular, puesto que la acumulación de este Factor de Transcripción en células al azar de tejidos endorrepliativos de la larva resulta en células más pequeñas con núcleos más chicos.

Todavía persiste la incógnita sobre cuál es el modo en que Fga y Sima provocan estos fenotipos de crecimiento. El descubrimiento de nuevos blancos transcripcionales de Sima contribuirá a la comprensión molecular de este proceso. Recientemente, se reportó que dos genes inducibles por hipoxia a través de Sima, *Scylla* y *Charybdis*, funcionan inhibiendo el crecimiento celular (Reiling and Hafen, 2004), y que este mecanismo está conservado también en mamíferos (Brugarolas et al., 2004). Ambos genes modularían la actividad de TOR de un modo dependiente del complejo TSC1/2. En nuestro laboratorio se ha demostrado que existe una interacción funcional entre la vía de respuesta a hipoxia y la vía de la Insulina, donde la activación farmacológica de la vía de la Insulina (PI3K/AKT/TOR) resulta en la inducción de la actividad transcripcional de Sima –aún en situaciones de normoxia (Dekanty et al., 2005). La caracterización de esta interacción funcional y de sus consecuencias fisiológicas permitirá aclarar cuál es el rol de Sima en el control del crecimiento celular y de qué manera las distintas vías de respuesta a estímulos externos dialogan entre sí contribuyendo a montar una respuesta adaptativa compleja como lo es la regulación del crecimiento por factores del medio ambiente.



MODELO 2. La vía Fatiga/Sima controla el crecimiento celular y corporal en *Drosophila*. En condiciones normales las células y los individuos presentan un tamaño determinado (“normal”). Cuando los niveles de oxígeno bajan (hipoxia), la proteína Sima se acumula por la falta de función de Fatiga y el tamaño final alcanzado por los individuos es menor que el que presentan en normoxia. El mismo efecto de reducción de tamaño se observa en mutantes *fga*, en los cuales los niveles de la proteína Sima se encuentran constitutivamente elevados. La remoción de Sima en los mutantes *fga* restaura la tasa de crecimiento normal, demostrando que Sima es un regulador negativo del crecimiento celular.

4.4 MECANISMOS ADICIONALES DE REGULACIÓN DE LAS PROLIL HIDROXILASAS DEPENDIENTES DE OXÍGENO

4.4.1 REGULACIÓN DEL SENSOR MOLECULAR DE OXÍGENO POR SUSTRATOS ADICIONALES AL OXÍGENO.

Las PHDs son enzimas cuya actividad hidroxilasa depende no sólo de oxígeno, sino también de la concentración de 2-oxoglutarato. El 2-oxoglutarato está presente tanto en la mitocondria como en el citosol. En la primera funciona como un intermediario del CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXÍLICOS, y en el segundo es requerido para la síntesis de aminoácidos y por ende, de proteínas. De este modo, se ha propuesto que la actividad de las PHDs bien podría estar regulada no sólo por la disponibilidad de oxígeno, sino también por el ESTADO NUTRICIONAL en el que la célula se encuentra. En esta línea, Frei y Edgar reportaron recientemente que la actividad de Fga dependería de una proteína del ribosoma mitocondrial llamada mRpL12, ortóloga al MRLP12 humano (Frei et al., 2005). Mediante experimentos de epístasis genética, demostraron que la falta de mRpL12 provoca la pérdida de función de Fga y más aún, que la actividad de Fga como

inductor del crecimiento DEPENDE de la existencia UNA MITOCONDRIA FUNCIONAL, mientras que para otras vías de crecimiento como la de c-MYC este requerimiento no existe. Hay otra serie de reportes que suma fuerza a esta visión en la que la pérdida de actividad mitocondrial por acumulación de piruvato –producto de glucólisis- u oxalacetato –intermediario del ciclo de ácidos tricarboxílicos- provoca los mismos efectos de pérdida de actividad de las PHDs que los reportados para hipoxia (Dalgard et al., 2004; Lu et al., 2002). Estos trabajos, en definitiva, tienden a evidenciar una posible regulación de las prolin hidroxilasas de HIF a través de un mecanismo alternativo a la caída en los niveles de oxígeno. Por lo tanto, la posibilidad que las PHDs sean reguladas por metabolitos celulares es altamente verosímil. De hecho, se han reportado trabajos donde queda de manifiesto la relevancia funcional de posibles mecanismos de regulación de las PHDs por metabolitos celulares, fundamentalmente en la biología de tumores (Dalgard et al., 2004; Lu et al., 2002). Por ejemplo, por mucho tiempo ha sido una incógnita por qué es posible encontrar a HIF- α estabilizado en tumores con abundante irrigación sanguínea y bien oxigenados. Estos tumores presentan una alta tasa de glucólisis anaeróbica, aún cuando hay oxígeno presente, lo que se conoce como “efecto Warburg”. La alta tasa de glucólisis en estos tumores resulta en la acumulación de piruvato, que llevaría a una inactivación de las PHDs por pérdida de funcionalidad mitocondrial y la consiguiente estabilización de HIF- α en condiciones de normoxia (Dalgard et al., 2004; Lu et al., 2002).

Cada vez está más claro, entonces, que la mitocondria es fundamental para que Fga pueda funcionar como Sensor de Oxígeno e incluso hay grupos que posicionan como sensor de oxígeno al complejo MITOCONDRIAS+PHDs (Frei, 2004; Frei et al., 2005). Más allá de estas especulaciones, cobra fuerza la noción de que las PHDs serían las moléculas en las que confluyen señales de distinta naturaleza –nivel de oxígeno molecular existente como medida de la energía obtenible y nivel de 2-oxoglutarato como medida del estado nutricional de la célula- que en conjunto determinan el tamaño final alcanzado por la célula o por el organismo entero. De nuevo, de qué manera las PHDs controlan el crecimiento es una incógnita que esperamos que el laboratorio pueda contribuir a develar en un futuro próximo. Nuestros datos favorecen la noción que este control estaría mediado por blancos transcripcionales de Sima.

4.4.2 REGULACIÓN DEL SENSOR DE OXÍGENO POR FACTORES DE CRECIMIENTO.

En mamíferos, otra línea de investigación había relacionado a una de las hidroxilasas con el control del crecimiento y de la muerte celular, antes incluso de saberse que estas enzimas funcionaban como sensores de oxígeno (Lipscomb et al., 1999; Moschella et al., 1999). SM-20, una proteína de rata homóloga a la PHD3 de humanos, fue identificada como un factor de respuesta a factores de crecimiento (Wax et al., 1994). Puntualmente, cuando se inducían células endoteliales con PDGF los niveles de SM-20 aumentaban considerablemente. Más adelante, se reportó la existencia de SM-20 en neuronas -donde inducía apoptosis mediada por caspasas en respuesta a la deprivación del Neural Growth Factor (NGF) (Lipscomb et al., 2001)- y en fibroblastos -donde estaba involucrada en el control del crecimiento celular (Madden et al., 1996). También fue reportado que altos niveles de Angiotensina II regulaban negativamente la abundancia de

SM-20 (Wolf et al., 2004). Como se ve, existen diferentes modos de regulación de las proli hidroxilasas y también diversas consecuencias de su actividad han sido y siguen siendo descubiertas. Pero de nuevo, cuáles son los mecanismos por los que las PHDs generan los fenotipos descriptos es todavía una incógnita.

4.5 BLANCOS ADICIONALES DE LAS HIDROXILASAS DE HIF

4.5.1 FENOTIPOS DE LOS DOBLE MUTANTES *fga sima*.

En el presente capítulo reportamos que la falta de Sima revierte todos los fenotipos que habíamos observado para la falta de Fatiga. Los doble mutantes llegan a estadios adultos y por eso concluimos que el principal rol de Fatiga durante el desarrollo es el de mantener controlados los niveles de Sima. De todos modos, los doble mutantes -aún cuando llegan al estadio adulto- no son exactamente iguales a los individuos salvajes. Observamos que hay una importante mortalidad durante la emergencia del adulto. Muchos de los mutantes *fga sima* quedan apresados en el pupario durante la emergencia y muchos otros mueren al poco tiempo, quedando atrapados en el alimento; los que logran sortear estos obstáculos presentan fenotipos en el ala y esterilidad en las hembras. Entonces, el hecho de que no se revierta la letalidad en el 100% de los individuos junto a la existencia de fenotipos en adultos que no se observan en los mutantes *sima*, revelan la existencia de consecuencias fisiológicas de la falta de Fatiga que no tienen que ver con Sima. El desarrollo del ala y la ovogénesis son dos procesos en los que participan varias vías de señalización diferentes, de modo que los candidatos potenciales a estar regulados son numerosos. En el laboratorio estamos analizando en este momento el desarrollo del ala y del ovario de los doble mutantes *fga sima* para intentar inferir con qué nuevos blancos moleculares de otras vías de señalización estaría interactuando Fga de manera independiente de Sima. Una vez identificados, será interesante analizar si esos blancos son modificados por la hidroxilación dependiente de oxígeno, y de ser así, cuál es rol adaptativo, si lo hubiere, de la modulación de las vías en las que intervienen por hipoxia. Alternativamente, Fatiga podría tener funciones adicionales no-dependientes de oxígeno -¿ni de hidroxilación?- cuya identificación también constituye un punto saliente en la comprensión de la función del Sensor de Oxígeno de la mosca.

4.5.2 EVIDENCIAS DE FUNCIONES DEL SENSOR INDEPENDIENTES DE HIF EN *Caenorhabditis elegans*.

EGL-9, homólogo de Fatiga, fue reportada por primera vez en el gusano helminto como una proteína que afecta la ovipuesta (Trent et al., 1983)(de ahí su nombre, *egg laying defective*). Más tarde, se encontró que esta proteína participaba en la respuesta a la toxina de *Pseudomonas aeruginosa* (Darby et al., 1999). Cuando gusanos salvajes son desafiados con esta toxina, se paralizan de inmediato y eventualmente mueren. Darby y colaboradores realizaron un *screen* buscando gusanos que resistan a la toxina, y encontraron que mutantes EGL-9 no se paralizaban cuando eran expuestos a la misma. Más tarde, cuando se reportó que EGL-9 funcionaba como

sensor de Oxígeno, estos fenotipos cobraron particular interés en lo que respecta a caracterizar efectos de pérdida de función del Sensor. La pregunta a responder es si este fenotipo de no-resistencia a la toxina depende o no del HIF- α del gusano, pero hasta la fecha no se ha reportado ningún dato al respecto. Las evidencias que se tienen, si bien indirectas, indican que los fenotipos serían independientes de HIF- α : gusanos mutantes para VHL (componente del complejo E3-ubiquitina ligasa que promueve la ubiquitinación de HIF- α) no exhiben ni el fenotipo de ovipuesta defectuosa ni el de resistencia a la parálisis inducida por la toxina de *P. aeruginosa* (Epstein et al., 2001). No se puede dejar de notar un hecho otra vez curioso: tanto los gusanos como las moscas mutantes para EGL-9/Fga exhiben defectos de ovipuesta aparentemente independientes de su único blanco de hidroxilación conocido, *ceHIF- α /Sima*. Entonces, los fenotipos causados por la falta de la prolil hidroxilasa tanto en los gusanos como en las moscas podrían estar revelando funciones adicionales a su ya conocida actividad sobre HIF- α y constituyen, por lo tanto, sistemas atractivos para la identificación de blancos alternativos de las PHDs.

4.6 LA HIDROXILACIÓN DE PROLINAS COMO MODIFICACIÓN GENERALIZADA EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES

Recientemente se han dado a conocer nuevas proteínas cuya regulación estaría mediada por la hidroxilación en residuos de prolina. Se reportó, por ejemplo, que la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II es hidroxilada en residuos de prolina y, más interesante aún, esta hidroxilación determina el reconocimiento por parte de VHL para su ubiquitinación y degradación en el proteasoma (Czyzyk-Krzeska and Meller, 2004; Kuznetsova et al., 2003; Na et al., 2003). Se desconoce hasta la fecha si las PHDs están involucradas en esta hidroxilación de prolinas.

La hidroxilación dependiente de oxígeno de prolinas, catalizada por las PHDs, representa una “nueva” modificación post-traducciona que al menos en el caso de HIF- α regula la estabilidad proteica favoreciendo interacciones proteína/proteína (HIF- α /VHL) (Semenza, 2001). El hecho de que la hidroxilación dependiente de oxígeno de prolinas por parte de las PHDs haya sido recientemente descubierto no significa en lo más mínimo que ocurra exclusivamente sobre los HIFs de distintas especies; ¿Acaso no podría este mecanismo ser utilizado para la regulación de otras interacciones proteicas? ¿O para otros procesos bioquímicos distintos de la ubiquitinación y la degradación? En este sentido, Epstein y colaboradores especulan, en el reporte en el que dieron a conocer a EGL-9 como Sensor de Oxígeno, acerca de la alta frecuencia de prolinas en proteínas de vida media corta, y sugieren que este dato lleva a preguntarse si las PHDs no tendrán un rol más general en la degradación de proteínas (Epstein et al., 2001). Vale aclarar que, históricamente, el descubrimiento de nuevas modificaciones post-traduccionales operando sobre un determinado sustrato aparentemente específico fue seguido por el reporte de nuevos sustratos sobre los que esa “nueva y exclusiva” modificación reportada también se daba. Quizás por la cabeza de Harpur y Quastel se haya cruzado -allá por el año 1949, cuando reportaron una actividad kinasa presente en extractos de cerebro (Harpur and QUASTel, 1949)- que la fosforilación de proteínas podía ser una modificación particular del sustrato con el que ellos estaban trabajando;

los blancos de fosforilación existentes a la fecha ridiculizan cualquier pretensión de exclusividad con la que se pueda haber especulado. Los avances metodológicos que se vienen realizando para revelar la presencia de prolinas hidroxiladas mediante acercamientos a gran escala, garantizan que los próximos años serán muy dinámicos en cuanto a la aparición tanto de nuevas proteínas blanco de hidroxilasas como de nuevos procesos biológicos regulados a través de la hidroxilación de prolinas.

5.- CONCLUSIÓN

En el presente capítulo reportamos la primer mutante *sima* de *Drosophila*. Estas mutantes resultaron viables hasta estadios adultos siempre y cuando no se enfrenten con situaciones de hipoxia. Curiosamente, las mutantes *sima* presentan dificultades para sobrevivir en cultivos sobre-crecidos en los que compiten con moscas salvajes. No está claro aún si es la competencia por oxígeno o la competencia por nutrientes en la que los mutantes *sima* están desfavorecidos.

La falta de *sima* revirtió todos los fenotipos observados en los mutantes *fga*, lo que nos permitió concluir que el PRINCIPAL ROL DE FATIGA durante el desarrollo de la mosca es el de MANTENER BAJOS LOS NIVELES DE SIMA. Incluso los fenotipos de crecimiento tanto a nivel celular como a nivel de organismo entero observados en los mutantes *fga* fueron revertidos en los doble mutantes *fga sima*, posicionando a Sima como un factor clave en el control del tamaño celular. En este sentido, la sola acumulación de Sima fue suficiente para generar células más pequeñas en tejidos endorreplicativos de la mosca, presuntamente a través de la inhibición de las vías PI3K/TOR.

Los doble mutantes *fga sima*, si bien pueden completar su desarrollo, presentan defectos fenotípicos que son causados por potenciales blancos de Fga independientemente de Sima. No se conocen aún nuevos blancos de hidroxilación para las PHDs, y no se conocían al inicio de este Tesis las consecuencias de la inactivación de el Sensor Molecular de Oxígeno en organismos enteros. El análisis llevado a cabo en el trascurso de este Tesis utilizando un modelo genético sencillo permitió un primer acercamiento a las funciones dependientes e independientes de Sima/HIF- α de estas hidroxilasas.

CAPÍTULO TERCERO

DIÁLOGO ENTRE LA VÍA FATIGA-SIMA Y LA VÍA DEL RECEPTOR DE FGF.

La Inducción del FGF-R Breathless por Sima es Responsable
de los Fenotipos de Sobre-ramificación Traqueal
de las larvas expuestas a hipoxia.

1.- INTRODUCCIÓN

En los capítulos previos de esta Tesis se han analizado cuáles son las consecuencias moleculares y fisiológicas de la falta de O₂ -o de la falta de genes que informan a la célula cuanto oxígeno disponible hay- en los distintos tejidos de la mosca. Hasta aquí, se dieron por sentado o simplemente se ignoraron, los mecanismos mediante los cuáles el oxígeno llega desde el exterior del organismo a cada una de sus células y los sistemas y/u órganos especializados implicados en el transporte del oxígeno a los tejidos este proceso. A continuación introduzco brevemente cómo funcionan los sistemas de captación y reparto de oxígeno tanto en mamíferos como en *Drosophila*, nuestro modelo experimental, haciendo incapié en las similitudes estructurales, funcionales y de regulación que éstos presentan.

1.1 LOS SISTEMAS RESPIRATORIO Y CIRCULATORIO EN MAMÍFEROS Y SU REGULACIÓN POR LOS NIVELES DE OXÍGENO

1.1.1 LOS PULMONES DE LOS MAMÍFEROS ESTÁN FORMADOS POR MILLONES DE TUBOS LLENOS DE AIRE.

Las distintas células del cuerpo reciben el oxígeno de los eritrocitos circulantes en el sistema sanguíneo, que a su vez lo toman en los alvéolos pulmonares, a los que llega desde el exterior atravesando un complejo sistema tubular - tráquea y pulmones. Durante el desarrollo embrionario, los pulmones se forman como evaginaciones (bronquios) que geman hacia ambos lados desde un tubo primitivo central (tráquea), proceso que en ratones ocurre alrededor del noveno día de la embriogénesis. Estas evaginaciones se van ramificando sucesivamente a medida que crecen en número celular; los destinos de las nuevas ramas que se originan por cada ramificación dependen de la expresión de genes en tejidos circundantes (mesodérmicos) de distintos ligandos de la familia de FGF -fundamentalmente FGF10, (Min et al., 1998)-, que funcionan sobre sus receptores expresados en las células pulmonares que proliferan y migran. Las ramificaciones ocurren en forma iterativa: un bronquio primario se ramificará para generar bronquios secundarios -o de segunda generación-, éstos harán lo propio generando bronquios terciarios y así sucesivamente. En humanos se calcula que existen alrededor de 20 generaciones de ramificaciones, lo que resulta en las casi 17 millones de ramas que forman un pulmón adulto. La formación de esta estructura tubular compleja requiere entonces un control preciso de la proliferación celular, de la migración y de la forma adoptada por las distintas células del tubo (Metzger and Krasnow, 1999). La utilización una y otra vez de la vía del receptor de FGF es quizás la más importante de las claves moleculares que regulan este proceso.

1.1.2 LOS VASOS SANGUÍNEOS REPARTEN EL OXÍGENO A LAS DISTINTAS CÉLULAS DEL CUERPO.

El intercambio de oxígeno entre el sistema respiratorio y el circulatorio se lleva a cabo en los alvéolos pulmonares, formados por la últimas y más finas ramificaciones de los pulmones; allí la sangre se oxigena y puede repartir ese oxígeno a los distintos órganos y tejidos que lo demanden. El desarrollo del sistema sanguíneo, involucra también la ramificación iterativa de tubos cada vez más finos. Debido a la escasa difusión que presenta el oxígeno, cada una de las células del

organismo deberá estar a una distancia máxima de unos 100 o 200 micrones de alguno de los vasos que conforman el sistema circulatorio. Dado que las células del organismo son poco más que billones, una de las preguntas fundamentales en el estudio del sistema vascular es: ¿cómo se va remodelando la vasculatura durante la vida de un individuo para lograr que todas las áreas del organismo reciban una irrigación sanguínea –y por lo tanto un aporte de oxígeno- adecuado? Está claro que durante el desarrollo deben existir lugares predeterminados genéticamente a los cuales el sistema circulatorio se dirija, pero es imposible pensar que la distribución de los 96.540 kilómetros –sí, kilómetros- de vasos sanguíneos que presenta en promedio una persona adulta estén genéticamente determinados y presenten exactamente el mismo patrón en todos los individuos. Desde hace ya unas décadas se asume que la vascularización de los tejidos está finamente controlada por un balance entre señales pro- y anti-angiogénicas, que determinan el patrón final de ramificaciones. Estas claves que dirigen la angiogénesis tienen que ver con la demanda de oxígeno de las células/tejidos/órganos y por lo tanto la maquinaria de sensado de oxígeno y respuesta a hipoxia está directamente involucrada en el proceso.

1.1.3 LA RELACIÓN ENTRE EL OXÍGENO Y EL SISTEMA CIRCULATORIO.

Los niveles de oxígeno que sensa una célula determinada son relevantes en la fisiología del sistema vascular tanto en condiciones normales como patológicas. Desde los años 70's y principalmente por los aportes realizados por J. Folkman y sus distintos grupos de investigación, se asume que la evolución de los tumores depende fundamentalmente de la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan la masa proliferante de células y le permitan su crecimiento y distribución. Típicamente, un clon celular no podrá crecer más allá de cierto límite impuesto por la necesidad de nutrientes y oxígeno que evidentemente escasearán. Los grupos celulares en crecimiento sortearan esta limitación emitiendo señales angiogénicas que promueven la vascularización, siendo VEGF (*vascular endothelial growth factor*) el principal de estos factores angiogénicos. Cuando se identificaron los genes de respuesta a hipoxia, a comienzos de los 90's, se demostró que la expresión de VEGF está regulada por HIF, de modo que la respuesta transcripcional a hipoxia cobró un papel protagónico como inductor del proceso de neovascularización mediado por VEGF y observado en tumores invasivos (FIGURA 35) (Pugh and Ratcliffe, 2003).

Si bien VEGF es el principal blanco de HIF- α en la respuesta angiogénica, existen varios otros factores que contribuyen a que esta respuesta -que es un proceso complejo y necesariamente multigénico- ocurra óptimamente. En línea con este concepto, la angiogénesis inducida por la sola expresión ectópica de VEGF resulta en la formación de vasos débiles muchas veces acompañados por edema e inflamación. Si en lugar de sobre-expresar VEGF se expresa HIF- α , la respuesta resulta en vasos bien formados que no traen aparejados efectos secundarios indeseados (Elson et al., 2001). La relevancia de la condición pro-angiogénica de HIF- α fue enfatizada en la introducción general de esta Tesis, donde se mencionaban sus posibles aplicaciones en la terapéutica de tumores -donde el desafío es lograr callar la respuesta angiogénica

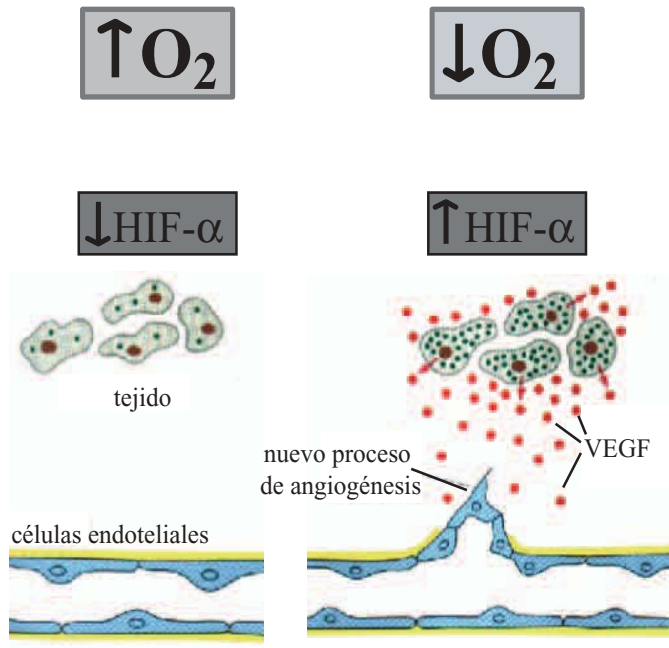


FIGURA 35. La inducción de VEGF por HIF promueve la angiogénesis en tumores. VEGF es un blanco transcripcional de HIF que promueve la angiogénesis. **A.**-En un tejido normal, HIF- α es rápidamente degradado en normoxia. **B.**- Un grupo de células sensando hipoxia estabiliza a HIF, induciendo la expresión de VEGF, que opera sobre células endoteliales promoviendo el crecimiento direccional de nuevos vasos sanguíneos.

localmente para desfavorecer la proliferación celular- y de infartos -donde la idea es la contraria, activar ectópicamente la respuesta angiogénica para favorecer la re-vascularización del tejido afectado y por ende la evolución clínica. El gran impacto -en lo que se refiere a ciencia aplicada- del estudio de los blancos transcripcionales de HIF- α como inductor de angiogénesis en tejidos extra-vasculares eclipsó el estudio de su posible función dentro del mismo tejido vascular. No fue sino hasta hace muy poco que empezaron a aparecer reportes que sugieren que la regulación transcripcional por hipoxia es funcionalmente relevante en las células endoteliales que forman el sistema vascular: estas células muchas veces deben migrar y dividirse -dos procesos que requieren gran consumo de energía- en zonas donde los niveles de oxígeno -y por ende la capacidad de generar la energía necesaria por respiración aeróbica- son reducidos (Ten and Pinsky, 2002; Tretyakov and Farber, 1995). La activación de HIF- α en las células endoteliales se cree que es fundamental como un modo de obtención de energía anaerobia mediante la inducción de enzimas glicolíticas, proceso del que las células endoteliales son extremadamente dependientes (Culic et al., 1997).

1.2 EL SISTEMA TRAQUEAL DE LOS INSECTOS Y SU REGULACIÓN POR HIPOXIA

1.2.1 LAS TRÁQUEAS CONFORMAN UN SISTEMA COMPLEJO DE TUBOS LLENOS DE AIRE QUE DISTRIBUYEN EL OXÍGENO A TODO EL ORGANISMO.

Los insectos también presentan un sistema tubular de reparto de oxígeno, las tráqueas, formado por alrededor de 10.000 tubos interconectados entre sí que transportan aire a través de todo el organismo (Ghabrial et al., 2003). Las tráqueas son tubos sencillos formados por una monocapa de células ectodérmicas que dejan un lumen vacío por el que puede fluir el aire, que

ingresa desde el exterior por espiráculos situados en los extremos de los tubos. Estos tubos se van tornando cada vez más y más finos conforme el aire avanza por el sistema, logrando una trama notablemente compleja que abastece a cada una de las células del individuo. El intercambio final de oxígeno con los tejidos se produce en unas finas extensiones tubulares –las traqueolas– que son similares a las arteriolas de los mamíferos. Si bien históricamente se asumió que este intercambio gaseoso en insectos se daba por difusión simple, y que el aire entraba a las tráqueas desde el exterior de igual manera, se ha demostrado recientemente que en realidad los insectos ventilan activamente y que las tráqueas se expanden y se contraen de un modo que se asemeja a los movimientos de **inflado y desinflado** que ocurre en los vertebrados pulmonados (Hetz and Bradley, 2005; Westneat et al., 2003). Así, el sistema traqueal comparte características con los sistemas respiratorio y el circulatorio de mamíferos: es el sistema por el que el aire entra al organismo, pero también el sistema de reparto del oxígeno que ha entrado. Veremos más adelante en esta introducción que incluso las bases moleculares de la morfogénesis de las tráqueas están conservadas, siendo la vía FGF (Fibroblast Growth Factor) la principal involucrada en el desarrollo tanto del pulmón de los mamíferos como de las tráqueas en *Drosophila*, pero también compartiendo con el sistema circulatorio respuestas fisiológicas y moleculares a hipoxia que lo hacen adecuado para modelar distintos desórdenes vasculares (Lubarsky and Krasnow, 2003; Placzek and Skaer, 1999; Uv et al., 2003; Wappner and Ratcliffe, 2001).

1.2.2 EL DESARROLLO DEL SISTEMA TRAQUEAL DE *DROSOPHILA*.

El sistema traqueal comienza a formarse muy temprano durante el desarrollo embrionario, unas 4 horas después de la fertilización del huevo y la formación del cigoto. En ese momento, 10 grupos celulares situados a cada lado del embrión, de aproximadamente 80 células cada uno (FIGURA 36, panel izquierdo superior) –es decir unas 1600 células traqueales en todo el organismo– se diferencian y comienzan a expresar la proteína Tracheiless (Trh), un Factor de Transcripción de la familia bHLH-PAS (Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996) que, junto con Drifter (Anderson et al., 1996; Anderson et al., 1995) –otro factor de transcripción, pero con dominios del tipo POU– confieren identidad traqueal a esas 1600 células ectodérmicas. Tracheiless y Drifter inducen la expresión de un número de genes traqueales necesarios para la formación de todo el sistema. Cada uno de estos grupos de células –en adelante *clusters*– se invaginan y comienzan a migrar estereotípicamente organizándose en tubos. Típicamente, seis frentes distintos de migración surgen de cada *cluster* celular, y estos frentes darán origen a seis diferentes ramas traqueales (2 de ellos al *tronco dorsal*, 1 a la *rama lateral anterior*, otro a la *rama lateral posterior*, otro a la *rama dorsal* y un último a la *rama espiracular*). Estos seis frentes migran, se encuentran y se fusionan con frentes provenientes de *clusters* situados en segmentos vecinos, formando finalmente tubos continuos que recorren enteramente al embrión (FIGURA 36, panel izquierdo inferior) (Samakovlis et al., 1996). Por ejemplo, la rama lateral anterior del segmento abdominal 4 se fusionará con la rama lateral posterior del segmento abdominal 3, y la rama lateral posterior de este mismo segmento se fusionará con la lateral anterior del segmento abdominal 5 (FIGURA 36). Las ramas dorsales, en cambio, no se fusionan con ramas de segmentos contiguos sino con la rama dorsal

contra-lateral del mismo segmento –migran dorsalmente y se encuentran en la línea media dorsal del embrión, del mismo modo que dos personas que recorren, desde el ecuador con dirección norte, una el meridiano de greenwich y otra el meridiano 180° se encontrarán inevitablemente en el polo norte. Todos estos eventos de migración precisa y extremadamente reproducible dependen de la interacción entre el ligando FGF Branchless (Bnl) y su receptor Breathless (Btl), donde Bnl se expresa dinámicamente fuera de las tráqueas funcionando como un quimioattractante y Btl se expresa dentro del sistema traqueal para leer la presencia de su ligando. En este proceso de migración, las tráqueas se dirigen hacia la posición donde Branchless se expresa y una vez que llegan, la expresión de Bnl se apaga para encenderse luego en otro grupo de células un poco más distantes (a algunos diámetros celulares de distancia) (FIGURA 36, derecha), generando así un patrón traqueal característico al término de la embriogénesis. La EXPRESIÓN DINÁMICA del ligando Bnl es entonces la que controla la migración traqueal y por ende, mutantes tanto para el ligando Bnl, como para el receptor Btl, presentan fenotipos similares de pérdida dramática de la migración traqueal (Klambt et al., 1992; Reichman-Fried and Shilo, 1995; Sutherland et al., 1996).

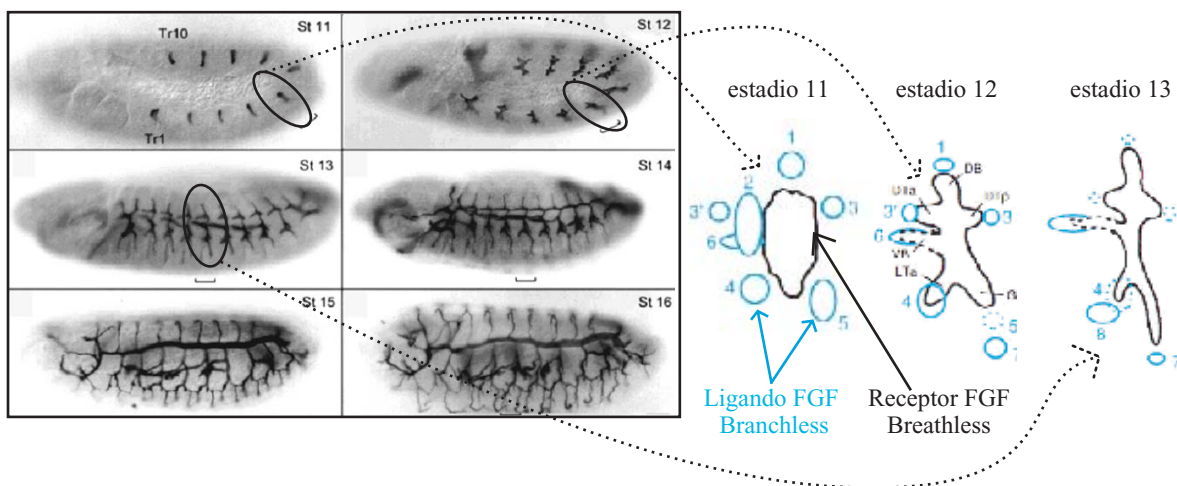


FIGURA 36. El desarrollo del sistema traqueal en *Drosophila* depende de la vía FGF (tomado de Samaklovis et al, (1996) Development 122:1395-407). Durante la embriogénesis, 10 sacos situados a cada lado del embrión se invaginan y comienzan a ramificarse en un patrón característico, originando un sistema tubular continuo que recorre todo el organismo. A la derecha se muestra en detalle el desarrollo del sistema traqueal en un único hemisegmento del embrión a lo largo de los distintos estadios de la embriogénesis. Se muestra la expresión del ligando FGF/Branchless (Bnl) fuera de los sacos traqueales y cómo las células traqueales que expresan el receptor FGF/Breathless (Btl) migran hacia las células que expresan Bnl. La expresión de Bnl es altamente dinámica durante el desarrollo embrionario, de modo que cuando la rama que se extiende llega a la posición donde se expresa *bnl*, éste deja de ser expresado allí y comienza a expresarse a unos diámetros celulares de distancia, dirigiendo nuevamente el crecimiento de la rama traqueal.

1.2.3 LAS CÉLULAS TERMINALES DE LAS TRÁQUEAS SON LAS ÚNICAS QUE PUEDEN RAMIFICARSE Y REPARTIR OXÍGENO A TODAS LAS CÉLULAS DE LA LARVA.

La misma vía de señalización Bnl/Btl que controla la migración de las distintas ramas traqueales durante la embriogénesis controla también otros aspectos del desarrollo y funcionalidad de las tráqueas, como ser la identidad adoptada por las distintas células que forman una misma rama. Previamente mencioné que las ramas traqueales migran y se fusionan con ramas vecinas; pues bien, existen células particulares con patrones de expresión génica característicos que

son las encargadas de este proceso de fusión –llamadas oportunamente “células de fusión”. Así como existen las células de fusión, existe otro tipo celular de importancia superlativa en el sistema traqueal: las CÉLULAS TERMINALES. Éstas son las ÚNICAS CÉLULAS CAPACES DE RAMIFICARSE intracelularmente y dar origen a las traqueolas finas donde finalmente se produce el intercambio de oxígeno con las distintas células del organismo. Ningún otro de los tipos de célula traqueal puede generar traqueolas; sólo las células terminales. Las traqueolas son PROYECCIONES CITOPLASMÁTICAS DOBLES Y CIEGAS, en el sentido que cada una de estas proyecciones celulares está recorrida internamente por una segunda proyección que rodea al lumen extracelular por donde circula el aire (un ejemplo figurativo sería tomar un globo/célula inflado e incidir sobre éste con un dedo, atravesándolo. Ese dedo, que haría las veces de lumen traqueal, está rodeado por dos capas de globo, una externa y otra interna, entre las que hay un mínimo de citoplasma; en la punta del dedo sigue habiendo globo –2 capas- y no hay abertura posible, de modo que ese lumen es ciego). ¿Qué es lo que hace que dentro del sistema traqueal una célula adopte identidad de célula terminal y otra no? La respuesta es que la célula que recibe los mayores niveles de señalización de la vía Bnl/Btl es la que adopta esa identidad y como resultado, comienza a expresar una serie de genes que confieren la propiedad exclusiva de ramificarse. Dentro de estos genes está incluido *dsrf* (también llamado *pruned* o *blistered*), que es el marcador por excelencia de las células terminales traqueales, y también el efector del programa de ramificación, ya que moscas mutantes para *dsrf* tienen impedida su capacidad de ramificación (FIGURA 37).

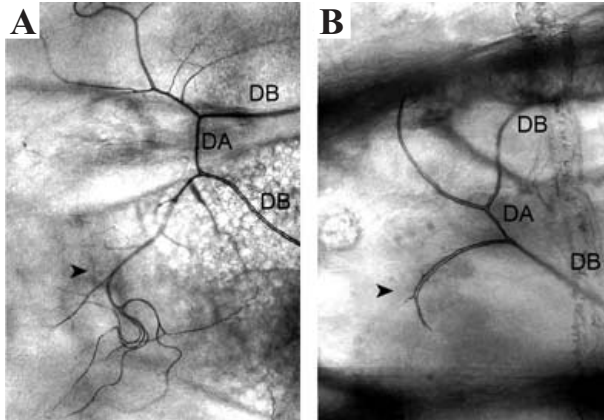


FIGURA 37. dSRF es un Factor de Transcripción necesario para la ramificación de las células terminales traqueales (tomado de Montagne et al, (1996) Development 122: 2589-97). **A.-** Las larvas salvajes presentan células terminales traqueales (cabeza de flecha) con un patrón de ramificación complejo. **B.-** Larvas mutantes homocigotas para *dsrf* no presentan ramificaciones de ningún tipo en sus células terminales (cabeza de flecha). DB, rama dorsal; DA, fusión dorsal.

1.2.4 LA RAMIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRAQUEALES ESTÁ REGULADA POR LOS NIVELES DE OXÍGENO DISPONIBLE.

Durante el estadio larval, las células terminales de las tráqueas experimentan un crecimiento asombroso, que acompaña el crecimiento corporal del individuo. El patrón de ramificaciones de las células terminales de las distintas ramas se va tornando cada vez más y más complejo, puesto que deben suplir de oxígeno a un mayor volumen corporal (FIGURA 38). Experimentos clásicos de fisiología de insectos realizados por Wigglesworth en los años 50's demostraron en *Rhodnius Prolixus* que el patrón de ramificaciones de las células terminales de las tráqueas en estadios larvales es extremadamente plástico y particularmente sensible a los niveles de oxígeno. Como ya se ha dicho en esta introducción, los insectos presentan un sistema traqueal

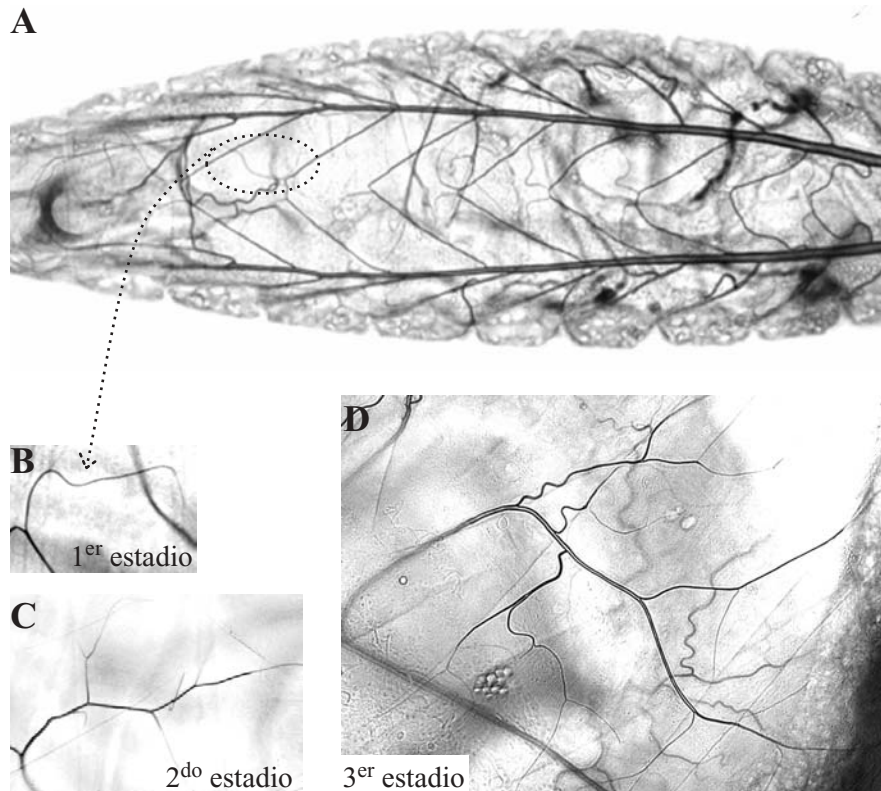


FIGURA 38. Las células terminales traqueales aumentan su ramificación a lo largo del desarrollo larval. Las tráqueas forman un complejo sistema tubular que reparte oxígeno a las distintas células del organismo. **A.-** Larva de primer estadio mostrando el sistema de tubos llenos de aire que recorren todo el cuerpo del individuo. **B-D.-** Detalle de una célula terminal traqueal de una larva de primer estadio (**B**), segundo estadio (**C**) y tercer estadio (**D**). Nótese como aumenta la ramificación traqueal a medida que la larva avanza en su desarrollo.

segmentado, donde las ramificaciones de una célula terminal en un segmento determinado provee de oxígeno a ese segmento pero no invade segmentos vecinos. Lo que Wigglesworth observó fue que si dejaba sin tráqueas a un segmento X (mediante una obstrucción mecánica) de modo tal que este segmento quedase sin aporte de oxígeno, entonces las células terminales de segmentos contiguos (X-1 y X+1) invadían al segmento X proporcionando el oxígeno faltante. En la misma línea, si en un segmento dado se transplantaba un órgano metabólicamente activo (y por consiguiente gran consumidor de oxígeno) veía que nuevas ramificaciones traqueales rodeaban al órgano transplantado, proporcionándole el oxígeno que éste demandaba. Wigglesworth concluyó así que el segmento X, tanto como las zonas hipóxicas o demandantes de oxígeno en general, deberían de estar *llamando* a las tráqueas vecinas a través de algún mecanismo que por entonces quedó sin determinar. Casi 45 años más tarde, y con el advenimiento de las técnicas de biología molecular que permitían ahora silenciar o sobre-expresar genes a voluntad en lugares elegidos, se descubrió en larvas de *Drosophila* que el factor que atraía el crecimiento de las traqueolas era el mismo que controlaba la migración traqueal durante la embriogénesis, el ligando FGF/Branchless (Jarecki et al., 1999). Ahí donde se expresaba *branchless* se dirigían nuevas ramificaciones de células terminales traqueales, que invadían a la/las células o el/los

órganos en cuestión (FIGURA 39 A y B). En el mismo trabajo se determinó que larvas crecidas a bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) presentan un mayor número de ramificaciones en sus células terminales traqueales y aquellas crecidas a altas concentraciones de oxígeno (hiperoxia) presentan un menor número de ramificaciones. En la misma línea, correlacionando con estos fenotipos, los autores mostraron que los niveles proteicos de Branchless también son función de la cantidad de oxígeno presente: en hipoxia hay niveles de Bnl más altos que en normoxia (y más ramificaciones de las células terminales traqueales), y en hiperoxia hay menos Bnl (y menos ramificaciones) (FIGURA 39 C y D).

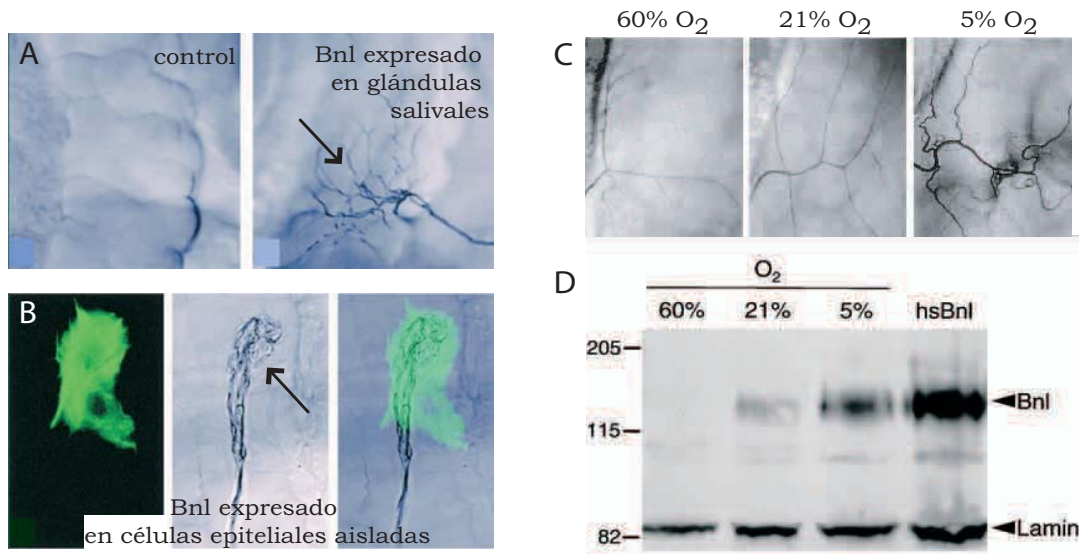


FIGURA 39. Branchless(Bnl)/FGF es un factor de crecimiento que se acumula en hipoxia promoviendo la ramificación traqueal (tomado de Jarecki et al, (1999) Cell 99:211-20). La ramificación de las células terminales traqueales depende de los niveles de O₂ y de los niveles de Bnl. **A.-** La expresión de Bnl es suficiente para dirigir la migración de las tráqueas hacia un tejido al que habitualmente no llegan. A la izquierda se ve una glándula salival salvaje que no expresa Bnl y carece de irrigación traqueal. Si se expresa ectópicamente Bnl en la glándula salival, ahora las tráqueas irrigan ese tejido (flecha). **B.-** La acumulación de Bnl en una célula individual ectodérmica (marcada con GFP) atrae nuevas ramificaciones de células terminales traqueales (flecha en el panel central). **C.-** La ramificación de las células terminales traqueales es función de los niveles de oxígeno. En hiperoxia hay menos ramificaciones y en hipoxia hay un mayor número de ramificaciones. **D.-** Western Blot revelado con un anticuerpo contra la proteína Bnl (Ab α Bnl). Extractos de larvas crecidas a distintas concentraciones oxígeno fueron separados en un gel de poliacrilamida e incubados con el anticuerpo Ab α Bnl, mostrando que los niveles de la proteína Bnl aumentan cuando las larvas son crecidas a bajas concentraciones de O₂ y disminuyen cuando las larvas son crecidas a altas concentraciones de O₂.

El modelo propuesto entonces era que Bnl se inducía fuera de las tráqueas en condiciones de hipoxia y que esta inducción causaría la sobre-ramificación de las tráqueas observada cuando las larvas se crecían a bajas concentraciones de oxígeno. Más adelante nuestro laboratorio y otros grupos reportaron la existencia en *Drosophila* de los genes de Sensado y respuesta a Oxígeno (Bruick and McKnight, 2001; Gorr et al., 2004; Lavista-Llanos et al., 2002), y SE ASUMIÓ que la regulación por hipoxia que ocurría sobre Bnl sería transcripcional: Sima induciría a Bnl del mismo modo que en vertebrados HIF induce a VEGF –ambos funcionarían como atractantes del sistema que reparte oxígeno hacia zonas que sensan hipoxia.

Teniendo en cuenta las similitudes funcionales entre el sistema vascular de mamíferos y el sistema traqueal de las moscas, la idea fundamental del presente capítulo fue analizar la relevancia de la respuesta transcripcional a hipoxia dentro del sistema traqueal -o sea, dentro del sistema que reparte oxígeno a las distintas células del organismo. El modelo existente contemplaba entonces la inducción por hipoxia de genes extra-traqueales, implicando que el sensado de oxígeno ocurría en los tejidos hipóxicos que atraerían a las tráqueas para que provean el oxígeno faltante. Analizaremos aquí cuál es la función de los genes de Sensado de Oxígeno (Fga y Sima, caracterizados en los capítulos previos) en la respuesta de sobre-ramificación traqueal y a través de qué mecanismos participarían en esta respuesta de las tráqueas a hipoxia.

2.- OBJETIVOS PARTICULARES

LOS OBJETIVOS PROPUESTOS PARA ESTE CAPÍTULO SON:

.-ESTUDIAR LA INCIDENCIA DE LOS GENES DE SENSADO Y RESPUESTA A HIPOXIA EN LA SOBRE-RAMIFICACIÓN DEL SISTEMA TRAQUEAL DE LAS LARVAS DE DROSOPHILA EXPUESTAS A HIPOXIA.

.-ANALIZAR LA RELEVANCIA DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA DENTRO DE LAS CÉLULAS TRAQUEALES.

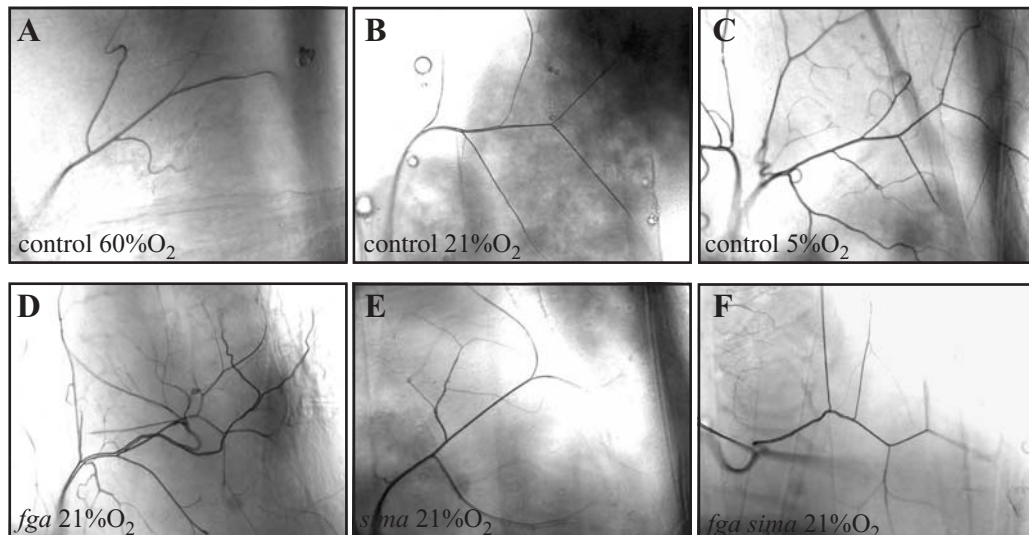
.-ENCONTRAR Y CARACTERIZAR LOS BLANCOS TRANSCRIPCIONALES DE SIMA QUE MEDIAN LA RESPUESTA DE SOBRE-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL.

3.- RESULTADOS

3.1 LA VÍA FATIGA-SIMA MODULA EL DESARROLLO DEL SISTEMA TRAQUEAL

3.1.1 LA FALTA DE FATIGA RESULTA EN LOS MISMOS FENOTIPOS TRAQUEALES QUE LA FALTA DE OXÍGENO.

Previamente, Jareki y colaboradores (Jarecki et al., 1999) habían reportado que el patrón de ramificaciones de las células terminales del sistema traqueal de las larvas de *Drosophila* variaba dependiendo de los niveles de oxígeno de la atmósfera circundante. A niveles de oxígeno mayores, había una menor ramificación de las células terminales traqueales; a niveles de oxígeno menores, mayor ramificación. En el laboratorio reproducimos estos resultados estableciendo nuestros propios criterios de cuantificación, tal como se muestra en la FIGURA 40A-C. Nuestra intención era analizar si esta respuesta a niveles variables de oxígeno estaba mediada por Fga y Sima, esto es, si dependía de una respuesta transcripcional a hipoxia.



G	ramas		ES	
	ramas	ES	N	%
w 60%O ₂	4.82 ± 0.109	N=125	85.3%	*
w 21%O ₂	5.65 ± 0.095	N=116	100%	
w 5%O ₂	8.76 ± 0.172	N=109	155%	*
<i>fga</i> 21%O ₂	9.49 ± 0.229	N=72	168%	*
<i>sima</i> 21%O ₂	5.17 ± 0.14	N=71	91.5%	
<i>fga sima</i> 21%O ₂	5.14 ± 0.135	N=66	91%	ψ

FIGURA 40. Las larvas mutantes para *fga* presentan tráqueas más ramificadas. Larvas salvajes de tercer estadio crecidas a distintas concentraciones de oxígeno o larvas mutantes homocigotas para *fatiga* y *Sima* fueron analizadas en cuanto a su patrón de ramificación traqueal. Las larvas fueron anestesiadas con éter etílico, montadas en Glicerol 40% y se contaron las ramificaciones con un diámetro mayor a 1µm en las células terminales de la rama dorsal. Larvas salvajes crecidas en hiperoxia (A) presentan menos ramificaciones que las crecidas en normoxia (B), y éstas a su vez menos ramificaciones que las crecidas en hipoxia (C). Larvas mutantes para *fga* crecidas en normoxia (D) presentan patrones de ramificación similares a los de las larvas salvajes crecidas en hipoxia (comparar con C). Larvas mutantes para *sima* (E) presentan un patrón de ramificaciones similar al de las larvas salvajes compara con (B). (F) Las larvas doble mutantes *fga sima* revirtieron el fenotipo de sobre-ramificación traqueal de los mutantes *fga* presentando patrones similares a los de las larvas salvajes (comparar con E y B). **G.-** Cuantificación del número de ramas traqueales en la célula terminal dorsal, mostradas en A-F. (*) es significativamente distinto del salvaje (p<0.001); y (ψ) es significativamente distinto de *fga* (p<0.001).

Si bien la mayoría de los alelos *fga* que habíamos creado en el laboratorio (Capítulo 1 de esta Tesis) eran letales en estadios larvales tempranos, ciertas combinaciones alélicas fueron viables hasta estadios más avanzados, haciendo posible un estudio del patrón de ramificaciones del sistema traqueal en larvas de 3^{er} estadio. Observamos que larvas mutantes para *fga* crecidas a 21% O₂ presentaban un patrón de ramificaciones aumentado con respecto a los controles salvajes (FIGURA 40D). Este hecho nos hacía pensar que efectivamente, una hipoxia *genética* (la falta de *fatiga*) podía causar los mismos fenotipos que la hipoxia ambiental (la falta de oxígeno), sugiriendo fuertemente que la respuesta transcripcional a hipoxia estaba jugando un rol fundamental en la sobre-ramificación traqueal. Para asignarle un rol causal a la estabilización de Sima en este fenotipo particular, debíamos analizar larvas dobles mutantes *fga sima*. Previamente, al analizar el patrón traqueal de los mutantes *sima*, encontramos que el número de ramificaciones traqueales no difería del de los controles salvajes, o era incluso sutilmente menor (FIGURA 40E). Analizamos entonces las larvas *fga sima*, y éstas presentaron un número de ramificaciones significativamente menor del presentado por las mutantes *fga* y que era igual, o incluso sutilmente menor, que el de los controles salvajes (FIGURA 40F). Concluimos por lo tanto que los efectos de la pérdida del Sensor Molecular de Oxígeno en el patrón de ramificación traqueal está mediado exclusivamente por la estabilización de la proteína Sima, demostrando que estos genes están involucrados en el control de la ramificación de las tráqueas. Quedaba por determinar, entonces, cuál o cuáles eran los blancos transcripcionales de la vía Fga/Sima que contribuían a la sobre-ramificación traqueal. Los experimentos de Jarecki y col. sugerían fuertemente que *bnl* podría ser este blanco transcripcional, puesto que a nivel proteico se observaba un aumento de Bnl en hipoxia. Esta hipótesis es la que analizamos en el siguiente punto.

3.1.2 ¿*branchless* ES UN BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA?

Para establecer si Sima o la exposición de larvas a hipoxia inducen transcripcionalmente a *branchless*, diseñamos diversos experimentos tanto moleculares -para detectar su mRNA- como funcionales -para detectar por fenotipo la acumulación de la proteína. En ninguno de los experimentos, que se mencionan a continuación, fuimos capaces de detectar un incremento de *branchless* como consecuencia de una inducción mediada por Sima: **a)** hiper-expresamos la proteína Sima en diversos patrones embrionarios y analizamos mediante ensayos de hibridización *in situ* de mRNA la aparición de patrones ectópicos de *branchless* en estos embriones. En ningún caso detectamos *bnl* fuera de su patrón de expresión salvaje (resultados no mostrado); **b)** mediciones de actividad β-gal en líneas *enhacer-trap* del gen *bnl* no presentaron niveles aumentados en hipoxia respecto de normoxia (resultados no mostrado); **c)** análisis moleculares durante la embriogénesis de un blanco transcripcional inducible por la vía Bnl, dSRF, mostraron que mientras la hiper-expresión de Bnl inducía la expresión de este factor en lugares ectópicos, esto no sucedía cuando se hiper-expresaba Sima, favoreciendo la noción que Sima no induce a Bnl (FIGURA 41).

Diseñamos luego un experimento cuyo análisis se basaba en la FUNCIÓN de quimio-atractivo traqueal de Bnl, previamente descripta (Jarecki et al., 1999; Sutherland et al., 1996). Las tráqueas

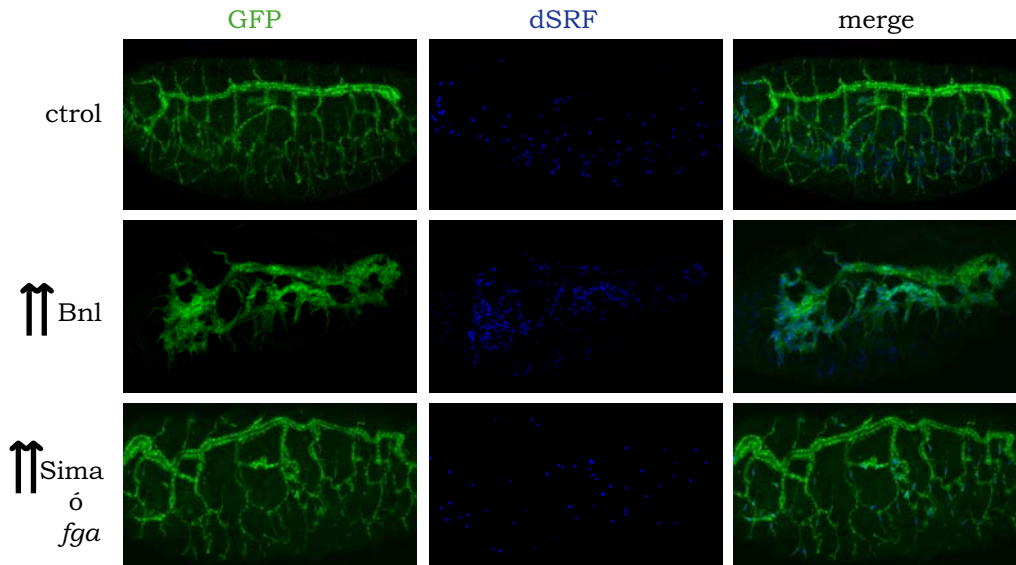


FIGURA 41. La Hiper-expresión de Sima no fenocopia la hiper-expresión de Bnl. Embriones *btl*/Gal4 *UAS*GFP (control), o cruzamientos de éstos por *UAS*Bnl ó *UAS*Sima (expresan Bnl o Sima respectivamente en tráqueas) fueron recolectados en estadios embrionarios. Sobre ellos se realizaron tinciones con anticuerpos antiGFP (en verde, para analizar la morfología del sistema traqueal) y anti dSRF (en azul, para analizar la activación de la vía FGF). La hiper-expresión de Bnl provocó que virtualmente todas las células traqueales expresen dSRF; la hiper-expresión de Sima no aumentó el número de células positivas para dSRF.

son extremadamente sensibles a los niveles de Bnl y al lugar donde este ligando se expresa, de modo que el análisis del comportamiento traqueal tras la sobre-expresión de Bnl en comparación con el efecto tras a sobre-expresión de Sima era un ensayo sensible para revelar una posible inducción de *bnl* tal vez difícil de detectar por métodos moleculares clásicos. Sobre-expresamos Bnl al azar en células aisladas de larvas utilizando la técnica de *flip-out* (ver Anexo 4: "EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES DE INTERÉS EN CÉLULAS AISLADAS AL AZAR") y, de acuerdo a lo previamente reportado, un gran número de traqueolas se dirigió hacia las células que expresaban Bnl (FIGURA 42A). Realizamos luego el mismo experimento, pero ahora sobre-expresando Sima en células al azar y analizamos si el mismo efecto quimio-atractivo se daba en estos clones. De los más de 100 clones analizados, en ningún caso se acumularon traqueolas en las células que expresaban Sima (FIGURA 42B), favoreciendo una vez más la noción de que Sima NO MEDIA la inducción transcripcional ó post-transcripcional de Bnl. Curiosamente, la expresión de Sima en células epiteliales provocaba la formación de estructuras de tipo filopodios que no se veían en las células que sobre-expresan Bnl (FIGURA 42CyD); estos filopodios salían de las células que expresaban Sima y se alejaban a varios cuerpos celulares de distancia. De este modo, la acumulación de Sima en células epiteliales resultaba en un efecto autónomo de célula de formación de filopodios (discutido más adelante, en el punto 4.3.3 del presente Capítulo).

Entonces, si la acumulación de Sima en los mutantes *fatiga* causa los fenotipos de sobre-ramificación traqueal reportados y dado que Sima no induce a Bnl ¿de qué manera Sima induce el fenotipo de sobre-ramificación traqueal? ¿Existen genes inducibles por Sima que pueden mediar este proceso? ¿Cuáles son los genes candidatos? Y para tener claves que permitan identificarlos, ¿dónde se observa *in vivo* la inducción transcripcional de genes por hipoxia?

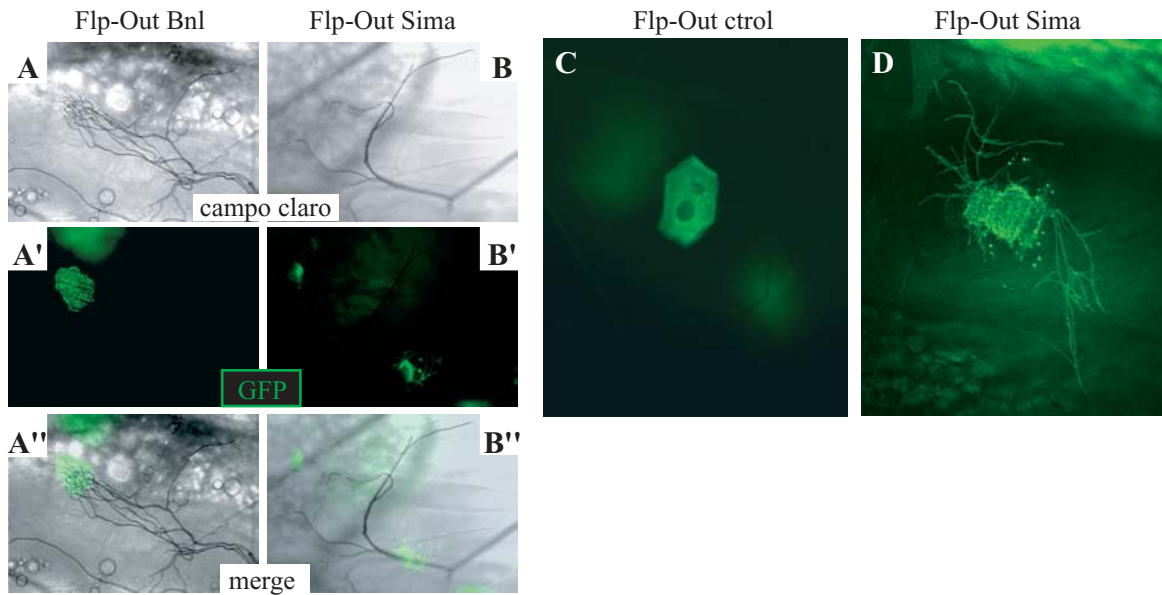


FIGURA 42. Células que hiper-expresan Sima no atraen nuevas ramificaciones traqueales, sino que exhiben proyecciones citoplasmáticas del tipo filopodio. Análisis de la propiedad quimio-atractiva de las tráqueas de Bnl y de Sima. **A.-** La sobre-expresión de Bnl en células ectodérmicas individuales mediante la técnica de *flip-out* se visualizó mediante la co-expresión de GFP. Bnl tiene actividad de quimio-atractiva traqueal, ya que numerosas traqueolas se dirigen hacia la célula epidérmica que expresa Bnl y GFP. **B.-** La expresión de Sima mediante la misma estrategia en las mismas células no tiene actividad quimio-atractiva sobre las traqueolas. **C y D.-** detalle de B. Las células que hiper-expresan Sima se visualizan por la co-expresión de un GFP fusionada a CD8, de modo de poder observar la membrana plasmática de la célula en estudio. La expresión de esta GFP no provoca ningún fenotipo aparente (**C**), mientras que la expresión de Sima resulta en la formación de estructuras membranosas del tipo filopodios que emergen desde esta célula y se dirigen a varios cuerpos celulares de distancia (**D**).

3.1.3 LAS CÉLULAS TERMINALES TRAQUEALES SON LAS PRIMERAS EN RESPONDER TRANSCRIPCIONALMENTE A HIPOXIA.

En capítulos previos, hemos mencionado que el reportero *2xldhGal4 UASGFP* inducible por hipoxia se induce en el sistema traqueal en estadios embrionarios y larvales, sugiriendo que el perfil de expresión génica DENTRO DE LAS TRAQUEAS podría estar influenciado por la exposición a hipoxia. Decidimos entonces caracterizar mejor esta respuesta transcripcional para evidenciar si el proceso de sobre-ramificación traqueal y la respuesta transcripcional a hipoxia dentro de las tráqueas correlacionaban. Para comenzar, decidimos estudiar *in vivo* la respuesta transcripcional a hipoxia en estadios larvales, que eran aquellos en los que habíamos analizado los cambios morfológicos que ocurrían en el sistema traqueal. Utilizamos el reportero transcripcional *2xldhGAL4 UASGFP* descrito en el Capítulo 1, el cual nos permitía el seguimiento de la señal GFP en larvas vivas bajo la lupa o el microscopio de fluorescencia. Los estudios iniciales con este reportero transcripcional revelaron que las células traqueales eran las primeras en responder a bajas concentraciones de oxígeno (ver Capítulo 1). Un análisis más detallado dentro del mismo sistema traqueal nos permitió afirmar que no todas las células se comportaban de igual manera con respecto a la inducción del reportero transcripcional. Las células terminales de las tráqueas son más sensibles a los niveles de oxígeno ya que encienden débilmente el reportero aún en condiciones de normoxia (FIGURA 43A). Para analizar si esta expresión estaba efectivamente revelando una respuesta transcripcional activada dentro de estas células particulares, decidimos colocar las larvas a 60% O₂ y analizar si la expresión del reportero

2xldhGAL4 UASGFP desaparecía; efectivamente, la expresión de la GFP en estas células se redujo casi totalmente en la condición de hiperoxia (FIGURA 43B-C). Dentro del mismo esquema de razonamiento, si la expresión del elemento *2xldhGal4* dependiera de la estabilización de la proteína Sima dentro de estas células específicas, la inducción del reportero debería desaparecer en larvas mutantes para *sima*. Mediante cruzamientos genéticos colocamos el reportero *2xldhGal4 UASGFP* en individuos mutantes homocigotas para *sima* y observamos ahora que las larvas resultantes no expresaban el reportero en las células terminales (FIGURA 43D), revelando que el encendido del gen reportero en estas células en normoxia depende de Sima. Concluimos por lo tanto que las células terminales traqueales son las más sensibles a la inducción del reportero *2xldhGal4*, y que esta inducción depende de los niveles de oxígeno disponible y de los genes de respuesta a hipoxia.

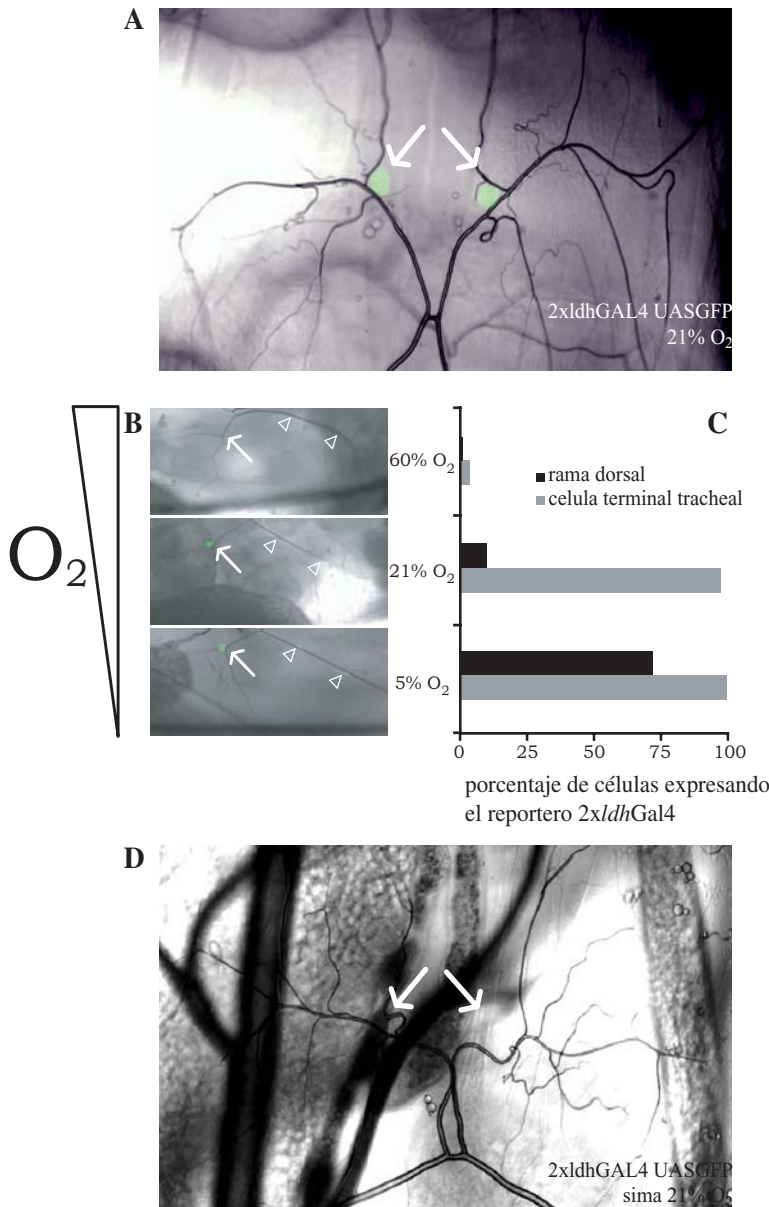


FIGURA 43. Las células terminales traqueales inducen el reportero *2xldhGal4 UASGFP* con alta sensibilidad. El reportero *2xldhGal4 UASGFP* permite el análisis *in vivo* de la respuesta a hipoxia en larvas de tercer estadio, dado que la construcción *UASGFP* lleva una señal de localización nuclear, los núcleos de las células que expresan el reportero son visibles. **A.-** Las células terminales traqueales expresan el reportero aún en normoxia (flechas). **B.-** El reportero *2xldhGal4 UASGFP* no se expresa en tráqueas a 60% O₂. A medida que bajan los niveles de oxígeno, el reportero se expresa primero en células terminales (21% O₂) y luego en todas las células traqueales (5% O₂) (las flechas indican la posición del núcleo de la célula terminal traqueal, las puntas de flecha la posición del núcleo del resto de las células traqueales de la rama dorsal). **C.-** Cuantificación de los porcentajes de células terminales ó traqueales-no-terminales que expresan el reportero *2xldhGal4 UASGFP* a 5%, 21% y 60% de O₂ (N>100). **D.-** larvas mutantes homocigotas para *sima*⁷⁶⁰⁷ no presentan expresión del reportero *2xldhGal4 UASGFP* en las células terminales traqueales (flecha) en condiciones de normoxia (comparar con A).

Es interesante notar –una vez más– que las células terminales traqueales son las únicas capaces de ramificarse emitiendo finos procesos que llevan oxígeno a los distintos tejidos de la larva. Esto refuerza aún más la correlación entre la inducción transcripcional dependiente de oxígeno DENTRO de las tráqueas y la posibilidad de una regulación de la ramificación celular por factores intra-traqueales: a mayores concentraciones de oxígeno, menor es el encendido del reportero transcripcional a hipoxia dentro de las tráqueas y menor la ramificación traqueal; a medida que el oxígeno decrece, el reportero comienza a expresarse cada vez con mayor intensidad dentro las tráqueas (y también en un mayor número de células dentro de las tráqueas), y la ramificación traqueal aumenta consecuentemente. Los experimentos que se describen en los siguientes puntos estuvieron destinados a responder si este fenómeno es una simple correlación o si por el contrario involucra causalidad.

3.1.4 LA HIPER-EXPRESIÓN DE SIMA DENTRO DE LA TRÁQUEAS ES SUFICIENTE PARA GENERAR LOS FENOTIPOS TRAQUEALES OBSERVADOS EN LOS MUTANTES *fatiga*.

Tanto en las larvas crecidas en condiciones de hipoxia, como en los mutantes *fga* y en los doble mutantes *fga sima* analizados, todas las células del organismo eran sometidas al mismo estímulo (hipoxia atmosférica –bajos niveles de oxígeno– o hipoxia genética –bajos niveles de Fatiga), de modo que los fenotipos encontrados eran explicables por una regulación génica indistintamente DENTRO O FUERA de las tráqueas. Para responder si los efectos de sobre-ramificación traqueal observados en hipoxia y en mutantes *fga* se debían a la inducción de genes dentro de las tráqueas mediada por Sima, decidimos expresar la proteína Sima exclusivamente dentro de la tráqueas en larvas *btlGal4 UASSima*. Como esta expresión resulta en problemas de vaciado del lumen durante la embriogénesis (descrito previamente en los Capítulos 1 y 2) y la subsiguiente letalidad temprana, necesitábamos ser capaces no sólo de dirigir la expresión de Sima hacia las tráqueas sino también de controlar el momento del desarrollo en el que expresábamos la proteína Sima. El desafío era lograr individuos que tuvieran silenciada la expresión del transgén durante la embriogénesis y el primer estadio larval, y que fueran capaces de expresarlo en estadios larvales tardíos. La REGULACIÓN TEMPORAL de la expresión del inductor *btlGal4* (exclusivamente traqueal) la conseguimos con la expresión concomitante de una construcción que expresa constitutivamente una forma termo-sensible del represor Gal80 (Gal80^{ts}) (McGuire et al., 2003). A temperaturas bajas (temperaturas permisivas), este represor es estable y bloquea la acción de Gal4, impidiendo la expresión de Sima, permitiendo la sobrevivencia de la larva. Cuando estas larvas son colocadas a temperaturas mayores (temperaturas restrictivas), Gal80 no puede funcionar y queda anulada la represión sobre Gal4, de modo que Sima ahora se expresa en las tráqueas bajo el control del inductor *btlGal4* (FIGURA 44A y B). Comparamos entonces larvas que llevaban las construcciones descritas (*btlGal4 tubGal80^{ts} UASSima*) con larvas controles (*btlGal4 tubGAL80^{ts} UASLacZ*) y observamos que la expresión de Sima en las tráqueas de larvas de tercer estadio resultaba en un aumento en la ramificación de las células terminales (FIGURA 44C y D). Estos resultados demuestran que la acumulación de

Sima en tráqueas durante los estadios larvales tardíos de *Drosophila* es suficiente para generar la sobre-ramificación de las células terminales traqueales.

Además de la sobre-ramificación observada en las células terminales traqueales de la rama dorsal en las larvas que hiper-expresan Sima, encontramos otros fenotipos que también indican formación adicional de traqueolas. En la FIGURA 44E-G se muestra el caso de una célula terminal correspondiente a la rama lateral del segmento 7, que presenta gran cantidad de finos procesos llenos de aire. Estos mismos fenotipos se observaron en los mutantes *fga*, indicando nuevamente que todos los fenotipos descritos hasta ahora a lo largo de este Capítulo se deben a la estabilización de Sima dentro de las tráqueas y a la consecuente inducción de genes dentro de este tejido particular.

Los experimentos descritos favorecen por lo tanto la noción de que genes expresados dentro de las tráqueas son blancos transcripcionales de Sima que median la sobre-ramificación traqueal.

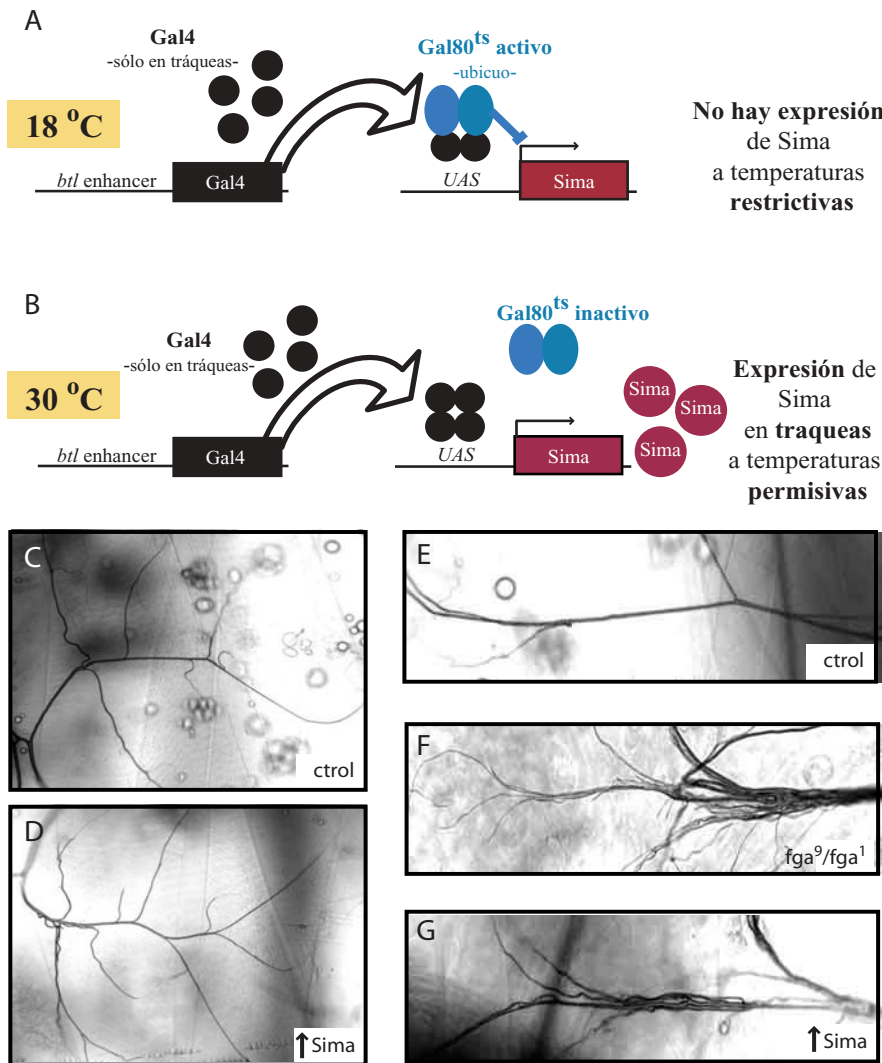


FIGURA 44. Control temporal-especial de la expresión génica utilizando una forma termo-sensible del represor Gal80. Gal80^{ts} funciona como represor de Gal4 a bajas temperaturas, mientras que a altas temperaturas pierde funcionalidad como represor. **A.-** a 18 C, Gal4 expresado en tráqueas bajo el control del promotor *breathless* no funciona sobre UAS-Sima por la presencia de un elemento Gal80 activo. **B.-** a 30 C, el Gal80 no funciona y libera la represión sobre el Gal4, de modo que Sima se comienza a acumular en tráqueas. **C-D.-** La sobre-expresión de Sima en las tráqueas en estadios larvales avanzados (D) resulta en la sobre-ramificación de las células terminales traqueales en comparación con larvas control (C). **E-G.-** La acumulación de Sima en las tráqueas resulta en fenotipos adicionales similares a los que presentan larvas mutantes para *fga*. En larvas salvajes (ctrl), la rama lateral traqueal presenta un lumen principal del que no se desprenden ramificaciones (E). En larvas mutantes para *fga* (F) o en larvas que sobre-expresan Sima en las tráqueas mediante el sistema descrito en A-B, las ramas laterales presentan una gran cantidad de procesos traqueales que emergen desde las ramas laterales.

3.2 EL RECEPTOR DE FGF, *breathless*, ES UN GEN TRAQUEAL INDUCIBLE POR HIPOXIA

Los resultados de sobre-ramificación de las células terminales de las tráqueas reportados en el punto anterior nos llevaron a buscar al gen candidato que, al ser inducido en las células traqueales, causa esos fenotipos. Un candidato posible era el Receptor de FGF, *breathless*, dado que la vía de señalización disparada por este receptor media el proceso de ramificación traqueal. Los experimentos que se muestran a continuación fueron diseñados para confirmar o descartar a *breathless* como gen regulado por hipoxia a través de los genes de la vía de Sensado de Oxígeno y que a su vez media la sobre-ramificación traqueal.

3.2.1 LOS NIVELES DE Transcripción a Partir del Promotor DE *breathless* AUMENTAN EN HIPOXIA.

El primer punto a analizar era si *btl* era un gen cuya transcripción se veía aumentada en hipoxia. Para contestar esto cuantificamos los niveles de transcripción de *btl* en una línea con un *enhancer-trap* LacZ en el locus *breathless* (*btl^{H82Δ3}*), de modo que la expresión de LacZ en esta línea es indicativa de la expresión endógena del gen (FIGURA 45A). Medimos entonces la actividad β-galactosidasa en extractos preparados a partir de larvas crecidas a distintas concentraciones de oxígeno y observamos una actividad enzimática mucho mayor en los extractos de larvas crecidas en hipoxia en comparación con la de los obtenidos a partir de larvas que permanecieron en normoxia (FIGURA 45B). Así, podemos afirmar que *btl* es un gen cuyos niveles de expresión dependen de la concentración de oxígeno presente en el ambiente.

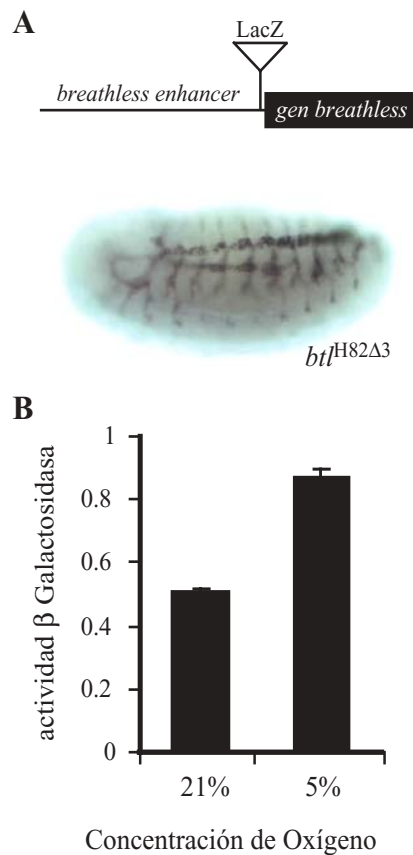


FIGURA 45. *breathless* es un gen inducible por hipoxia. A.- El *enhancer-trap* *btl^{H82Δ3}* está inserto próximo al inicio de la transcripción del gen *btl* y copia su patrón de expresión. **B.-** Mediciones de actividad β-Gal a partir de extractos de larvas heterocigotas para el *enhancer-trap*, que fueron crecidas a 21% o 5% O₂. Las larvas crecidas en hipoxia presentaron mayores niveles de β-gal que las crecidas en normoxia, lo que refleja inducción transcripcional del gen *btl* en hipoxia.

Analizamos también un segundo reportero de *Breathless*, que consistía en una proteína de fusión de este receptor con GFP, resultando en una proteína Btl funcional que puede ser seguida *in vivo* mediante observación al microscopio de fluorescencia (Sato and Kornberg, 2002). Esta quimera está sujeta a la regulación post-traducciona de Btl, que tiene una tasa de recambio muy alta, de modo que en condiciones normales su expresión es detectada en el sistema traqueal pero muy débilmente. Interesantemente, la máxima expresión de este reportero de Btl se da en las células terminales (FIGURA 46), justamente las únicas de todo sistema traqueal que son capaces de ramificarse.

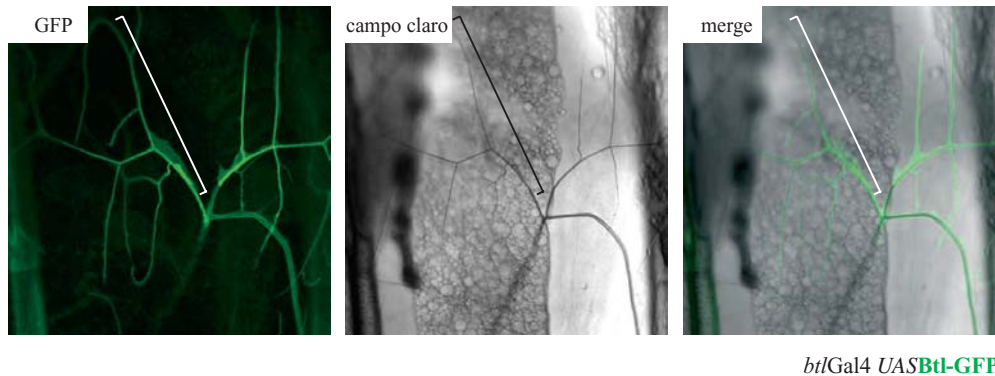


FIGURA 46. *Breathless* se acumula en células terminales traqueales. Larvas de tercer estadio expresando una versión de Btl fusionado a GFP a través del inductor *btlGal4* permiten la observación de la distribución de este receptor *in vivo*. La proteína quimérica Btl-GFP es particularmente abundante en las células terminales traqueales (corchetes); en el resto del árbol traqueal la intensidad de GFP es menor.

Estos resultados indican que Btl se acumula mayormente en las células terminales traqueales, y que sus niveles de expresión génica aumentan en condiciones de hipoxia. El comportamiento general del gen es por lo tanto similar al del reportero de hipoxia *2xldhGal4*. Para asignarle a Btl un rol en la respuesta de sobre-ramificación traqueal en hipoxia debíamos ser capaces de demostrar primero que *btl* es un blanco transcripcional de Sima, y luego que un aumento en los niveles de la proteína Btl provocan el fenotipo de sobre-ramificación en las células terminales traqueales.

3.2.2 *BREATHLESS* ES UN BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA.

Decidimos entonces analizar si la sola expresión de Sima era suficiente para causar la acumulación de *breathless*. Para esto realizamos experimentos de sobre-expresión de Sima durante la embriogénesis, cuando *btl* se expresa en un patrón característico de 10 parches a cada lado del embrión (Glazer and Shilo, 1991)(FIGURA 47A). Se sabe que en condiciones normales, la expresión de *btl* en estos parches está regulada por la actividad conjunta de dos Factores de Transcripción distintos, *Tracheiless* y *Drifter* (Anderson et al., 1996). Mientras que *Tracheiless* se expresa únicamente en estos mismos 10 parches a cada lado del embrión, *Drifter* tiene una expresión en tres parches adicionales. Allí donde los patrones de expresión de ambos factores de transcripción coinciden *btl* puede expresarse, de modo que si se aumentan los niveles de *Tracheiless* utilizando promotores ubicuos, se obtienen hasta 3 PARCHES ADICIONALES de *btl*, que

coinciden con los dominios de expresión de Drifter (Wilk et al., 1996)(FIGURA 47B). Cuando realizamos el mismo experimento de sobre-expresión, pero ahora utilizando a Sima en lugar de Tracheless, también observamos que la expresión de *btl* se indujo en parches traqueales adicionales, implicando que Sima puede inducir la expresión de *btl* en dominios donde antes *btl* no se expresaba (FIGURA 47C). Para analizar luego si la inducción de *btl* por parte de Sima se daba también en el sistema traqueal de larvas, sobre-expresamos Sima en larvas conteniendo un reportero transcripcional *btlGal4 UASGFP*. En la FIGURA 47DyE se muestra que la expresión de Sima en tráqueas resulta en un aumento dramático de la expresión del reportero, evidenciando que el promotor de *btl* es inducible por Sima.

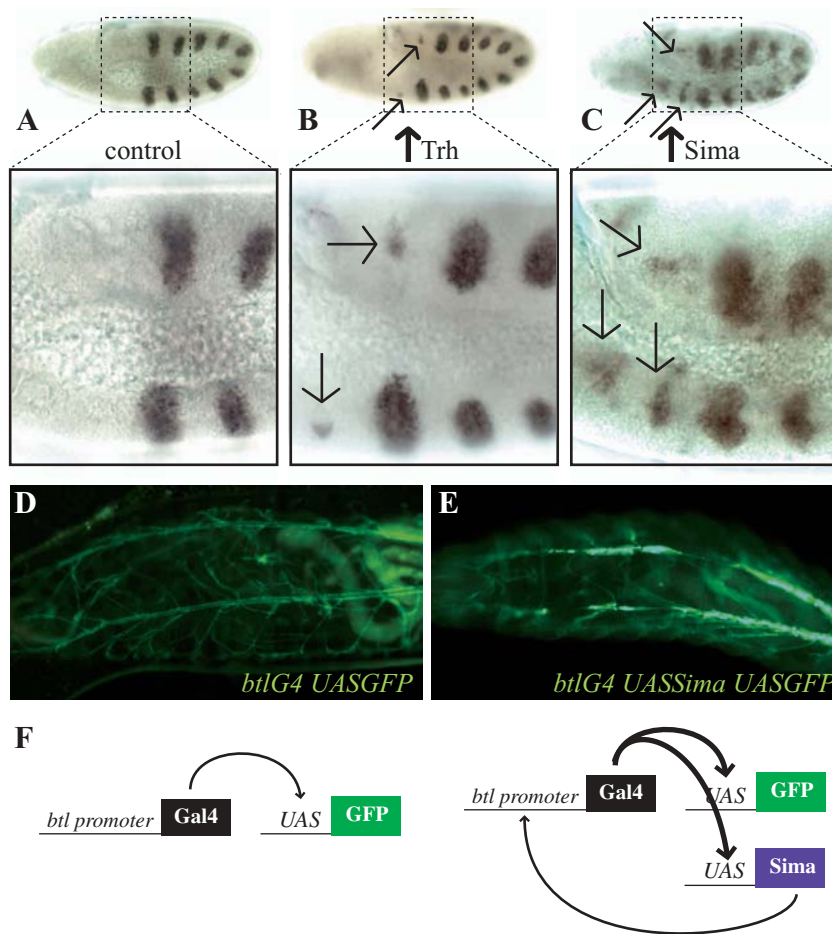


FIGURA 47. *breathless* es un blanco transcripcional de Sima. Embriones expresando *hsGal4* (control), *hsGal4 UASTrh* (↑Trh) ó *hsGal4 UASSima* (↑Sima) fueron recolectados y sometidos a un *heat-shock* a 37C durante 30 minutos y se analizó la expresión de *btl* por hibridación *in situ*. **A.-** embriones control de estadio 10 presentan 10 placas traqueales que expresan *btl*. **B.-** La hiper-expresión de Trh resulta en la aparición de placas traqueales adicionales que expresan *btl* (flechas en paneles superior e inferior) **C.-** La hiper-expresión de Sima también resulta en la expresión de *btl* en tres placas traqueales adicionales (flechas en paneles superior e inferior). **D.-** larvas de primer estadio expresando GFP en las tráqueas bajo el control de un inductor *btlGal4*. **E.-** la co-expresión de Sima en tráqueas resulta en una expresión aumentada del reportero GFP. Los tiempos de exposición en las fotografías de D y E son idénticos –400mseg. **F.-** Los resultados A-E sugieren que Sima induce la transcripción de Gal4 a partir del promotor de *btl*.

3.3 BREATHLESS ES NECESARIO Y SUFICIENTE PARA PRODUCIR LOS FENOTIPOS DE EXTRA-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL

Hasta ahora, mostramos que la hipoxia genera fenotipos traqueales de sobre-ramificaión que correlacionan con un aumento en la actividad transcripcional dentro de las células traqueales y también que el gen *btl*, involucrado en la ramificación traqueal está regulado por hipoxia. Los experimentos que se describen a continuación tienen por objeto analizar si aumentos en los niveles de *btl* son necesarios y suficientes para generar los fenotipos observados en hipoxia.

3.3.1 NIVELES REDUCIDOS DE *BREATHLESS* DISMINUYEN LA SOBRE-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL EN MUTANTES *FATIGA*.

Como se mostró previamente, larvas de 3^{er} estadio mutantes para *fga* mostraban un fenotipo drástico de sobre-ramificación traqueal. Decidimos analizar cuáles eran los efectos de reducir la dosis génica de *breathless* en estos mutantes. Como la falta absoluta de *btl* es letal en estadios embrionarios como consecuencia de que el sistema traqueal no se desarrolla, decidimos reducir sólo una dosis de *btl*. De este modo, comparamos larvas de 3^{er} estadio larval homocigotas para *fga* (*fga⁹/fga¹*) con larvas homocigotas para *fga* que también fueran heterocigotas para la mutación *btl^{H82}* (*fga⁹/fga¹ btl^{H82}*). Observamos que los fenotipos de sobre-ramificación se redujeron considerablemente, aunque sin llegar a la cantidad de ramas terminales de las larvas salvajes (FIGURA 48A-D). Estos experimentos sugieren que *breathless* es un gen requerido para el desarrollo de los fenotipos de sobre-ramificación traqueal observado en los mutantes para *fga*.

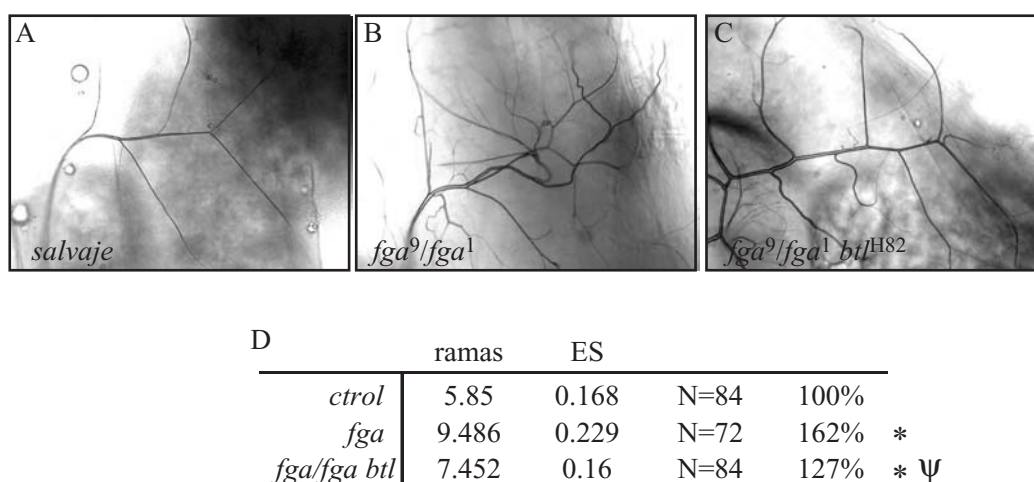


FIGURA 48. Btl contribuye a los fenotipos de sobre-ramificación traqueal observados en los mutantes *fga*. Se analizó el número de ramificaciones traqueales de larvas de 3^{er} estadio de más de 1µm de diámetro. **A-B.-** Larvas mutantes homocigotas *fga* (*fga⁹/fga¹*) presentan más ramificaciones que las larvas salvajes (control). **C.-** Mutantes *fga* que son a su vez heterocigotas para *btl^{H82}* (*fga⁹/fga¹ btl^{H82}*) tienen menos ramas terminales que las mutantes *fga*. **D.-** Cuantificación del número de ramas en las larvas de los genotipos mostrados en A-C. (*) es significativamente distinto del control ($p < 0.001$); y (*Ψ) es significativamente distinto tanto del control como de *fga* ($p < 0.001$).

3.3.2 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE *BREATHLESS* EN TRÁQUEAS PROVOCA LA SOBRE-RAMIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TERMINALES DE LAS TRÁQUEAS.

Los resultados que se mostraron hasta el momento favorecen un modelo en el que Fga y Sima provocan la sobre-ramificación de las células terminales traqueales y por otro lado que Fga y Sima median la inducción transcripcional de *btl* en las tráqueas en respuesta a hipoxia. El experimento clave consistía en expresar dentro de las tráqueas a la proteína Btl y ver si se generaban los mismos fenotipos de sobre-ramificación. Para esto, comparamos el patrón traqueal de larvas que sobre-expresaban Btl en tráqueas (*btlGal4 UASBtl*) con el de larvas control (*btlGal4*). Observamos que las larvas que acumulan Btl en tráqueas presentan más ramificaciones que las larvas control (FIGURA 49), demostrando que la inducción de Btl es suficiente para que se den los fenotipos de sobre-ramificación observados en hipoxia.

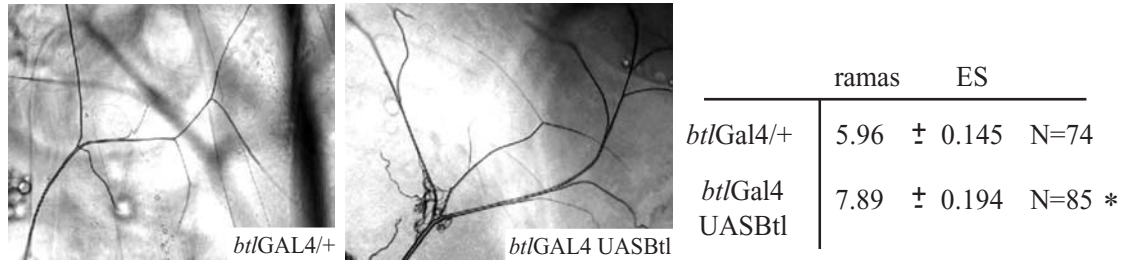


FIGURA 49. La sobre-expresión de Breathless en las células traqueales es suficiente para generar fenotipos de sobre-ramificación traqueal. Larvas de tercer estadio *btlGal4 UASBtl* presentan más ramificaciones terminales que los controles *btlGal4/+*. (*) El número de ramas terminales en ambos genotipos es significativamente diferente ($p < 0.001$).

Al activar exógenamente la vía FGF dentro de las células terminales traqueales, éstas pierden direccionalidad en su migración y producen un gran número de tubos llenos de aire que forman ovillos sobre sí mismos, como se observa cuando se sobre-expresa el el ligando FGF Branchless dentro de las células terminales (FIGURA 50A-B). Esto se debe a que la misma vía FGF controla no sólo la ramificación traqueal (CUÁNTAS ramas exhibirán las células terminales), sino también la migración traqueal (HACIA DÓNDE extenderán estas ramificaciones). La sobre-activación de la vía dentro de las células terminales ocultaría las claves endógenas de dirección dando lugar a la formación de ovillos. Ahora, nuestro modelo supone que los niveles aumentados del receptor FGF están generando de algún modo una sobre-activación de la vía que resulta en la sobre-ramificación traqueal que se reportó en el punto anterior. Entonces, quisimos analizar también la ocurrencia de este tipo de nudos u ovillos traqueales en larvas que sobre-expresen *breathless*. Mientras que la penetrancia de estos ovillos es muy baja en larvas salvajes (2 larvas de 45 presentaron nudos muy poco densos), la frecuencia aumentó drásticamente en larvas que hiper-expresan *breathless* (30 de 43 presentaron múltiples ovillos en las tráqueas) (FIGURA 50C), donde muchos de ellos se enrollaban sobre las mismas células traqueales. Tal como se muestra en la FIGURA 50D-J, estos fenotipos particulares se hicieron evidentes no sólo en las células terminales de la rama dorsal, sino también en células terminales de las ramas viscerales, ganglionares y laterales, demostrando que no es un fenómeno acotado a un único tipo de célula terminal. De este modo, nuestros resultados apoyan un modelo en el que los niveles aumentados del receptor FGF *Breathless* en hipoxia resultan en una sobre-activación de la vía FGF, que causa la sobre-ramificación y migración alterada de las células terminales traqueales. Esta activación podría darse bien por dimerización espontánea del receptor, o bien por una mayor susceptibilidad a los niveles de ligando existentes en la periferia de estas células terminales traqueales.

3.3.3 AUMENTOS EN LOS NIVELES DE BREATHLESS SON TAMBIÉN CAUSALES DE OTROS CAMBIOS MORFOLÓGICOS QUE OCURREN EN LAS TRÁQUEAS EN SITUACIONES DE HIPOXIA.

Las tráqueas responden a descensos en los niveles de Oxígeno aumentando la ramificación de sus células terminales, pero también alterando su morfología (Henry and Harrison, 2004; Jarecki et al., 1999; Wingrove and O’Farrell, 1999). En hipoxia, las distintas ramas traqueales adoptan una forma más serpenteante que en normoxia y esta tortuosidad traqueal es

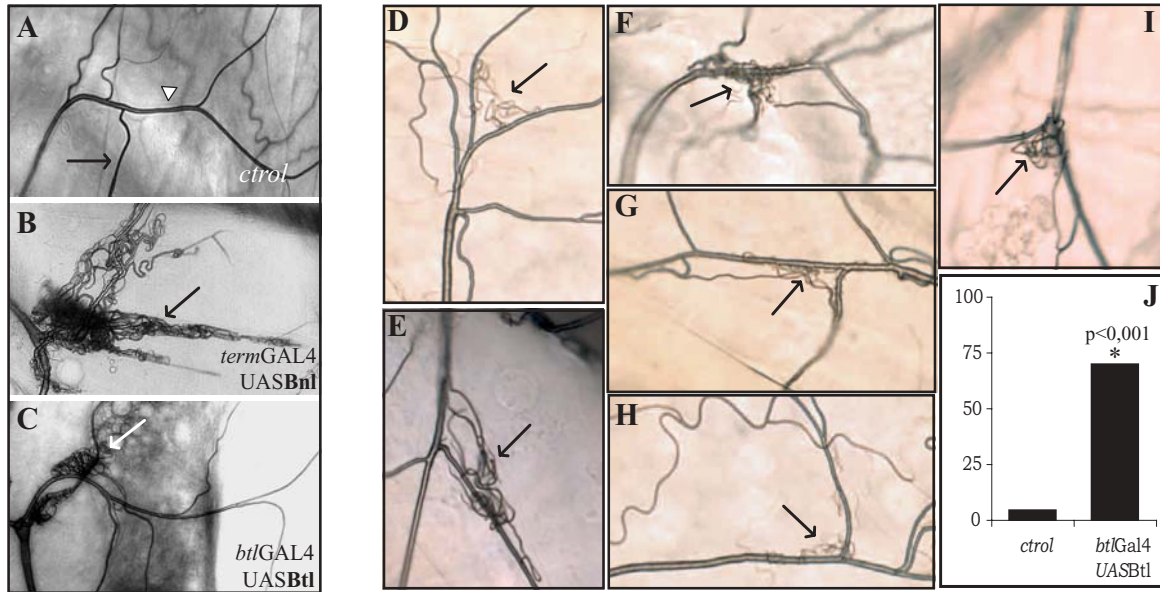


FIGURA 50. Tanto la sobre-expresión de **Breathless** como la sobre-expresión de **Branchless** en las tráqueas genera ovillos de traqueolas en las células terminales. **A.**-célula terminal traqueal *bt1Gal4* (control) presentando su morfología típica de ramificaciones no-superpuestas (flecha) que se alejan de la rama principal (cabeza de flecha). **B.**- la expresión de *Bnl* resulta en un gran acúmulo de traqueolas que se enredan sobre sí mismas (flecha). **C.**- la hiper-expresión de *Btl* causa un efecto similar, aunque los ovillos (flecha) son menos densos que los obtenidos por *Bnl* (comparar con B) pero que no se dan en el control salvaje. **D-I.** Ovillos traqueales que ocurren en células terminales de distintas ramas traqueales de larvas *bt1Gal4 UASSima* (flechas). **J.**- Cuantificación de la incidencia de ovillos traqueales en larvas de tercer estadio salvajes y larvas *bt1Gal4 UASSima*.

particularmente aparente en la rama ganglionar, que es extremadamente recta en larvas crecidas a 21%O₂ FIGURA 51A). Quisimos analizar entonces si los efectos de la caída de la presión parcial de oxígeno sobre la morfología traqueal también dependía de los genes *Fga/Sima/Btl*. Cuando observamos larvas homocigotas de 3^{er} estadio mutantes para *fga*, notamos que en las ramas traqueales laterales se daba el mismo tipo de tortuosidad observado en larvas salvajes expuestas a hipoxia (FIGURA 51ByC). Para analizar la posible participación de *Sima* en este fenotipo, comparamos larvas salvajes y larvas homocigotas para *fga* con larvas doble mutantes *fga sima* y encontramos que el fenotipo de tortuosidad desaparecía, revirtiendo a los valores observados en las larvas control (FIGURA 51D). De este modo, se concluye que la misma vía que gobierna el grado de ramificación que presentan las células terminales, también está regulando otro aspecto de la morfología de las tráqueas. Por último, analizamos si la inducción de *Btl* por *Sima* era responsable de la aparición de tortuosidad en las ramas traqueales y para ello sobre-expresamos *Btl* en tráqueas como se describió más arriba; estas larvas presentaron una tortuosidad idéntica a la observada en los mutantes *fga* (FIGURA 51E). Los resultados presentados indican entonces que la vía de señalización *Fga/Sima/Btl* regularía tanto la tasa de ramificación como la morfología traqueal en respuesta a los niveles de oxígeno disponible.

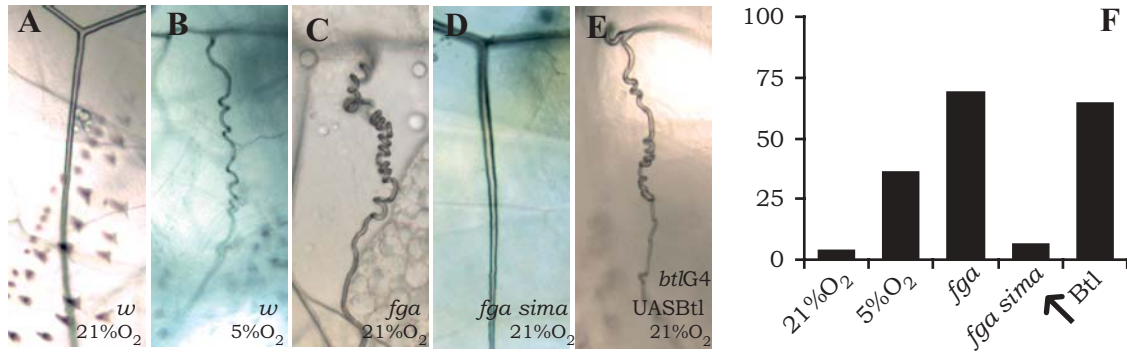


FIGURA 51. La vía O₂/Fga/Sima/Btl altera también otros aspectos de la morfología traqueal. Análisis de la rama ganglionar de larvas de tercer estadio crecidas a distintos niveles de O₂ ó mutantes para genes de sensado y respuesta a hipoxia. **A.-** rama ganglionar de una larva salvaje crecida a 21% O₂. **B.-** rama ganglionar de una larva salvaje crecida a 5% O₂. Nótese la tortuosidad adquirida en comparación con A. **C.-** rama ganglionar de una mutantes *fga*, mostrando una morfología altamente tortuosa. **D.-** la falta de Sima en doble mutantes *fga sima* revierte la morfología tortuosa observada en mutantes *fga*. **E.-** rama ganglionar de una larva de tercer estadio *btlGal4 UASBtl*, se observa que la sobre-expresión de Breathless causa el mismo tipo de tortuosidad. **F.-** porcentajes de larvas con ramas ganglionares toruosas en las distintas condiciones ó contextos genéticos mostrados en A-E.

4.- DISCUSIÓN

En el presente capítulo nos focalizamos en tratar de comprender cuál era el grado de participación de la respuesta transcripcional a hipoxia en los fenotipos reportados por bajas en el nivel de oxígeno sobre el sistema traqueal de *Drosophila*. La individualización y caracterización de *fga* y *sima* reportados en los capítulos previos nos permitían abordar este problema utilizando los mutantes generados en el laboratorio.

4.1 LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA CONTROLAN EL GRADO DE RAMIFICACIÓN TRAQUEAL

4.1.1 MUTANTES *fga* MUESTRAN LOS MISMOS FENOTIPOS QUE LARVAS SALVAJES CRECIDAS EN HIPOXIA.

Se había reportado ya que cuando las larvas eran crecidas en hipoxia presentaban un mayor grado de ramificación en las células terminales de las tráqueas pero no se sabía si los fenotipos se debían a la activación de la respuesta transcripcional a hipoxia. Lo primero que concluimos al analizar la morfología traqueal en los mutantes *fga*, *sima* y los doble mutantes *fga sima*, fue que ambos genes participan en el proceso de ramificación traqueal. Los mutantes *fga* presentaron una sobre-ramificación traqueal similar a la que mostraban las larvas crecidas en hipoxia; de este modo, no era relevante que hubiera oxígeno disponible si no estaba el Sensor que diera cuenta de esa realidad. El siguiente paso fue estudiar si la falta de Sima revertía el fenotipo de sobre-ramificación de los mutantes *fga*; o sea, hasta que punto la desregulación de Sima era la causa de los fenotipos de sobre-ramificación por falta del Sensor. El análisis de los doble mutantes *fga sima* reveló que ocurría una reversión completa – las tráqueas de los doble mutantes resultaron casi idénticas a las de las larvas salvajes-, demostrando que la acumulación de Sima era la causa de los fenotipos de los mutantes *fga*; no importaba no tener Sensor de O₂ siempre que faltara la proteína efectora que este Sensor regulaba.

4.1.2 *bnl* NO ES UN BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA.

La participación de la vía Fga/Sima en el proceso de ramificación traqueal sugería fuertemente que debería haber al menos un blanco transcripcional de Sima que mediara estos efectos observados, de modo que buscamos posibles candidatos entre los genes de probada participación en el proceso de ramificación traqueal. Branchless –el homólogo de FGF- resultó un candidato obvio, puesto que reunía todas las características que buscábamos: era un gen que controlaba cuánto se ramifican las células terminales, se había demostrado que los niveles proteicos de Bnl aumentaban en respuesta a hipoxia y su análogo en vertebrados, VEGF, es inducible transcripcionalmente por HIF- α (Jarecki et al., 1999; Shweiki et al., 1992; Sutherland et al., 1996). Los experimentos que llevamos a cabo en el laboratorio para evidenciar la supuesta regulación transcripcional de *bnl* por parte de Sima arrojaron resultados claramente negativos. No fuimos capaces de detectar niveles de *bnl* aumentados en larvas colocadas en hipoxia, ni en embriones que expresaban Sima en distintos patrones. El resultado decisivo fue que no

detectamos FUNCIONALMENTE la actividad quimio-atractiva de Bnl en células donde se expresaba ectópicamente Sima. Estos resultados nos llevaron a contemplar blancos transcripcionales de Sima alternativos, de los que al momento se conocían en la mosca sólo unos pocos -los únicos blancos reportados eran *fga*, en esta Tesis y en Lavista-Llanos et al (2002), *ldh* (Gorr et al., 2004) y *scylla* (Reiling and Hafen, 2004).

4.2 LAS CÉLULAS TERMINALES TRAQUEALES SON PARTICULARMENTE SENSIBLES A HIPOXIA

4.2.1 ANÁLISIS *IN VIVO* DE LA RESPUESTA TRASCRIPCIONAL A HIPOXIA.

El reportero transcripcional de hipoxia *2xldhGal4* se expresaba en tráqueas con mayor sensibilidad que en ningún otro tejido cuando las moscas eran colocadas a 5% O₂, lo que indicaba que potencialmente podría existir la inducción en hipoxia de algún gen endógeno dentro de ese tejido. Cuando analizamos más finamente el patrón de expresión del reportero *2xldhGal4*, observamos que la respuesta transcripcional dentro del sistema traqueal no es homogénea, y que no todas las células traqueales responden a la misma concentración de oxígeno. Dentro de las células traqueales, las terminales son las que responden con mayor sensibilidad puesto que son las únicas que expresan el reportero en normoxia. Este encendido del reportero en las células terminales dependía efectivamente de la disponibilidad de oxígeno, puesto que si las larvas eran crecidas en hiperoxia (60% O₂) o en ausencia de Sima la expresión desaparecía.

Los motivos de la sensibilidad particular que presenta la expresión del reportero en las células terminales traqueales no están del todo claros. Bien vale especular que puede ocurrir un fenómeno como el propuesto para las células endoteliales del sistema vascular de mamíferos donde al ser estas células muy activas en procesos demandantes de energía, son las que primero perciben la falta de oxígeno y por ende, son las que primero disparan respuestas transcripcionales tendientes a compensar energéticamente esa falta. Pero también era atractivo especular que la mayor sensibilidad de las células terminales tenía que ver con la naturaleza funcional de esas células, esto es, con la capacidad de ramificarse que es un atributo único de este tipo celular. Ya habíamos definido que los genes de sensado y respuesta a hipoxia controlaban los procesos de ramificación, y ahora encontrábamos que las únicas células capaces de ramificarse mostraban especial sensibilidad a la activación de la respuesta transcripcional a hipoxia... ¿estaban entonces estos dos fenómenos relacionados? ¿el encendido de la vía Fga/Sima en las células terminales nos indicaba que los EFECTORES de la respuesta de sobre-ramificación en hipoxia se encontraban DENTRO DE LAS TRÁQUEAS?

4.2.2 CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS POR CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DENTRO DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES.

Como se mencionaba en la introducción, en vertebrados también se comenzó a estudiar la relevancia de la respuesta a hipoxia dentro del sistema vascular, esto es, qué tan necesario era HIF dentro de las células endoteliales que formaban los vasos sanguíneos. Se sabía que la activación de la vía HIF en tejidos periféricos resultaba en la formación de nuevos vasos que se

dirigían hacia el sitio donde HIF induce la expresión de VEGF, pero no estaba claro si las células endoteliales funcionaban sólo respondiendo a la señal externa de VEGF o si se debería producir algún cambio en su perfil de expresión génica dependiente de HIF-1 α que permita y fomente la migración. Un reporte reciente del grupo de Randall Johnson arroja resultados sorprendentes: es NECESARIA una respuesta transcripcional mediada por HIF DENTRO DEL SISTEMA VASCULAR para las células endoteliales respondan a factores angiogénicos externos (Tang et al., 2004). Llegan a esta conclusión mediante el estudio de ratones *KO* condicionales, en los que HIF-1 α es removido únicamente de las células endoteliales del sistema vascular. Se sabía que la administración subcutánea de HIF o VEGF embebidos en *bolitas de matrigel* resultaba en la generación de nuevos vasos sanguíneos que se dirigían hacia estas bolitas y las rodeaban en pocos días. Cuando realizaron el mismo experimento pero utilizando los ratones *KO* condicionales para HIF-1 α en células endoteliales, notaron que esta respuesta estaba muy reducida, evidenciando de este modo la importancia de HIF dentro del sistema vascular. Se ponía por lo tanto en evidencia que la respuesta transcripcional a hipoxia era no sólo necesaria en el tejido periférico que sensaba la falta de oxígeno, sino que también era relevante desde el tejido que migra -el tejido QUE RESPONDE- llevando el oxígeno hacia los tejidos.

4.3 *breathless* COMO BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA RESPONSABLE DE LOS FENOTIPOS DE SOBRE-RAMIFICACIÓN TRAQUEAL

4.3.1 *btl* ES UN BLANCO TRANSCRIPCIONAL DE SIMA.

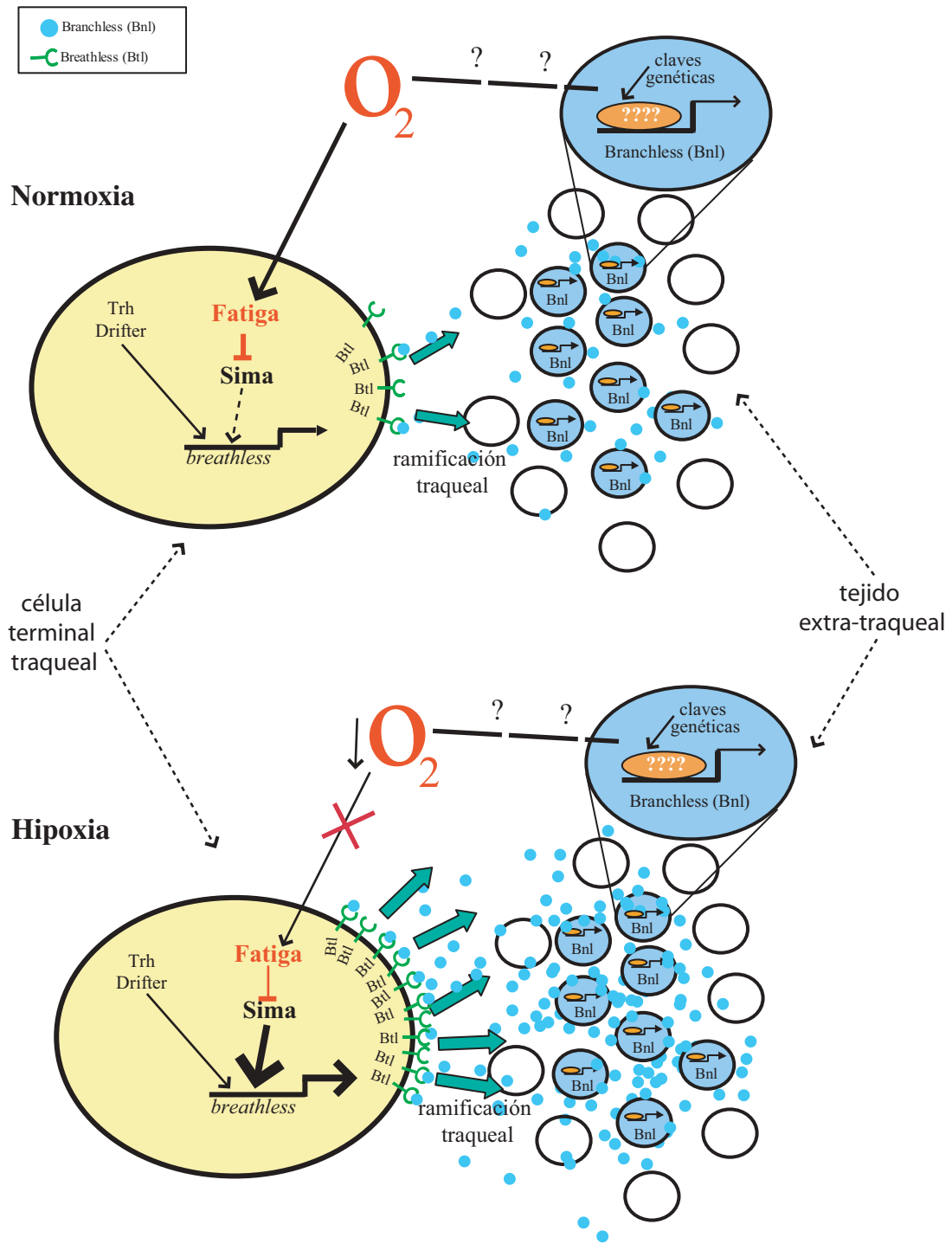
Mediante la utilización de líneas reporteras para el gen *btl*, fuimos capaces de identificar a este gen como un blanco transcripcional de Sima y determinar que es un gen inducible por hipoxia. Los experimentos analizando la inducción de dominios ectópicos de expresión de *btl* en embriones confirmaron que Sima fue capaz de inducir a *btl* en los mismos lugares en los que *Trachealess* lo hace: en tres grupos adicionales de células que coinciden con los que expresan a *Drifter*, un segundo Factor de Transcripción necesario para la expresión de genes traqueales. Esto hacía pensar que los mecanismos por los cuales *Trh* y *Sima* inducían la expresión de *btl* podían ser similares. Experimentos adicionales revelaron que *Sima* no puede inducir a *btl* en un patrón correspondiente al gen *engrailed*, por ejemplo, ya que no se superpone con la expresión de *Drifter*. *Trachealess* y *Sima* son proteínas muy similares; de hecho, el nombre completo de *Sima* es *Similar*, y así la bautizaron por su parecido a *Trh* (Nambu et al., 1996). Esto nos llevó a pensar que ambos Factores de Transcripción podrían estar funcionando sobre los mismos *enhancers* del gen *btl*, pero en el contexto de esta Tesis no se han realizado experimentos que prueben esa hipótesis de manera concluyente. Sin contar con evidencias directas de que *btl* es un blanco transcripcional de *Sima* es posible especular que quizás la inducción de *Sima* sobre *btl* ocurre a través de una inducción de *Trh* por parte de *Sima* y que luego la inducción de *Trh* resulte en la expresión de *Btl*. Ciertos resultados obtenidos, sin embargo, nos llevan a pensar que este no es el caso: **1.-** embriones que hiper-expresaban *Sima* y resultaban en la expresión ectópica de *btl*

en grupos adicionales de células fueron también sometidos a hibridaciones *in situ* para revelar la inducción de *trh* y en ningún caso detectamos la acumulación de *trh* en las células adicionales que expresaban *btl*. Sospechamos por lo tanto que *trh* no es un mediador de la inducción de *btl* por Sima. **2.-** cuando expresamos a Trh en tráqueas de larvas para analizar la expresión del reportero GFP de *btl*, la inducción del reportero fue muy débil en comparación con la inducción lograda luego de sobre-expresar Sima. Trh por lo tanto no es un efector capaz de generar los efectos que se observaron tras de la hiper-expresión de Sima. De este modo, aún cuando no podemos concluirlo con certeza, nuestros resultados sugieren fuertemente que Sima funciona directamente sobre sitios HRE presentes en el promotor de *btl*.

4.3.2 REGULACIÓN DE LA RAMIFICACIÓN TRAQUEAL POR LA INDUCCIÓN DE BTL.

Nuestros resultados demuestran que *btl* es un gen inducible por hipoxia y por Sima, y que su sola hiper-expresión en tráqueas es suficiente para generar los fenotipos de sobre-ramificación que se observan en hipoxia. Btl es un receptor del tipo FGF-R que pertenece a la familia de receptores tipo tirosina kinasa (RTKs). Estos receptores están presentes en la membrana citoplasmática como monómeros que homo-dimerizan en respuesta a la presencia del ligando correspondiente. La dimerización permite que cada una de las moléculas del receptor fosforile recíprocamente a residuos de tirosina presentes en la otra molécula, dando el paso inicial para la activación de la cascada intracelular río abajo de los RTKs. Se ha propuesto que un aumento en los niveles de moléculas de receptor presentes en la membrana puede resultar en una activación de la vía por homo-dimerización espontánea, donde dos moléculas RTK podrían trans-fosforilarse y disparar la señalización sin presencia de ligando (Ostman and Bohmer, 2001; Weiss et al., 1997). Los efectos de la inducción de Btl sobre la ramificación de las células terminales traqueales pueden entonces analizarse desde ese escenario posible, donde la acumulación de *btl* en respuesta a hipoxia resultaría en receptores espontáneamente dimerizados debido a su alta concentración en la membrana. En este sentido, un reporte reciente demuestra que la acumulación de Breathless en la membrana plasmática resulta en la activación de la vía de señalización intracelular, evidenciada por los altos niveles de dpERK (Dammai et al., 2003). Y más interesante aún, cuando los autores expresaron *btl* en células en cultivo observan que éstas responden emitiendo procesos del tipo filopodios, demostrando que la modificación de los niveles de este receptor puede resultar en un mayor número de procesos citoplasmáticos de ramificación.

Para el caso puntual del análisis de la ramificación traqueal en los individuos en los que hiper-expresábamos Btl, no debe olvidarse que los experimentos se hacían en un contexto genético donde el ligando Bnl se expresaba normalmente. De este modo, se podría también pensar que aún si la acumulación del receptor no resultara en una dimerización espontánea, bien podría generar una sensibilidad mayor niveles constantes de Bnl (ver Modelo Capítulo 3).



MODELO 3. La vía Fatiga/Sima controla la ramificación traqueal mediante la inducción de Breathless, el FGF-R de *Drosophila* dentro de las células traqueales. El patrón de ramificaciones que presentan las células terminales del sistema traqueal de *Drosophila* depende de la expresión extra-traqueal del ligando FGF Branchless y de la expresión del receptor FGF Breathless dentro de las células traqueales. En condiciones de hipoxia, Sima induce un aumento de la expresión del receptor Breathless principalmente en las células terminales de las tráqueas, provocando un aumento en el número de ramificaciones traqueales. Los niveles del ligando Bnl también se inducen en hipoxia, aunque los mecanismos moleculares que provocan esta inducción no se conocen aún.

4.3.3 LA ACUMULACIÓN DE SIMA PROVOCA LA FORMACIÓN DE FILOPODIOS FUERA DE LA TRÁQUEAS DE UN MODO AUTÓNOMO DE CÉLULA.

Cuando hiper-expresamos la proteína Sima en células de la epidermis en larvas de tercer estadio observamos la formación de un gran número de extensiones citoplasmáticas tipo filopodios. Los filopodios emergían desde las células que expresaban Sima y se extendían a varios cuerpos celulares de distancia. Curiosamente, la formación de filopodios ha sido propuesta como un paso previo en la formación de las traqueolas en las células terminales traqueales (Ribeiro et al., 2002); de este modo, las células terminales traqueales forman primero filopodios, los cuales eventualmente se estabilizan dando origen a procesos citoplasmáticos que luego forman el lumen traqueal. La formación de filopodios por sobre-expresión de Sima en células de la epidermis indica que la capacidad de Sima de inducir filopodios no está restringida a un tipo celular particular. Más interesante aún, Dammai y colaboradores (2003) reportaron que la acumulación de Breathless en células S2 (células embrionarias de *Drosophila*) en cultivo resultaba en la formación de procesos citoplasmáticos tipo filopodios (Dammai et al., 2003), similares a los que nosotros observamos en larvas luego de sobre-expresar Sima en el ectodermo. Esto apoya la noción de que los mismos genes que en células traqueales promueven la formación de nuevas traqueolas de un modo autónomo de célula pueden favorecer la formación de filopodios en células no-traqueales, esto es, células que no tienen la capacidad adicional de formar tubos.

4.4 LA VÍA FGA/SIMA Y SU INTERACCIÓN CON LOS SISTEMAS DE REPARTO DE OXÍGENO EN MAMÍFEROS E INSECTOS.

En este capítulo se ha reportado que el desarrollo del sistema traqueal de *Drosophila* es modulado por Fga y Sima, los genes involucrados en la respuesta a hipoxia. Sabemos además que la angiogénesis en mamíferos es también un proceso que está regulado por hipoxia, donde niveles reducidos de oxígeno promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la vía PHD/HIF. De este modo genes homólogos, PHD-Fga y HIF-Sima, modulan sistemas análogos, el sistema vascular de mamíferos y el sistema traqueal de insectos, en especies tan distantes evolutivamente como el hombre y la mosca. Es curioso, sin embargo, que la existencia del sistema PHD/HIF se reportó también en *C. elegans*, un gusano helminto que no tiene sistema respiratorio ni circulatorio y que obtiene el oxígeno por difusión simple desde el exterior. Esto sugiere que la vía de respuesta transcripcional a hipoxia PHD/HIF existía ya antes de la aparición de sistemas de reparto de oxígeno especializados. Es posible especular entonces que el antecesor común de todos los animales bilaterales (el primer antecesor común de *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*) tuviera ya los componentes básicos de la vía de respuesta a hipoxia, PHD y HIF, pero no un sistema de distribución de oxígeno eficiente.

La aparición independiente de sistemas análogos en *phyla* distantes ha ocurrido repetidamente a lo largo de la evolución (Kozmik, 2005; Panganiban et al., 1997). Se postula por ejemplo que el antecesor común de los animales bilaterales no presentaba ojos y carecía de apéndices. Algunos animales actuales como los nematodos aún mantienen esas características, mientras que en vertebrados y en artrópodos aparecieron de un modo independiente, tanto un

sistema visual especializado (ojos) como extremidades para la locomoción (patas). Asombrosamente, las moléculas clave y las vías de señalización involucradas en la formación de los ojos -Pax 6 (Kozmik, 2005; Arendt and Wittbrodt, 2001)- y de los apéndices -genes Hox y Dll (Panganiban et al., 1997; Shubin et al., 1997)- son las mismas para artrópodos y para vertebrados. A partir de estas observaciones se plantea una de las preguntas fundamentales en los estudios evolutivos: ¿de qué modo una misma vía de señalización o una misma molécula se seleccionan independientemente en dos organismos evolutivamente distantes para cumplir una función o desarrollar una estructura análoga? Precisamente este enigma se plantea ante el origen de los mecanismos responsables del desarrollo del sistema traqueal de los insectos y el sistema vascular de los vertebrados. A partir de un supuesto antecesor común donde el oxígeno se tomaba del medio ambiente por difusión simple, habrían surgido independientemente dentro de los deuterostomados (a los que pertenecen los vertebrados) y de los protostomados (a los que pertenecen los insectos) sistemas eficientes de reparto de oxígeno que posibilitaron la aparición de patrones corporales más complejos y energéticamente más demandantes. Lo que resulta particularmente llamativo, a la luz de los resultados expuestos en este Capítulo, es que en ambos casos una vía pre-existente de sensado de oxígeno se habría co-optado como modulador tanto de la angiogénesis de los vertebrados como de la ramificación traqueal de los insectos. La utilización de la misma maquinaria de sensado de oxígeno, a través de PDH/HIF y Fga/Sima, para modular sistemas análogos en *phyla* tan distantes evolutivamente nos lleva a proponer que la plasticidad de los sistemas de reparto de oxígeno en función de las condiciones ambientales constituye una ventaja adaptativa relevante, que ha llevado a que la evolución la co-opte dos veces independientemente.

5.- CONCLUSIÓN

El primer tejido en responder transcripcionalmente a hipoxia en *Drosophila* es el traqueal y, dentro de éste, las células terminales son las más sensibles. Estas células en particular son las únicas capaces de ramificarse dando origen a finos procesos que llevarán oxígeno a las distintas regiones del organismo. La cantidad de ramificaciones que las células terminales exhiben son función de la concentración de oxígeno disponible y la vía Fga-Sima media este fenómeno. Demostramos aquí que Sima juega un rol importante controlando la expresión génica dentro de las tráqueas y que uno de sus blancos transcripcionales, *btl*, es suficiente para generar fenotipos de sobre-ramificación traqueal. El modelo entonces propone la regulación por hipoxia del receptor FGF Breathless, que promueve la formación de más ramas que potencialmente aumenten el área cubierta por el sistema repartidor de oxígeno, de modo de acercar este recurso comprometido a más células del organismo.

ANEXOS

ANEXO 1: GENERACIÓN DE MOSCAS TRANSGÉNICAS.

Los estudios de GANANCIA DE FUNCIÓN en *Drosophila* fueron posibles gracias a con la aparición de un método para transformar la línea germinal de moscas salvajes y generar líneas trasngénicas. A principios de los 80's, Allan Spradling y Gerald Rubin publicaron la modificación molecular de un transposón, el elemento P, como herramienta para transformar embriones de moscas y sarlos como vehículos para introducir genes de interés (Rubin y Spradling, 1982; Spradling y Rubin, 1982). Los transposones son ELEMENTOS MÓVILES de DNA, y su movilización depende de secuencias flanqueantes IR, (por *inverted repeats*) que permiten la transposición desde su sitio de inserción original a un sitio de integración en otra parte del genoma. Las secuencias IR son reconocidas por una enzima expresada en el mismo trasposón llamada Transposasa: los transposones salvajes poseen IRs flanqueando el gen de la Transposasa de modo tal que pueden saltar indefinidamente dentro del genoma de la célula en la que se encuentran. Rubin y Spradling modificaron los elementos P, quitando la Transposasa para convertirlos en elementos no-móviles. Los elementos P codifican marcadores dominantes visibles en el estadio adulto (típicamente el gen *white*) que permiten reconocer de un modo sencillo las inserciones exitosas, e identificar de este modo a las líneas transgénicas. La integración del transposón al genoma de la mosca se logra coinyectando en la línea germinal de moscas salvajes un plásmido que expresa la Transposasa, de modo tal que esta enzima puede actuar en *trans* sobre los IR del elemento P y promover su integración en sitios al azar dentro del genoma. El plásmido que codifica la la Transposasa se diluye luego de la inyección conforme se suceden las divisiones celulares en el desarrollo embrionario, por lo que el elemento P, en caso de haberse integrado al genoma de la mosca, no puede escindir de ese lugar.

Los transposones no sólo sirven para expresar genes exógenos en líneas trasgénicas sino que además tuvieron otras aplicaciones de gran utilidad. Entre ellos se encuentran los llamados *enhancer traps*, elementos-P que codifican el gen *lacZ* de *E.coli* río abajo de un promotor mínimo que no permite la transcripción de ese gen a menos que el transposón se integre en una posición cercana a un *enhancer* endógeno. La expresión de β -Gal (producto del gen *lacZ*) revela entonces el patrón de expresión del gen cercano al sitio de inserción. Este tipo de elementos P, los *enhancer traps*, fueron utilizados en este Tesis para evidenciar la inducción del gen *btl* por hipoxia y por la sobre-expesión de Sima (ver figura 45).

Rubin GM, Spradling AC (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218: 348-53.
Spradling AC, Rubin GM (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-7.

ANEXO 2: SISTEMA GAL4/UAS Y EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES.

A principios de los 90's Andrea Brand y Norbert Perrimon reportaron lo que sería la puerta de entrada a los estudios sistemáticos de ganancia de función en *Drosophila* (Brand y Perrimon, 1993). La estrategia molecular consistía esta vez en la utilización del factor de transcripción de levaduras, GAL4, clonado bajo el control de un promotor **Z** y transformado luego en embriones para generar líneas transgénicas. En *Drosophila* no existen blancos transcripcionales de GAL4, ya que este factor de transcripción reconoce secuencias UAS (por upstream activating sequence) sólo presentes en la levadura. El método de sobre-expresión de genes en *Drosophila* involucra por lo tanto la generación de una segunda línea transgénica conteniendo un gen **X** clonado bajo el control transcripcional de secuencias UAS, de modo que al cruzar la línea *promotorzGal4* por la línea *UASgenX* se logra una progenie de individuos en los que el gen **X** se expresa bajo el control del promotor **Z** (FIGURA ANEXO 1). El sistema parece a primera vista un tanto redundante en esfuerzos: ¿por qué no hacer una única línea transgénica expresando el gen **X** bajo el promotor **Z**? La realidad es que el sistema AHORRA ESFUERZOS, ya que una única línea UAS puede ser cruzada con muchas líneas que expresan Gal4 en distintos patrones, y del mismo modo, una única línea GAL4 puede ser cruzada por distintas líneas UAS controlando entonces la expresión de genes diferentes. La mayoría de las líneas Gal4 y UAS generadas durante este último decenio están disponibles para toda la comunidad científica, de modo tal que la cantidad de líneas transgénicas que uno mismo debe generar es reducida. Como ejemplo, diversos aspectos de la biología de un hipotético gen de interés **Y** pueden ser estudiados generando en el laboratorio únicamente dos líneas transgénicas (una con el promotor del gen **Y** dirigiendo la expresión de Gal4 -*promotoryGal4*-, y otra con la secuencia codificante del gen **Y** controlada por el promotor UAS -*UASgenY*). A continuación se dan algunos ejemplos del tipo de experimentos que pueden ser llevados a cabo utilizando solamente estas dos líneas transgénicas (*promotoryGal4* y *UASgenY*) en combinación con líneas transgénicas disponibles en bancos de stocks: **a)** conocer el patrón de expresión del gen **Y** *in vivo* a lo largo de la vida de la mosca (*promotoryGal4* x *UASGFP* -LÍNEA DISPONIBLE), **b)** matar las células que expresan **Y** para analizar su relevancia en determinado proceso de interés (*promotoryGal4* x *UASreaper* -LÍNEA DISPONIBLE), **c)** forzar la sobrevida de todas las células que alguna vez expresaron **Y** y que fueron eliminadas por apoptosis (*promotoryGal4* x *UASp35* -LÍNEA DISPONIBLE), **d)** hacer que las células que expresan **Y** sean más grandes (*promotoryGal4* x *UASmyc* -LÍNEA DISPONIBLE), **e)** generar más células que expresan **Y** (*promotoryGal4* x *CycD* -LÍNEA DISPONIBLE), **f)g)h)i)j)k)l)m)n)o)** expresar el gen **Y** en ojo, ala, tráqueas, células de fusión traqueales, células terminales traqueales, cerebro, glándulas salivales, ectodermo, células foliculares del ovario, línea media ventral (*UASgenY* x *eyGAL4*, *enGAL4*, *btlGAL4*, *esgGAL4*, *dsrfGAL4*, *elavGAL4*, *fkhGAL4*, *69BGAL4*, *e22CGAL4*, *simGAL4* -TODAS DISPONIBLES).

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

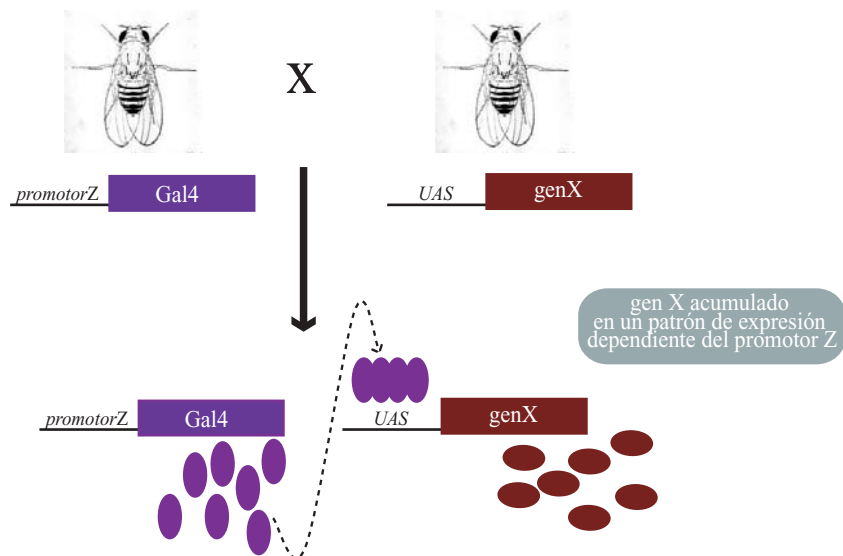


FIGURA ANEXO 2. El sistema Gal4/UAS permite estudios de ganancia de función génica. Las líneas progenitoras *promotorZGal4* y *UASgenX* se mantienen como líneas independientes, de modo que no están afectadas por posibles consecuencias negativas de la expresión de X. Cuando las moscas son cruzadas, la progenie resultante tendrá ambos elementos y se dará la expresión de X sólo donde Gal4 se haya acumulado por la acción del promotor Z.

ANEXO 3: CROMOSOMAS BALANCEADORES

Drosophila posee cuatro pares de cromosomas, de los cuales tres son autosomas (cromosomas II, III, IV) y el restante es el par sexual X/Y (cromosoma I). La gran mayoría de los casi 14.000 genes predichos en el genoma de la mosca se encuentran distribuidos en los cromosomas I, II y III -el cromosoma IV par es muy chico y tiene determinadas propiedades diferenciales que no se analizarán en esta introducción.

Durante la era pre-molecular -que duró hasta entrados los años 80's-, *Drosophila* se utilizó principalmente para estudios de PÉRDIDA DE FUNCIÓN. Se contaba con una cierta cantidad de mutantes espontáneos y con gran cantidad de mutantes generados mediante la utilización, tanto de rayos X (causa aberraciones cromosómicas), como del mutágeno químico EMS (Etil-Metil-Sulfonato, que causa mutaciones puntuales cuya frecuencia se regula con la dosis utilizada). Durante esta época, la herramienta fundamental que hizo de *Drosophila* el modelo genético por excelencia, fue la construcción de cromosomas balanceadores que permitían mantener las miles de mutantes generadas en stocks que no necesitaban mayor dedicación. La limitante histórica para el mantenimiento de un gran número de stocks letales recesivos fue- y sigue siendo para otros modelos animales- el tiempo invertido generación tras generación en identificar los individuos mutantes heterocigotas, diferenciándolos de los individuos con genotipo salvaje. De no eliminarse de la población a los individuos salvajes en cada generación, la mutación de interés se pierde rápidamente al cabo de unas pocas generaciones (FIGURA ANEXO 3A). Los cromosomas balanceadores que surgen como una solución a este problema presentan tres características fundamentales: **1.-** Tienen múltiples rearrreglos cromosómicos -inversiones, básicamente- que IMPIDEN la recombinación con el cromosoma que porta la mutación. De este modo, el balanceador y la mutación siempre segregan a gametas distintas. **2.-** el número de rearrreglos cromosómicos que los cromosomas balanceadores albergan hace que sean LETALES EN HOMOCIGOCIS, de modo que no puede existir una mosca adulta que sea homocigota para el cromosoma balanceador. **3.-** poseen siempre alguna MUTACIÓN FENOTÍPICA DOMINANTE particular y fácilmente reconocible -alas dobladas, pelos cortos, ojos pequeños- de modo tal que al observar una mosca adulta, uno puede inmediatamente saber si dicha mosca porta o no un cromosoma balanceador determinado.

Entonces, si una mutación letal recesiva está ahora "balanceada" (el cromosoma homólogo al que se encuentra la mutación es un cromosoma balanceador), la única progenie resultante al cruzar moscas de esta línea por sí mismas serán moscas heterocigotas, genéticamente idénticas a las progenitoras (FIGURA ANEXO 3B); las moscas homocigotas para el cromosoma balanceador serán letales en estadios tempranos (por la propiedad 2 de los cromosomas balanceadores descrita en el párrafo previo) y las homocigotas para la mutación serán letales en algún estadio del desarrollo. Esto permite entonces que las líneas mutantes letales puedan ser mantenidas por un gran número de generaciones sin mayor esfuerzo.

Posteriormente, aparecieron cromosomas balanceadores de segunda generación, que tenían, aparte de un MARCADOR FENOTÍPICO observable en adultos, un MARCADOR MOLECULAR -LacZ ó GFP- observable en embriones y/o estadios larvales, haciendo posible entonces identificar embriones y larvas homocigotas para la mutación de interés -aquellas que no expresan lacZ ó GFP.

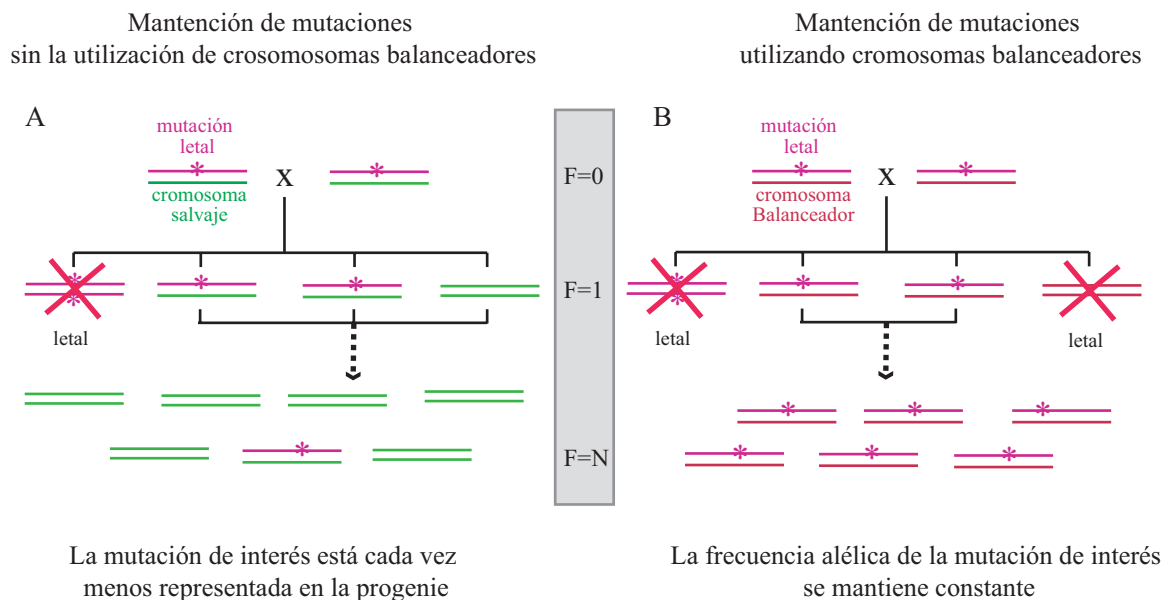


FIGURA ANEXO 3. Cromosomas Balanceadores permiten el mantenimiento automático de *stocks* mutantes letales. A.- Una mutación letal No Balanceada se diluye en la progenie en pocas generaciones debido a la pérdida por letalidad de los individuos homocigotas por la mutación. B.- La única progenie viable de una mutación letal balanceada por sí misma es de genotipo idéntico a sus progenitores, de modo que la línea se mantiene indefinidamente.

ANEXO 4: EXPRESIÓN ECTÓPICA DE GENES DE INTERÉS EN CÉLULAS AISLADAS AL AZAR - TÉCNICA DEL FLIP-OUT

Con el antecedente del sistema Gal4 UAS funcionando en moscas, nuevas proteínas de levaduras fueron probadas en *Drosophila* como posibles herramientas para el control de la expresión génica. Tal fue el caso de la Flipasa FLP (Golic and Lindquist, 1989), una recombinasa de levaduras que reconoce sitios FRT en el genoma de *S. cerevisiae* y que también en *Drosophila* resultó funcional sobre los mismo sitios FRT colocados artificialmente en el genoma de la mosca. La técnica de *flip-out* se vale de una serie de construcciones que mediante cruzamientos genéticos se colocan en una misma mosca. La primera construcción es un transgén en el que la Flipasa se expresa bajo el control de un promotor inducible *hsp70* (*hsFLP*, construcción **1**). La segunda construcción consiste en el gen Gal4 controlado por un promotor constitutivo, pero donde entre el promotor y el Gal4 existe un *cassette* que contiene un gen reportero –CD2 o *white*, típicamente y sucesivos codones de stop; el casete completo está flanqueado por sitios FRT (*actina-FRT-reportero-stop-stop-FRT-Gal4*, construcción **2**) (FIGURA ANEXO **4**). Una mosca que contenga ambas construcciones **1** y **2** no expresará Gal4 en ningún tejido, debido a la presencia del *cassette* FRT-reportero-stop-stop-FRT (FIGURA ANEXO **4A**). Ahora, si esta mosca recibe un golpe de calor (*heat shock*), la FLP se expresará en unas pocas células al azar y actuará sobre los FRT que flanquean el *cassette* conteniendo los codones de stop, promoviendo la eliminación de dicho *cassette*, permitiendo de este modo la transcripción de Gal4 en las células al azar donde se expresó FLP (FIGURA ANEXO **4B**). La cantidad de células en las que se exprese FLP dependerá enteramente de la temperatura del *heat shock* y de la duración del mismo. Ahora sí, el Gal4 liberado de su silenciamiento podrá funcionar sobre una transgén que se haya clonado río abajo de un promotor UAS, del mismo modo que se describió en el anexo previo (sistema Gal4 UAS). Mediante esta estrategia se logra sobre-expresar el gen de interés en células al azar dentro del cuerpo de la larva. En síntesis, la estrategia consiste en cruzar una mosca de genotipo **hsFLP**, **actinaFRTCD2FRTGal4** (que se obtiene gratuitamente de bancos de stocks) por una línea **UAS-gen-de-interés** y tratar a la progenie resultante con *heat shocks* de duración y temperatura a elección.

Golic, K. G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509.

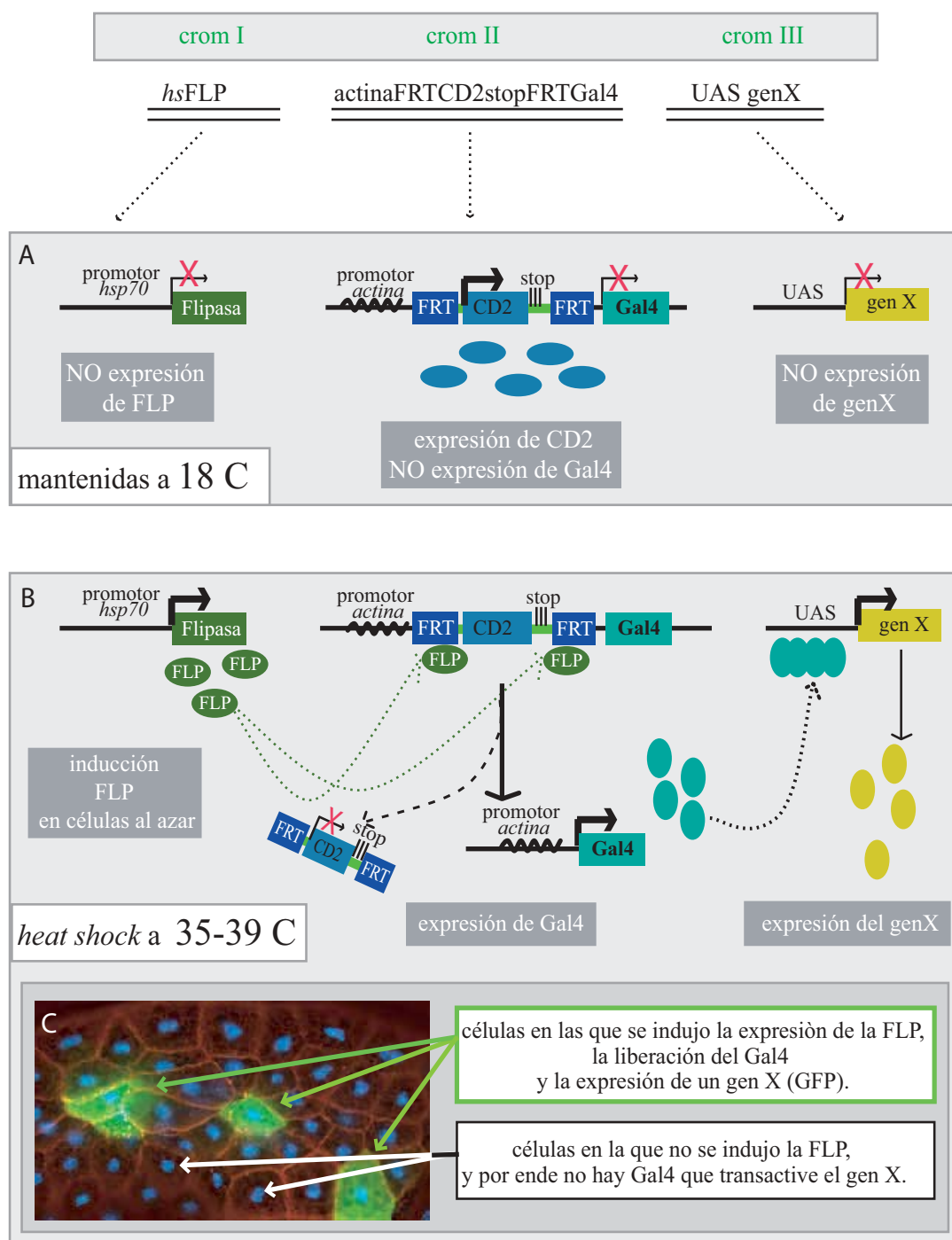


FIGURA ANEXO 4. El sistema FLP-OUT permite la hiper-expresión de un gen determinado en células al azar. Heat shocks de temperatura y duración variable sobre moscas *hsFLP*, *actinaFRTCD2FRTGal4*, *UASGenX* permiten la expresión al azar de la FLP y la consiguiente expresión de X mediada por Gal4. **A.-** Si las moscas se mantienen a bajas temperaturas, la FLP no se expresa y el casete FRT no se escinde, de modo que se expresa el CD2 controlado por el promotor de actina. El activador transcripcional Gal4 no se expresa y por lo tanto tampoco se expresa el gen de interés controlado por secuencias *UAS*. **B.-** Si se da un *heat-shock*, en algunas células al azar se expresará la FLP, que removerá el casete FRT para que Gal4 se exprese por el promotor de actina y dirija la expresión del gen X. **C.-** un cuerpo graso expresando GFP en células al azar producto de un *heat shock* de 15' a 37C sobre moscas *hsFLP*, *actinaFRTCD2FRTGal4*, *UASGFP* (DAPI en azul, Phalloidina en rojo y GFP en verde).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Adelman, D. M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M. C., and Maltepe, E. (2000). Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 14, 3191-3203.
- Anderson, M. G., Certel, S. J., Certel, K., Lee, T., Montell, D. J., and Johnson, W. A. (1996). Function of the *Drosophila* POU domain transcription factor drifter as an upstream regulator of breathless receptor tyrosine kinase expression in developing trachea. *Development* 122, 4169-4178.
- Anderson, M. G., Perkins, G. L., Chittick, P., Shrigley, R. J., and Johnson, W. A. (1995). drifter, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes Dev* 9, 123-137.
- Ansieau, S., and Leutz, A. (2002). The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem* 277, 4906-4910.
- Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279, 38458-38465.
- Arendt, D., and Wittbrodt, J. (2001). Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1545-1563.
- Ashburner, M. (2001). *Drosophila*. A Laboratory Handbook (Cold Spring Harbor, NY, USA)
- Bacon, N. C., Wappner, P., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Shilo, B., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (1998). Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 811-816.
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D., 3rd, Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L., and Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427, 117-120.
- Bert, P. (1882). Sur la richesse en hémoglobine du sang des animaux vivant sur les hauts lieux. *C R Acad Sci Paris* 94, 805-807.
- Britton, J. S., Lockwood, W. K., Li, L., Cohen, S. M., and Edgar, B. A. (2002). *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell* 2, 239-249.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., and Kaelin, W. G., Jr. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18, 2893-2904.
- Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Carnot, P. and Deflandre, C. (1906). Sur l'activité hémopoïétique de serum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci (III)* 143, 384-386.
- Carr, A. M., Green, M. H., and Lehmann, A. R. (1992). Checkpoint policing by p53. *Nature* 359, 486-487.
- Choi, K. O., Lee, T., Lee, N., Kim, J. H., Yang, E. G., Yoon, J. M., Lee, T. G., and Park, H. (2005). Inhibition of the catalytic activity of hypoxia-inducible factor-1alpha-prolyl-hydroxylase 2 by a MYND-type zinc finger. *Mol Pharmacol* 68, 1803-1809.
- Consortium.*, C. e. G. S. (1998). *C. elegans*: Sequence to Biology. *Science* 282, 2011-2046.
- Covello, K. L., and Simon, M. C. (2004). HIFs, Hypoxia, and Vascular Development. *Curr Top Dev Biol* 62, 37-54.
- Cruz, J. C., Reeves, J. T., Grover, R. F., Maher, J. T., McCullough, R. E., Cymerman, A., and Denniston, J. C. (1980). Ventilatory acclimatization to high altitude is prevented by CO₂ breathing. *Respiration* 39, 121-130.

- Culic, O., Gruwel, M. L., and Schrader, J. (1997). Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 273, C205-213.
- Czyzyk-Krzeska, M. F., and Meller, J. (2004). von Hippel-Lindau tumor suppressor: not only HIF's executioner. *Trends Mol Med* 10, 146-149.
- Dalgard, C. L., Lu, H., Mohyeldin, A., and Verma, A. (2004). Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J* 380, 419-424.
- Dammai, V., Adryan, B., Lavenburg, K. R., and Hsu, T. (2003). Drosophila awd, the homolog of human nm23, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with shi/dynammin during tracheal development. *Genes Dev* 17, 2812-2824.
- Darby, C., Cosma, C. L., Thomas, J. H., and Manoil, C. (1999). Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15202-15207.
- Datar, S. A., Jacobs, H. W., de la Cruz, A. F., Lehner, C. F., and Edgar, B. A. (2000). The Drosophila cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *Embo J* 19, 4543-4554.
- Debonneville, C., and Staub, O. (2004). Participation of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2E3 in Nedd4-2-dependent regulation of the epithelial Na⁺ channel. *Mol Cell Biol* 24, 2397-2409.
- Dekanty, A., Lavista-Llanos, S., Irisarri, M., Oldham, S., and Wappner, P. (2005). The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in Drosophila by promoting nuclear localization of HIF- α /Sima. *J Cell Sci* 118, 5431-5441.
- DiGregorio, P. J., Ubersax, J. A., and O'Farrell, P. H. (2001). Hypoxia and nitric oxide induce a rapid, reversible cell cycle arrest of the Drosophila syncytial divisions. *J Biol Chem* 276, 1930-1937.
- Elson, D. A., Thurston, G., Huang, L. E., Ginzinger, D. G., McDonald, D. M., Johnson, R. S., and Arbeit, J. M. (2001). Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev* 15, 2520-2532.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., *et al.* (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54.
- Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8, 349-357.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.
- Fouladkou, F., Alikhani-Koopaei, R., Vogt, B., Flores, S. Y., Malbert-Colas, L., Lecomte, M. C., Loffing, J., Frey, F. J., Frey, B. M., and Staub, O. (2004). A naturally occurring human Nedd4-2 variant displays impaired ENaC regulation in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F550-561.
- Frazier, M. R., Woods, H. A., and Harrison, J. F. (2001). Interactive effects of rearing temperature and oxygen on the development of *Drosophila melanogaster*. *Physiol Biochem Zool* 74, 641-650.
- Frei, C. (2004). Cyclin D/Cdk4: new insights from Drosophila. *Cell Cycle* 3, 558-560.
- Frei, C., and Edgar, B. A. (2004). Drosophila cyclin D/Cdk4 requires Hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth. *Dev Cell* 6, 241-251.
- Frei, C., Galloni, M., Hafen, E., and Edgar, B. A. (2005). The Drosophila mitochondrial ribosomal protein mRpL12 is required for Cyclin D/Cdk4-driven growth. *Embo J* 24, 623-634.
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M. M., and Krasnow, M. A. (2003). Branching morphogenesis of the Drosophila tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 623-647.
- Glazer, L., and Shilo, B. Z. (1991). The Drosophila FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 5, 697-705.

- Goldberg, M. A., Dunning, S. P., and Bunn, H. F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-1415.
- Gorr, T. A., Tomita, T., Wappner, P., and Bunn, H. F. (2004). Regulation of Drosophila hypoxia-inducible factor (HIF) activity in SL2 cells: identification of a hypoxia-induced variant isoform of the HIF α homolog gene similar. *J Biol Chem* 279, 36048-36058.
- Guillemin, K., Groppe, J., Ducker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, M., and Krasnow, M. A. (1996). The pruned gene encodes the Drosophila serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* 122, 1353-1362.
- Hafen, E. (2004). Interplay between growth factor and nutrient signaling: lessons from Drosophila TOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 153-167.
- Harpur, R. P., and Quastel, J. H. (1949). Phosphorylation of d-glucosamine by brain extracts. *Nature* 164, 693.
- Hay, B. A., and Guo, M. (2003). Coupling cell growth, proliferation, and death. Hippo weighs in. *Dev Cell* 5, 361-363.
- Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L., and Shoe, J. L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* 4, 2.
- Hedges, S. B., Chen, H., Kumar, S., Wang, D. Y., Thompson, A. S., and Watanabe, H. (2001). A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evol Biol* 1, 4.
- Hegg, E. L., and Que, L., Jr. (1997). The 2-His-1-carboxylate facial triad—an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* 250, 625-629.
- Henry, J. R., and Harrison, J. F. (2004). Plastic and evolved responses of larval tracheae and mass to varying atmospheric oxygen content in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 207, 3559-3567.
- Hetz, S. K., and Bradley, T. J. (2005). Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433, 516-519.
- Horne-Badovinac, S., and Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev Dyn* 232, 559-574.
- Huang, A. M., Rehm, E. J., and Rubin, G. M. (2000). Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue. In *Drosophila Protocols*, W. Sullivan, M. Ashburner, and R. Scott Hawley, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 429-438.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.
- Isaac, D. D., and Andrew, D. J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the trachealess gene product. *Genes Dev* 10, 103-117.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12, 149-162.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., *et al.* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W., and Plzak, L. (1957). Role of the kidney in erythropoie-

sis. *Nature* 179, 633-634

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., and et al. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806-810.

Jarecki, J., Johnson, E., and Krasnow, M. A. (1999). Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* 99, 211-220.

Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.

Kaelin, W. G., Iliopoulos, O., Lonergan, K. M., and O'hh, M. (1998). Functions of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *J Intern Med* 243, 535-539.

Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 6519-6525.

Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.

Klambt, C., Glazer, L., and Shilo, B. Z. (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* 6, 1668-1678.

Klein, T. (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* 11, 470-475.

Korenjak, M., and Brehm, A. (2005). E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* 15, 520-527.

Kozmik, Z. (2005). Pax genes in eye development and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 15, 430-438.

Kozu, T., Fukuyama, T., Yamami, T., Akagi, K., and Kaneko, Y. (2005). MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer* 43, 45-53.

Kurtz, A., Jelkmann, W., Sinowatz, F., and Bauer, C. (1983). Renal mesangial cell cultures as a model for study of erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4008-4011.

Kuznetsova, A. V., Meller, J., Schnell, P. O., Nash, J. A., Ignacak, M. L., Sanchez, Y., Conaway, J. W., Conaway, R. C., and Czyzyk-Krzeska, M. F. (2003). von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2706-2711.

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., and Bruick, R. K. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471.

Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., and Whitelaw, M. L. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-861.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J., and Wappner, P. (2002). Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol* 22, 6842-6853.

Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., and et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7580-7584.

Lipscomb, E. A., Sarmiere, P. D., and Freeman, R. S. (2001). SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons. *J Biol Chem* 276, 5085-5092.

- Liu, L., Johnson, W. A., and Welsh, M. J. (2003). *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2128-2133.
- Lu, H., Forbes, R. A., and Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277, 23111-23115.
- Lubarsky, B., and Krasnow, M. A. (2003). Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell* 112, 19-28.
- Madden, S. L., Galella, E. A., Riley, D., Bertelsen, A. H., and Beaudry, G. A. (1996). Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Res* 56, 5384-5390.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (1993). Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2423-2427.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.
- Metzger, R. J., and Krasnow, M. A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284, 1635-1639.
- Meyer, C. A., Jacobs, H. W., Datar, S. A., Du, W., Edgar, B. A., and Lehner, C. F. (2000). *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *Embo J* 19, 4533-4542.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M., and Simonet, W. S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 12, 3156-3161.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-206.
- Moschella, M. C., Menzies, K., Tsao, L., Lieb, M. A., Kohtz, J. D., Kohtz, D. S., and Taubman, M. B. (1999). SM-20 is a novel growth factor-responsive gene regulated during skeletal muscle development and differentiation. *Gene Expr* 8, 59-66.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., *et al.* (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 287, 2196-2204.
- Na, X., Duan, H. O., Messing, E. M., Schoen, S. R., Ryan, C. K., di Sant'Agnese, P. A., Golemis, E. A., and Wu, G. (2003). Identification of the RNA polymerase II subunit hsRPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *Embo J* 22, 4249-4259.
- Nagao, M., Ebert, B. L., Ratcliffe, P. J., and Pugh, C. W. (1996). *Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites. *FEBS Lett* 387, 161-166.
- Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P. B., *et al.* (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117, 941-952.
- Nambu, J. R., Chen, W., Hu, S., and Crews, S. T. (1996). The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 α and *Drosophila* single-minded. *Gene* 172, 249-254.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Ogle, J. W., Lange, R. D., and Dunn, C. D. (1978). Erythropoiesis-stimulating factor production by rabbit kidney cultures from "programmed" rabbits. *Blood* 52, 233-239.

- Oldham, S., and Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* 13, 79-85.
- Ostman, A., and Bohmer, F. D. (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 11, 258-266.
- Palos, L. A., and Blasko, G. (1979). Effect of hypoxia on the development of *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Aviat Space Environ Med* 50, 411-412.
- Panganiban, G., Irvine, S. M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L. S., Sherbon, B., Grenier, J. K., Fallon, J. F., Kimble, J., Walker, M., *et al.* (1997). The origin and evolution of animal appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5162-5166.
- Pfander, D., Kobayashi, T., Knight, M. C., Zelzer, E., Chan, D. A., Olsen, B. R., Giaccia, A. J., Johnson, R. S., Haase, V. H., and Schipani, E. (2004). Deletion of *Vhlh* in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development* 131, 2497-2508.
- Placzek, M., and Skaer, H. (1999). Airway patterning: A paradigm for restricted signalling. *Curr Biol* 9, R506-510.
- Planes, C., Blot-Chabaud, M., Matthay, M. A., Couette, S., Uchida, T., and Clerici, C. (2002). Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 47318-47324.
- Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9, 677-684.
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-11214.
- Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E., and Thomas, G. (2002). dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat Cell Biol* 4, 251-255.
- Reichman-Fried, M., and Shilo, B. Z. (1995). Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech Dev* 52, 265-273.
- Reiling, J. H., and Hafen, E. (2004). The hypoxia-induced paralogs *Scylla* and *Charybdis* inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev* 18, 2879-2892.
- Reissmann, K. R. (1950). Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5, 372-380.
- Ribeiro, C., Ebner, A., and Affolter, M. (2002). In vivo imaging reveals different cellular functions for FGF and Dpp signaling in tracheal branching morphogenesis. *Dev Cell* 2, 677-683.
- Richard, K., Ramminger, S. J., Inglis, S. K., Olver, R. E., Land, S. C., and Wilson, S. M. (2003). O₂ can raise fetal pneumocyte Na⁺ conductance without affecting ENaC mRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 671-676.
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., and Basler, K. (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, *punt* and *thick veins*, for *dpp* signaling in vivo. *Cell* 80, 889-897.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D. C., Guillemin, K., and Krasnow, M. A. (1996). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 122, 1395-1407.
- Sambrook, J. R., and David, W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Third Edition edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Sato, M., and Kornberg, T. B. (2002). FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the drosophila tracheal system. *Dev Cell* 3, 195-207.
- Schofield, C. J., and Zhang, Z. (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 9, 722-731.
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1-3.
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., and Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.
- Sen, C. K., Khanna, S., Gordillo, G., Bagchi, D., Bagchi, M., and Roy, S. (2002). Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann N Y Acad Sci* 957, 239-249.
- Shiga, Y., Tanaka-Matakatsu M and Hayashi S. (1996). A nuclear GFP/b-galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living drosophila. *Development, growth and differentiation* 38, 99-106.
- Shubin, N., Tabin, C., and Carroll, S. (1997). Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388, 639-648.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.
- Snyder, P. M., Steines, J. C., and Olson, D. R. (2004). Relative contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC regulation in epithelia determined by RNA interference. *J Biol Chem* 279, 5042-5046.
- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., and Crews, S. (1997). The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 124, 4571-4582.
- Spradling, A. (1993). Developmental genetics of oogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M.-A. A. Bate M, ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-70.
- Spradling, A. C. (1986). P-element Mediated Transformation. In *Drosophila: A practical approach*, D. Roberts, ed. (IRL Press, Oxford), pp. 175-198.
- Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.
- Stemler, F. W., and Hiestand, W. A. (1951). Rapid acclimatization of insects to anoxia, with special reference to the housefly. *Science* 114, 440-441.
- Stocker, H., Andjelkovic, M., Oldham, S., Laffargue, M., Wymann, M. P., Hemmings, B. A., and Hafen, E. (2002). Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science* 295, 2088-2091.
- Stocker, H., and Hafen, E. (2000). Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* 10, 529-535.
- Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., Belawat, P., Daram, P., Breuer, S., Thomas, G., and Hafen, E. (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 5, 559-565.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M. A. (1996). branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091-1101.
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N., and Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 485-495.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 19, 4298-4309.

- Ten, V. S., and Pinsky, D. J. (2002). Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Curr Opin Crit Care* 8, 242-250.
- To, K. K., and Huang, L. E. (2005). Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1. *J Biol Chem* 280, 38102-38107.
- Tomita, S., Ueno, M., Sakamoto, M., Kitahama, Y., Ueki, M., Maekawa, N., Sakamoto, H., Gassmann, M., Kageyama, R., Ueda, N., *et al.* (2003). Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Mol Cell Biol* 23, 6739-6749.
- Trent, C., Tsuing, N., and Horvitz, H. R. (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 104, 619-647.
- Tretyakov, A. V., and Farber, H. W. (1995). Endothelial cell tolerance to hypoxia. Potential role of purine nucleotide phosphates. *J Clin Invest* 95, 738-744.
- Uv, A., Cantera, R., and Samakovlis, C. (2003). *Drosophila* tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems. *Trends Cell Biol* 13, 301-309.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1993a). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268, 21513-21518.
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1993b). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4304-4308.
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-1237.
- Wappner, P., and Ratcliffe, P. J. (2001). Development of branched structures and the cellular response to hypoxia: an evolutionary perspective. In *Genetics models in cardiorespiratory biology.*, G. G. Haddad, and T. XU, eds. (New York, Marcel Dekker, Inc.), pp. 91-137.
- Wax, S. D., Rosenfield, C. L., and Taubman, M. B. (1994). Identification of a novel growth factor-responsive gene in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269, 13041-13047.
- Weiss, F. U., Daub, H., and Ullrich, A. (1997). Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev* 7, 80-86.
- Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16, 1151-1162.
- Westneat, M. W., Betz, O., Blob, R. W., Fezzaa, K., Cooper, W. J., and Lee, W. K. (2003). Tracheal respiration in insects visualized with synchrotron x-ray imaging. *Science* 299, 558-560.
- Wilk, R., Weizman, I., and Shilo, B. Z. (1996). *trachealess* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 93-102.
- Wingrove, J. A., and O'Farrell, P. H. (1999). Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* 98, 105-114.
- Wolf, G., Schroeder, R., and Stahl, R. A. (2004). Angiotensin II induces hypoxia-inducible factor-1 alpha in PC 12 cells through a posttranscriptional mechanism: role of AT2 receptors. *Am J Nephrol* 24, 415-421.
- Zwiebel, L. J., Hardin, P. E., Liu, X., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1991). A post-transcriptional mechanism contributes to circadian cycling of a per-beta-galactosidase fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3882-3886.