

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata (Centro Regional de Estudios Genómicos).

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/OTROS TEMAS: Biotecnología .

TÍTULO DEL TRABAJO: **ROL DE LOS CUERPOS DE PREOCESAMIENTO (P-BODIES) DURANTE LA APOPTOSIS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.**

AUTOR(ES): Carla Layana

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: clayana@creg.org.ar

PALABRAS CLAVES: apoptosis, proteómica funcional, microscopía confocal.

INTRODUCCION

La apoptosis o muerte celular programada juega un rol fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos ya que participa de la selección de células en condiciones fisiológicas y en situaciones de estrés. El desequilibrio entre la muerte y proliferación celular puede conducir a distintas patologías como infartos, Alzheimer, Parkinson cuando la muerte celular es excesiva y a fenómenos carcinogénicos o a enfermedades autoinmunes cuando el proceso de eliminación de células falla. Si bien se ha avanzado en el conocimiento básico sobre proliferación y apoptosis en los vertebrados, aún distamos de poder diseñar terapias efectivas contra éstas y otras enfermedades. En *Drosophila melanogaster*, se ha establecido con precisión el patrón de muerte celular durante el desarrollo embrionario y se han identificado varios de los genes que lo controlan (Abrams, 1999). Por lo tanto, en estudios sobre el equilibrio entre proliferación/muerte celular, *Drosophila melanogaster* ha adquirido suma importancia como modelo experimental (Abrams, 2002; Hipfner y Cohen, 2004).

Durante la apoptosis, se disparan varios mecanismos de los cuales uno muy importante es la modificación del inicio de la traducción o síntesis de proteínas (Clemens, 2004).

Normalmente, existen proteínas denominadas factores del inicio de la traducción, que al ensamblarse a la subunidad menor del ribosoma eucariota forman un complejo ribonucleoproteico (mRNP) asociado al ARNm que debe traducirse, para desencadenar la reacción de síntesis de proteínas. Sin embargo, existen dos modos de inicio de la traducción. Por un lado, el *mecanismo dependiente del cap* requiere que el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) reconozca una estructura llamada "cap" (m7GpppN) en el extremo 5' del ARNm. eIF4E vincula el cap con otras proteínas reguladoras por medio de su interacción con el factor adaptador eIF4G, el cual se une con la helicasa eIF4A, el complejo multiproteico eIF3 y la proteína de unión al poliA (PABP, Poly A-Binding Protein), todos ellos asociados a la subunidad menor del ribosoma (Gingras y col, 1999). Por otro lado, el *mecanismo independiente del cap* no utiliza la interacción con esta estructura para iniciar la traducción (Merrick, 2004). Se ha demostrado que algunos ARNm virales, así como unos pocos ARNm celulares utilizan este mecanismo. En estos casos, las secuencias no traducidas del extremo 5' del transcripto (5'UTR, Untranslated Region) suelen poseer elementos que sirven para la unión directa del ribosoma, con o sin la intervención de otros factores del inicio de la traducción. Estas regiones del ARNm se denominan sitios de entrada interna del ribosoma (IRES, Internal Ribosome Entry Site), (Hellen y Sarnow, 2001). Los IRES suelen tener una estructura secundaria compleja, secuencias ricas en pirimidinas y pequeños marcos de lectura que no son traducidos. Sin embargo, secuencias cortas, no estructuradas y ricas en AT también pueden funcionar como IRES o al menos ser capaces de iniciar la traducción independiente de cap sin necesidad de emplear helicasas, por lo que no necesitan la mediación de eIF4E y eIF4G

(Merrick, 2004). Típicos representantes de esta última clase de ARNm son los transcritos de *Drosophila* que codifican la proteína de estrés térmico HSP70 y el factor pro-apoptótico *reaper*, ambos inducidos en distintas condiciones de estrés celular (Hernández y col, 2004).

Otra importante etapa de la regulación de la expresión génica es la degradación del ARNm. Esta es llevada a cabo a través de exonucleasas en la dirección 3'→ 5' del transcripto o en la dirección 5'→ 3' (Coller y Parker, 2004). Ambas rutas de degradación se inician con la eliminación de la cola poliA o deadenilación, llevada a cabo por deadenilasas como la Ccr4. La degradación en la dirección 5'→ 3' requiere en primer lugar la eliminación del cap (decapping) a través de enzimas llamadas Dcps. Seguidamente, la exonucleasa Xrn1 cliva las uniones entre los nucleótidos y acorta la cadena de ARNm. Tanto en células de mamíferos como en levaduras las proteínas implicadas en el proceso de degradación 5'→ 3' se encuentran en unas estructuras citoplasmáticas llamadas cuerpos de procesamiento o *processing bodies* (P-bodies) (Eystathioy y col, 2003; Sheth y Parker, 2003; Cougot y col, 2004). Los P-bodies aún no han sido caracterizados a nivel bioquímico, ya que es muy difícil purificarlos. Diversos componentes han sido caracterizados hasta ahora, inmunohistoquímica o por medio de fusiones con proteínas marcadoras como la proteína fluorescente verde o GFP (green fluorescent protein). Por ejemplo, una de las proteínas que se localiza en los P bodies, utilizada comúnmente para identificarlos es Lsm1 (Sm-like protein).

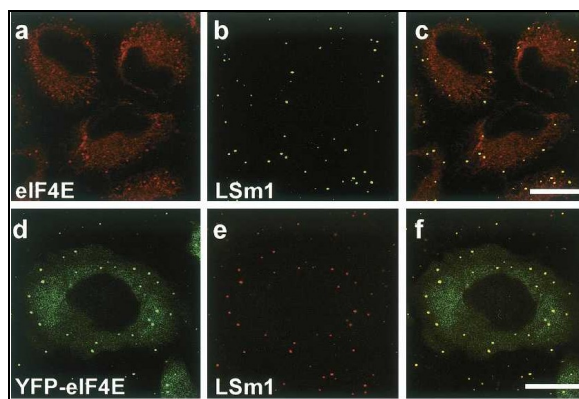


Figura1. Imagen de células humanas obtenida mediante microscopía confocal. Se puede observar el factor de inicio de la traducción eIF4E, mediante el uso de un anticuerpo específico contra la proteína (panel a) o acoplado a GFP (panel d). En los paneles b y e se observa Lsm1, la proteína marcadora de P bodies. Ambas colocalizan en estos cuerpos de procesamiento (paneles c,f). Escala = 10 μ m.

Varios estudios permitieron identificar en los P bodies, otras enzimas vinculadas a la degradación de transcritos. También se propuso que estas estructuras son sitios de acumulación de ARNm en mRNPs inactivos, capaces de reactivarse cuando sea necesario (Zamore y Haley, 2005). En relación a esto, se han hallado varias proteínas y pequeños ARNs asociados al ARNm, llamados micro ARNs (miARNs)

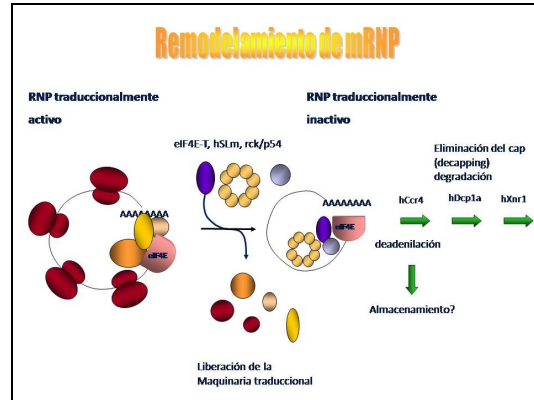


Figura 2. Modelo de remodelamiento secuencial de mRNPs activos, destinados al silenciamiento en P bodies (modificado de Andrei y col, 2005).

En *Drosophila melanogaster* los P bodies fueron encontrados en células embrionarias S2 y en oocitos (Nakamura y col, 2002).

En la tabla 1 se resumen algunos de los componentes que integran los P-bodies y que han sido estudiados en distintas especies.

<i>Drosophila</i>	Función	Mamíferos
Cup	Reprime la traducción del gen oskar	-
4ET-like	Transporta el factor eIF4E hacia P-bodies	4ET
Ago1,Ago2	Se asocian a miARNs	Ago 1, Ago2, Ago3
Ccr4	Deadenilasa del ARNm	Ccr
Bruno	Reprime la traducción de oskar	-
CG4279	Coactivadores del decapping	Lsm1
Dcp2	Integra el complejo de decapping	Dcp2
Me31b	Helicasa	Rck/p54
CG3291	Exonucleasa	Xrn1

Tabla 1. Información obtenida de las bases de datos: [http:// flybase.bio.indiana.edu](http://flybase.bio.indiana.edu); www.ensembl.org

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es estudiar el rol de los cuerpos de procesamiento en el control del inicio de la traducción de genes proapoptóticos en *Drosophila melanogaster*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- determinar la composición de los mRNPs presentes en P-bodies y que regulan la expresión de genes proapoptóticos en *Drosophila melanogaster*.
- estudiar las interacciones entre las proteínas integrantes de estos complejos.
- conocer el rol que estas interacciones cumplen en la degradación y el silenciamiento del ARNm.

MATERIALES Y METODOS

Amplificación de los genes de proteínas presentes en P bodies

Se amplificaron los genes de las proteínas presentes en los cuerpos de procesamiento mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima Pfx-50 (Invitrogen, USA) a partir de una biblioteca de cDNA de *Drosophila melanogaster*. Seguidamente se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa 1%, para detectar la presencia de los productos de amplificación, sembrando las muestras junto a marcadores de peso molecular de 100 pares de bases y 1 kilobases. Luego, los fragmentos de interés, fueron eluidos del gel utilizando un kit de purificación (Quiagen) para obtener ADN purificado.

Generación de proteínas de fusión entre los componentes de P-bodies y proteínas fluorescentes marcadoras

Los vectores de expresión que portan el gen codificante para las proteínas marcadoras YFP (yellow fluorescent protein) y CFP (cian fluorescent protein), fueron cortados con enzimas de restricción. Los extremos cohesivos se rellenaron con nucleótidos, a través de la acción del fragmento klenow de la polimerasa I (Invitrogen, USA) para generar extremos romos capaces de unirse, mediante enlaces fosfodiéster, a los extremos de los fragmentos fosforilados de las proteínas amplificadas por PCR. Una alícuota de este ADN amplificado de concentración conocida se mezcló con el vector de expresión en un medio de reacción conteniendo T4 ligasa (Invitrogen, USA). La reacción de ligación se incubó durante 18 hs a 16°C.

De esta manera se generaron las construcciones que darán lugar a proteínas de fusión que contengan: proteína en estudio-YFP o proteína en estudio-CFP.

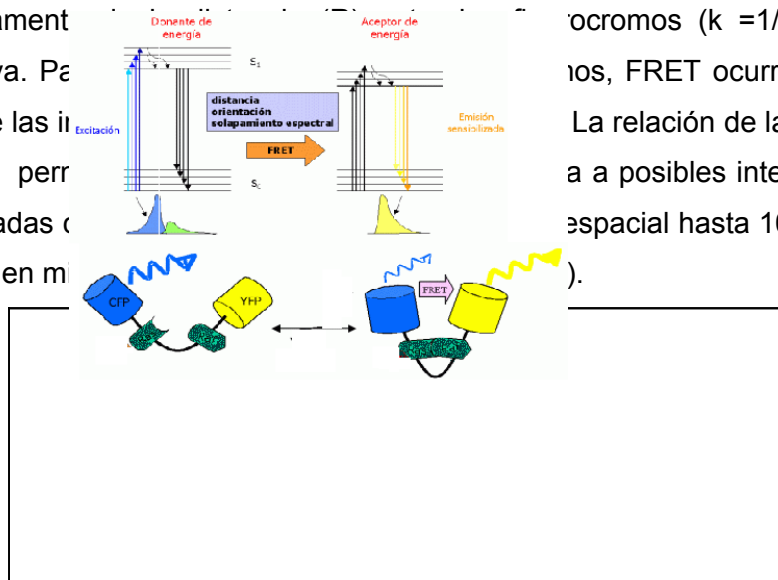
Transfección de células

Los vectores portadores de los genes de interés asociados al gen codificante para la proteína marcadora, se transfectarán en células embrionarias S2 de *Drosophila melanogaster* (ver estadío) usando el kit Effectene (Quiagen).

Estudio de las interacciones entre las proteínas

Luego de transcurridas 24-48 hs a partir de la transfección, se estudiará por medio de microscopía confocal la expresión y localización intracelular de las proteínas de interés fusionadas a las proteínas marcadoras. Los distintos componentes de las fusiones ensayadas se transfectarán en pares CFP-YFP en todas las combinaciones posibles y las interacciones proteína-proteína, se analizarán mediante la técnica de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET, fluorescence resonance energy transfer). En esta, un fluorocromo aceptor de energía llamado donante, puede transferir al ser excitado por un láser, parte de esa energía a otra molécula, llamada aceptor, si ésta se encuentra a una distancia próxima del primero. Esto resulta en un incremento en la fluorescencia emitida por el aceptor y en una reducción de la fluorescencia emitida por el donante (figura 3). Así, la velocidad de transferencia de energía definida como k depende

críticamente
relativa. Pa
las de las il
con k per
marcadas
físico en m



ocromos ($k = 1/R^6$) y de su orientación
os, FRET ocurre a distancias similares a
La relación de la distancia y la orientación
a a posibles interacciones entre proteínas
espacial hasta 100 veces superior al límite

Figura 3. El estado excitado del fluorocromo donante de energía se relaja mediante la transferencia de energía (FRET) a otra molécula aceptora, la cual se excita sin absorber fotones y emite luz con su espectro característico (Modificado de Vaquero y col, 2005).

La eficiencia de FRET se medirá por medio de la técnica de fotoblanqueo del aceptor que consiste en iluminar con un láser durante un tiempo prolongado una determinada zona de la célula en la que se observaba fluorescencia hasta que la energía emitida por el fluorocromo se agote. Luego, se podrá observar cómo se recupera la fluorescencia cuando por ejemplo, una proteína de interés se acumula nuevamente en ese sitio. Los datos serán adquiridos con un microscopio confocal LSM510-Meta (Carl Zeiss, Jena, Alemania) y analizados con el programa Physiology (Carl Zeiss, Jena, Alemania)

RESULTADOS

Hemos amplificado a partir del genoma de *Drosophila melanogaster*, mediante PCR, las siguientes proteínas: 4ET-like, CUP, Lsm1, Xrn1, Me31b, Ccr4, Dcp2, Bruno, Ago. Utilizando cebadores específicos, complementarios a los extremos de las secuencias de cada transcrito, bajo distintas temperaturas de hibridación y tiempos de polimerización, obtuvimos los respectivos ADNs. La figura 4 muestra los productos obtenidos e identificados a través de geles de agarosa 1%.

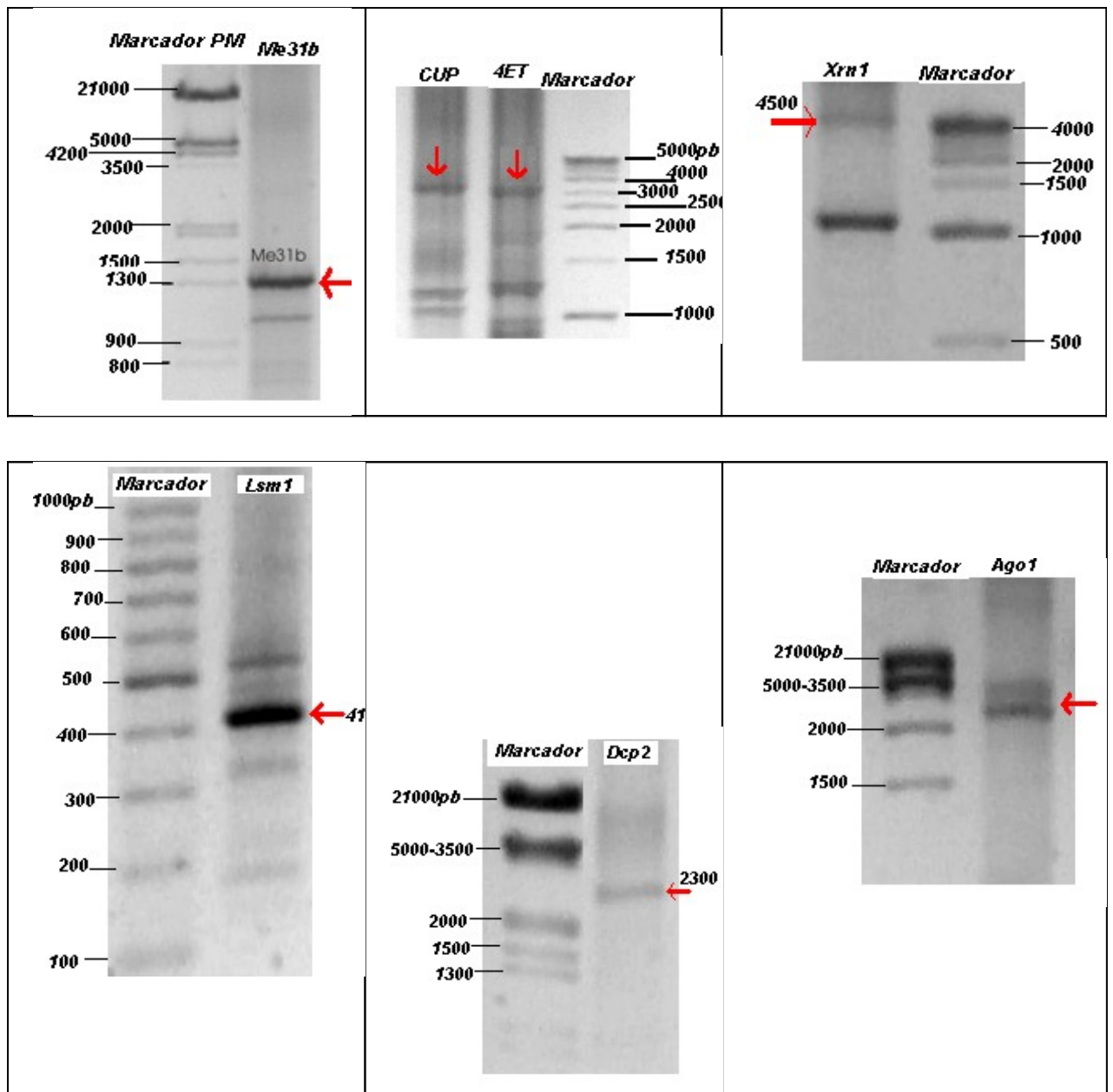


Figura 4. Geles de agarosa en los que se observan los productos de PCR correspondientes a las distintas proteínas estudiadas. La flecha roja indica el fragmento amplificado.

Posteriormente hemos formado las siguientes construcciones entre los fragmentos amplificados y los vectores de expresión correspondientes a las proteínas YFP y CFP: EYFP-4E; ECFP-4E; EYFP-4ET; ECFP-4E; EYFP-Lsm1; ECFP-Lsm1; EYFP-Me31b; ECFP-Me31b. Actualmente estamos trabajando en la etapa de transfección de las células y comenzando a analizar las interacciones en el microscopio confocal.

DISCUSION

A lo largo del desarrollo y crecimiento de los organismos existe un balance entre proliferación y muerte celular. La apoptosis es un importante mecanismo que contribuye a mantener este equilibrio mediante la eliminación de células dañadas (Abrams, 2002; Hipfner y Cohen, 2004). Alteraciones en este proceso conducen a diversas patologías. Los procesos de traducción y apoptosis están íntimamente relacionados (Clemens y col, 2000). Nuestro laboratorio ha estudiado el control traduccional de varios genes pro-apoptóticos en *Drosophila melanogaster*. Se ha demostrado que la falta de la proteína de unión al cap eIF4E en embriones mutantes de moscas, resultó en un aumento de la transcripción del gen *reaper* y en un incremento de la apoptosis (Hernández y col, 2004). Además, se demostró que el ARNm de *reaper* se traduce de manera dependiente de IRES (Hernández y col, 2004), y distintas proteínas de unión al ARN se han identificado como potenciales reguladores de la traducción (Vazquez-Pianzola y col, 2005). Recientemente, los P bodies han cobrado importancia como sitios donde ocurre el metabolismo de un ARNm destinado a la degradación (Ingelfinger y col, 2002, Sheth y Parker, 2003) o al almacenamiento como parte de un mRNP transitoriamente inactivo (Liu y col, 2005).

En el presente trabajo caracterizamos varias proteínas presentes en el genoma de *Drosophila melanogaster* que se asemejan en estructura, función y regulación, a las halladas en otros organismos y que integran complejos RNPs vinculados al control de la síntesis proteica. Poco se sabe sobre las interacciones y las vías de regulación de la traducción en las que están involucradas. En relación a ello, el uso de la técnica de FRET mediante microscopía confocal permitirá analizar las interacciones proteína-proteína y dilucidar el rol de cada una en el proceso de silenciamiento del ARNm durante la apoptosis en *Drosophila melanogaster*.

Se ha sugerido mediante un trabajo llevado a cabo en levaduras, que un paso crítico en la formación de los P bodies es la liberación del ARNm del complejo RNP traduccionalmente activo (ver figura 1 de la introducción) (Coller y Parker, 2005). Estudios posteriores en *Drosophila melanogaster* han mostrado además, que la formación de los P bodies es promovida por interacciones entre proteína y miARNs, en un complejo RNP traduccionalmente inactivo (Eulalio y col, 2007). Sumado a esto, la presencia del factor de inicio de la traducción eIF4E en células humanas (y de su transportador eIF4E-T), sugiere un nuevo rol de esta proteína en un mecanismo diferente al ya conocido inicio de la traducción (Andrei y col, 2006). En este contexto, nuestro análisis permitirá ahondar en el conocimiento sobre las vías de regulación de la traducción de ARNms pro-apoptóticos y el rol de los P- bodies como sitios activos donde ocurre gran parte del metabolismo de un ARNm. Esto podría constituir un aspecto clave para el diseño de estrategias destinadas a controlar el balance entre proliferación celular y apoptosis, con el objeto de desarrollar terapias contra muchas enfermedades vinculadas a la alteración de este equilibrio.

CONCLUSION

Hasta el momento hemos demostrado que los genes de las proteínas 4ET-like, Lsm1, CUP, Bruno, Xrn1, Dcp2, Ago1, Ago2, Me31by Ccr4 están presentes en el genoma de *Drosophila melanogaster*. Estudios de microscopía confocal permitirán conocer y validar interacciones en el remodelamiento de complejos RNPs vinculados al control de inicio de la traducción de ARNm de genes pro-apoptóticos en los P-bodies.

REFERENCIAS

Abrams J.M An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends cell biol.* Vol 9: 435-440. Nov 1999.

Abrams J.M. Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell* Vol 110 (4): 403-406. Ago 2002.

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* Vol 11:717-727. Jun 2005.

Clemens M.J. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ* Vol 7 (7): 603-615. Jul 2000.

Clemens M.J. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*. Vol 23(18):3180-8. Abr 2004.

Coller J, Parker R. Eukaryotic mRNA Decapping. *Ann. Rev. Biochem* Vol 73:861-890. Jul 2004.

Cougot, Babajko, Seraphin. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J.Cell Biol.*Vol 165: 31-40. Abr. 2004.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-Body formation is a consequence, not the cause, of RNA-Mediated gene silencing. *Molecular and celular biology* Vol 27(11): 3970-3981. Jun 2007.

Eystathioy T, Jakymiw A, Chan E, Seraphin B, Cougot N, Fritzler M. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. Vol 9: 1171-1173. Oct. 2003.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Ann. Rev. Biochem.* Vol.68:913-963. Jul1999.

Grzymiski EC. Visualizing an mRNA destruction line. *Nat Struct Biol* Vol 10:416. Jun 2003.

Hellen,Sarnow. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.*Vol 15:1593-612. Jul 2001.

Hernández G, Vázquez-Pianzola P, Sierra JM, Rivera-Pomar R. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA*. Vol 10:1783-1797. Ago 2004.

Hipfner D.R., Cohen S.M. Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 5: 805-815. Oct 2004.

Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* Vol 5:267-293. Sep 2004.

Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Luhrmann R, Achsel T. The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* Vol 8:1489-1501. Dic 2002.

Jares EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* Vol 21:1387-1395. Nov 2003.

Liu J, Valencia-Sanchez M, Hannon G, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7 (7): 719-723. Jul 2005.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* Vol 70: 437-473. Jul 2001.

Merrick, WC. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene*. Vol 332:1-11. May 2004.

Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S. Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development* Vol 128:3233-42. Sep 2001.

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* Vol 11:371-382. Feb 2005.

Ong SE, Foster LJ, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* Vol 29:124-130. Oct 2003.

Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, Vol 300:805-808. May 2003.

van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Seraphin B. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J* Vol 21:6915-6924. Dic 2002.

Vaquero C, Domingo B, Picazo F. Análisis de la dinámica celular con proteínas fluorescentes. Feb 2005. Disponible en *Journal.net*

Vázquez-Pianzola P y col. Proteomic analysis of reaper 5' untranslated region-interacting factors isolated by tobramycin affinity-selection reveals a role for La antigen in reaper mRNA translation. *Proteomics* Vol 5 (6):1645-1655. Apr 2005.

Wickens M, Goldstrohm A. Molecular biology. A place to die, a place to sleep. *Science* Vol 300:753-755. May 2003.

Zamore P, Haley B. Ribo-gnome: The Big World of Small RNAs. *RNA* Vol 309: 1519-1526. Sep 2005.