

DISCUSSIÓ

La discussió d'aquesta Tesi s'ha dividit en cinc apartats cadascun dels quals proposa una funció del gen *selD*, deduïda a partir dels experiments d'aquest treball i els resultats obtinguts amb anterioritat al nostre grup (Alsina, 1999).

1. La mutació *selD^{ptuf}* genera una situació d'estrès oxidatiu

Fins al moment, les dades obtingudes en el nostre grup recolzen el fet de que la mutació *selD^{ptuf}* de *Drosophila* genera una situació d'estrès oxidatiu. En primer lloc, la mutació nul·la *selD^{ptuf}* afecta el gen *selD* o *selenofosfat sintetasa 1 (Sps1)* (Alsina *et al.*, 1998). Aquest és un gen involucrat en la biosíntesi de selenoproteïnes, proteïnes que majoritàriament controlen el balanç redox cel·lular. El gen *selD* és el responsable de la síntesi del monoselenofosfat, el donador de Se que posteriorment serà incorporat al tRNA específic de Sec un cop aquest hagi estat modificat. La síntesi de monoselenofosfat és possiblement un pas limitant en la síntesi de l'aminoàcid Sec. A més, una manca en la font de Sec molt probablement afectarà la síntesi de selenoproteïnes. Si ens posem en la situació de la maquinària de traducció, en arribar al codó UGA i no disposar de Sec és molt probable que la traducció finalitzi aprofitant que el codó UGA també és un codó d'*stop*. Així es generaria una forma truncada i no funcional de la proteïna donada l'absència de la Sec, que s'ha demostrat important per a la funció de les selenoproteïnes (Axley *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1991). En segon lloc, i consistent amb la funció del gen *selD*, la síntesi de selenoproteïnes es veu greument afectada a l'homozigot *selD^{ptuf}* com demostra la manca d'incorporació de Se. En tercer lloc, els discs imaginals dels individus homozigots acumulen ROS possiblement degut a la manca de la funció antioxidant de les selenoproteïnes (Alsina *et al.*, 1999).

Les mosques heterozigotes per la mutació *selD^{ptuf}* són aparentment normals: el seu desenvolupament és normal, són perfectament viables i fèrtils, no presenten cap fenotip extern i la seva vida mitja és com la de mosques salvatges. De fet, totes aquestes característiques són les que ens permeten dir que la mutació *selD^{ptuf}* és recessiva. És a dir, que els seus efectes sols es manifesten en homozigosi. Malgrat l'heterozigot sembla normal, l'efecte final de la reducció d'una còpia del gen *selD* havia de ser un desequilibri del balanç redox cel·lular. Aquesta situació havia d'estar afectant a l'heterozigot d'alguna manera i nosaltres no érem capaços de detectar-ho. Demostrar que l'heterozigot *selD^{ptuf}* presentava uns nivells de radicals lliures més elevats que una mosca salvatge era molt difícil. L'increment dels mateixos possiblement era subtil ja que l'heterozigot és viable. A part d'això, la dificultat de mesurar petits nivells de radicals lliures, donada la seva curta vida i la necessitat d'aplicar tècniques altament sofisticades per a dur-ho a terme, ens va fer descartar aquesta via. Per les mateixes raons vàrem deixar de banda l'anàlisi de biomolècules modificades per radicals lliures. Al final, la millor estratègia va ser realitzar experiments *in vivo* on sotmetent a les mosques heterozigotes a productes altament oxidants hem pogut demostrar que l'heterozigot és sensible a situacions d'estrès oxidatiu. D'aquests resultats inferim que la síntesi de selenoproteïnes, i per tant, la funció antioxidant que exerceixen és menys eficient a l'heterozigot. Així doncs, l'heterozigot *selD^{ptuf}* no és una mosca normal, la pèrdua d'una dosi del gen *selD* genera una situació més

o menys patològica que només es posa de manifest davant d'un estrès oxidatiu (Article 2: Morey *et al.*, 2003).

Però encara podem anar més enllà. En el laboratori les mosques es cultiven a temperatura i humitat òptimes i constants, l'aliment i l'espai no són limitants i no hi ha competència amb altres individus. Sota aquestes condicions la patologia de l'heterozigot no es posa de manifest si no és que es força molt l'adversitat afegint agents oxidants en el medi de cultiu. Possiblement, en condicions de vida lliure l'heterozigot estaria en clara desavantatge en front les mosques salvatges sense haver-l'ho d'enfrontar a situacions límit com elevades concentracions d'oxidants. En aquesta situació, la mutació passaria de ser considerada com a mutació recessiva a ser-ho com a dominant, és a dir, els seus efectes ja serien visibles en heterozigosi. De moment no s'ha descrit cap mutació en un gen de la ruta de biosíntesis de les selenoproteïnes en humans. De totes maneres, una alteració de la síntesis de les mateixes també es pot donar per una manca de Se en la dieta i això també causa un desavantatge en front a persones amb una dieta rica en Se. De fet, la síndrome de Keshan, un tipus de cardiomiopatia, i la síndrome de Kashin-Beck, una artritis deformant, són endèmiques de zones deficientes en Se com certes regions de la Xina (Rayman, 2000).

2. Importància de les selenoproteïnes de *Drosophila* en el control de ROS

Els mecanismes de defensa front els radicals lliures estan conservats durant l'evolució. La SOD i la Cat constitueixen un sistema de defensa contra la generació de radicals superòxid (O_2^-). La SOD converteix el O_2^- a H_2O_2 i la Cat descomposa el H_2O_2 en H_2O i O_2 . Els sistemes de defensa GPX/GR i TrxR són més indirectes. La selenoproteïna GPX catalitza la conversió del H_2O_2 a H_2O oxidant el cosubstrat glutatió (GSH) i l'enzim GR transfereix equivalents reductors del NADPH al glutatió oxidat (GSSG) per reciclar el glutatió (GSH). En el cas de la selenoproteïna TrxR, aquesta s'encarrega de transferir equivalents reductors del NADPH a la tioredoxina (Trx) per generar $Trx(SH)_2$. Tan el glutatió com el $Trx(SH)_2$ són dos antioxidants intracel·lulars molt efectius (Carmel-Harel i Storz, 2000).

A *Drosophila* el sistema SOD/Cat està conservat i és funcional però no existeix un sistema canònic de reciclatge del GSH. En primer lloc, els homòlegs de GPX identificats en el genoma de la mosca no són selenoproteïnes doncs contenen Cys en lloc de Sec. D'altra banda, el putatiu homòleg de l'enzim GR (que posteriorment ha sigut anomenat *dmtrxr1*) és més semblant als gens TrxR i té activitat TrxR. Així doncs, la proteïna Dmtrxr1, que a més tampoc és una selenoproteïna, s'encarrega també de reciclar el glutatió de la següent manera (Kankoz *et al.*, 2001):



Cal esmentar que el sistema SOD/Cat i la TrxR cooperen per tal de mantenir el control del balanç redox (Missirlis *et al.*, 2001).

El fet de que la GPX i la TrxR de *Drosophila* continguin Cys en lloc de Sec fa pensar que podrien ser menys eficients que a mamífers. A més, que el sistema TrxR tingui una funció dual ens fa pensar que per tal de compensar la deficiència d'un sistema de reciclatge del GSH, altres sistemes podrien ser necessaris. Així, les selenoproteïnes podrien contribuir al control del balanç redox a *Drosophila*. En primer lloc perquè l'heterozigot

selD^{ptuf} és sensible a un estrès oxidatiu en estudis on SOD, Cat i TrxR són en principi normals i funcionals (Article 2: Morey *et al.*, 2003). En segon lloc perquè cèl·lules homozigotes *selD^{ptuf}* acumulen radicals lliures (Alsina *et al.*, 1999; Article 3). En tercer lloc, en les dues selenoproteïnes identificades, malgrat no tenim evidències funcionals que les puguin correlacionar amb una funció en el control del balanç redox cel·lular, l'anàlisi de les seves seqüències revela certes característiques que podrien indicar una possible funció antioxidant (Article 4: Castellano *et al.*, 2001). La selenoproteïna dselM conté la Sec dins una caixa redox (CXXC, on C pot ser Cys o Sec i X qualsevol altra aminoàcid) una seqüència d'aminoàcids present en proteïnes que catalitzen reaccions d'oxidoreducció. A més a més, l'estructura secundària en la regió de la Sec és la mateixa que es troba al centre catalític de la selenoproteïna GPX bovina: *β sheet-coil-α sheet* on la Sec es troba dins el *coil*. La selenoproteïna dselG es caracteritza per tenir la Sec en el penúltim aminoàcid. Això també es dona a la selenoproteïna TrxR de mamífers. Si més no, l'estudi monogràfic d'aquestes dues selenoproteïnes a través d'experiments de caire més bioquímic podrien ajudar a clarificar la seva funció. No podem descartar que *Drosophila* tingui més selenoproteïnes que les tres que es coneixen ara. Possiblement el disseny de programes informàtics específics per a identificar SECIS diferents al consensu permetria trobar més selenoproteïnes.

Finalment, cal esmentar la possible funció de les selenoproteïnes en la longevitat. Una de les teories més destacades per explicar l'envelliment és la teoria de l'envelliment degut a l'acumulació de radicals lliures (Harman, 1957). Aquesta proposa que l'acumulació de radicals lliures portaria a un estrès oxidatiu que a la llarga conduiria a la senescència cel·lular degut al dany causat a les biomolècules de la cèl·lula. D'aquesta teoria es pot suposar doncs que un increment de l'activitat dels agents antioxidants allargaria la vida, i que una reducció l'escurçaria. Per tal d'analitzar més acuradament si contribueixen de manera significativa a prevenir l'envelliment i a allargar la vida, els experiments més adients serien l'anàlisi de mutacions de pèrdua de funció i la sobreexpressió d'aquestes selenoproteïnes. En el cas de dur a terme un experiment de sobreexpressió varis aspectes s'haurien de tenir en compte. Una consideració important és l'elecció de teixit on s'induirà l'expressió ectòpica. De moment, l'únic teixit on s'ha demostrat que la sobreexpressió d'un enzim antioxidant (SOD humana) allarga la vida a *Drosophila* és en motoneurons (Parkes *et al.*, 1998). Un altre aspecte és l'estequiometria dels elements de la ruta de biosíntesi de les selenoproteïnes. En cultius cel·lulars, quan es vol detectar la incorporació de Se radioactiu en una determinada selenoproteïna transfectada, també és necessari cotransfectar les cèl·lules amb plàsmids que continguin tRNA^{Sec} i SBP2, el que suggereix que aquests serien components limitants de la ruta de biosíntesi (Article 4: Castellano *et al.*, 2001). També s'ha descrit que un excés de SelB (el factor d'elongació específic de la Sec) inhibeix la incorporació de la Sec a l'mRNA de les selenoproteïnes (Tormay *et al.*, 1996). A més, els nostres experiments d'expressió ectòpica de *selD* en motoneurons indiquen que un excés de la funció Sps1 escurça la vida de les mosques (Article 2: Morey *et al.*, 2003). Ja que la quantitat de Se present en el llevat del medi de cultiu de les mosques és més que suficient, possiblement aquest efecte és degut a una acumulació de metabòlits intermediaris de Se tòxics o un excés de l'aminoàcid Sec, que en elevades concentracions podria ser tòxic. Per tant, totes aquestes observacions posen de manifest que tots els

components de la via han d'estar finament regulats per tal de que la síntesi de selenoproteïnes procedeixi normalment.

La teoria de l'envelliment degut al radicals lliures ha estat testada a *Drosophila* amb mutacions i sobreexpressions de gens com SOD i Cat, els quals intervenen en el control del balanç redox cel·lular. En un futur, l'estudi de *dselG* i *dselM* podria donar informació sobre la funció d'aquestes selenoproteïnes en l'envelliment i la longevitat.

3. L'increment de ROS modula negativament la via Ras/MAPK

La sorprenent semblança entre els fenotips dels clons de pèrdua de funció del gen *selD* en l'ala adulta (Alsina *et al.*, 1998) i els descrits per clons de pèrdua de funció d'elements de la via DER/Ras/MAPK en dita estructura (Diaz-Benjumea i Hafen, 1994), ens van encoratjar a analitzar quina era la possible relació entre el gen *selD* i la via de senyalització Ras/MAPK. La similitud de fenotips indicava que el gen *selD* o les selenoproteïnes eren necessàries per al correcte funcionament de la via Ras/MAPK. Així, la relació entre el gen *selD* i la via Ras/MAPK es podia explicar per diferents situacions. Una era que la proteïna SelD, a part de la seva funció selenofosfat sintetasa 1, tingues una altra funció necessària per el correcte funcionament d'algun dels elements de la via. És a dir, que fos un modulador positiu, i que per tant la seva absència condicions el funcionament de la via Ras/MAPK. Una altra opció era que una selenoproteïna específica fos aquest modulador positiu. L'opció que consideràvem més probable era que el correcte manteniment del balanç redox cel·lular, en aquest cas controlat per la funció antioxidant de les selenoproteïnes, fos necessari per l'adequat funcionament de la via Ras/MAPK.

L'heterozigot

Per tal de comprovar aquestes diferents possibilitats i detectar una possible interacció genètica entre el gen *selD* i elements de la via Ras/MAPK, l'estratègia utilitzada es va basar en testar si la mutació *selD^{ptuf}* en heterozigosi suprimia els fenotips de mutacions de guany de funció de diferents elements de dita via tant a l'ull com a l'ala. En el nostre cas aquesta era l'aproximació més adequada tenint en compte que: 1) tan a l'ull com a l'ala, és possible treballar amb guanys de funció de la via Ras/MAPK activats específicament en processos de diferenciació. Els fenotips dels clons homozigots *selD^{ptuf}* a l'ala indicaven que tan els processos de diferenciació com proliferació es trobaven afectats. Com ja s'havia abordat l'estudi dels efectes de la mutació *selD^{ptuf}* en proliferació aquí ens volíem centrar en els processos de diferenciació; 2) els fenotips de guany de funció dels diferents elements de la via que hem utilitzat en els dos sistemes han estat àmpliament caracteritzats (extra fotoreceptors R7 a l'ull i venes ectòpiques a l'ala); 3) especialment a l'ull, la hiperactivació dels elements de la via Ras/MAPK és sensible a dosi. És a dir, dues còpies d'un transgen activat tenen un fenotip més fort que una sola còpia. D'això és dedueix que el fenotip causat per una còpia del transgen activat pot ser modificada per la reducció d'una sola còpia d'un gen involucrat en dita via; 4) aquesta aproximació ha estat utilitzada prèviament i amb molt èxit degut a la seva alta sensibilitat per a la identificació de nous components i moduladors de la via Ras/MAPK (Simon *et al.*, 1991; Olivier *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1996; Karim *et al.*, 1996).

Tenir la possibilitat de testar diferents elements de la via ens permetia posicionar l'efecte de la mutació *selD^{ptuf}* dins la mateixa. Segons aquest disseny experimental, en el cas de que la proteïna *selD* o una putativa selenoproteïna fossi els moduladors positius de la cassette Ras/MAPK, la mutació *selD^{ptuf}* en heterozigosi hauria de suprimir el fenotip de guany de funció d'un sol dels elements de la via. D'altra banda, si el correcte manteniment del balanç redox cel·lular controlat per la funció antioxidant de les selenoproteïnes fos necessari per l'adequat funcionament de la via Ras/MAPK, la mutació *selD^{ptuf}* hauria de suprimir el fenotip de guany de funció de tots els elements de la via. La troballa de que la mutació *selD^{ptuf}* suprimís els fenotips de guany de funció de varis elements correlatius de la via però no de la resta, sols ens permetria situar per epistàsia l'efecte de la mutació en una regió de la via, però no distingir entre les possibilitats esmentades.

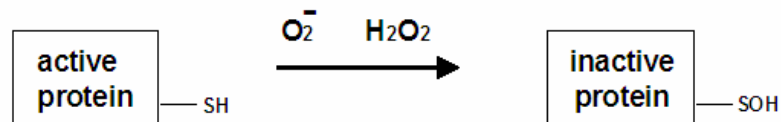
Hem trobat que la mutació *selD^{ptuf}* és capaç de suprimir els fenotips de guany de funció dels receptors tirosina quinasa Sevenless i DER i dels elements de la via Ras/MAPK testats tant a l'ull (inclòs Ras, veure més avall) com a l'ala (Article 1: Morey *et al.*, 2001). Per tant, la funció antioxidant de les selenoproteïnes és necessària per a que aquesta via de transducció del senyal funcioni correctament. Això indica que l'acumulació de radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* és responsable de la modulació negativa de la via. Altres dades reforcen la nostra hipòtesi. Per una banda, el fet de que l'heterozigot és més sensible a una situació d'estrès oxidatiu que una mosca normal suggereix que la síntesi de selenoproteïnes és menys eficient (Article 2: Morey *et al.*, 2003). D'aquí inferim que els nivells de radicals lliures presents a l'heterozigot han de ser més elevats que en una mosca salvatge. D'altra banda, hem demostrat que un increment de radicals lliures independent de selenoproteïnes com el generat per la mutació nul·la en el gen de la Catalasa, *Catⁿ¹* també suprimeix els fenotips de guany de funció dels receptors tirosina quinasa Sevenless i DER, que activen la via Ras/MAPK a l'ull i a l'ala respectivament. A més, cal esmentar que si bé inicialment no vàrem poder detectar una supressió del fenotip de guany de funció de Ras a l'ull, posteriorment hem pogut demostrar que la combinació en transheterozigosi de les mutacions *selD^{ptuf}* i *Catⁿ¹* suprimeix el fenotip de guany de funció de Ras (Article 3). Reforçant la funció de les selenoproteïnes en la modulació de la via Ras/MAPK, el gen *selD* també ha estat identificat en un *screening* del receptor Torso, un receptor tirosina quinasa que activa la via Ras/MAPK en els extrems de l'embrió per donar lloc a les estructures terminals (Dr. W. X. Li, University of Rochester Medical Center, comunicació personal). De tot això, podem concloure que el balanç redox cel·lular és important pel funcionament de la via Ras/MAPK.

Cada vegada més, la llista de gens que modulen positiva o negativament la via Ras/MAPK i no són component essencials de la mateixa va creixent. Aquesta via ha demostrat ser una via molt sensible a les condicions intracel·lulars. Així, a part del nostre treball que mostra la importància del balanç redox en els seu funcionament, s'ha demostrat que el Zinc (Zn) i proteïnes que faciliten la difusió de cations també tenen una funció important en la modulació de la cassette Ras/MAPK. Utilitzant la mateixa aproximació experimental que en el nostre cas, en un *screening* per a supressors dels fenotip de guany de funció del gen *let-60 ras* de *Caenorhabditis elegans* es va identificar el gen *cdf-1*. La proteïna CDF-1 (cation diffusion facilitator) regula positivament la senyalització Ras/MAPK reduint les concentracions citosòliques dels ions de Zn, ja que aquestes

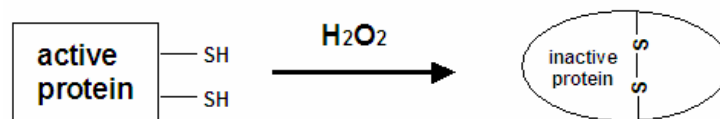
modulen negativament la via. La o les proteïna/es inhibida/es pel Zn i el mecanisme exacte d'inhibició encara es desconeix (Bruinsma *et al.*, 2002).

Els nostres experiments i resultats tampoc ens donen l'explicació bioquímica de com la situació patològica d'estrès oxidatiu a l'heterozigot afecta el funcionament de la via Ras/MAPK. Ja hem comentat a la Introducció que certes modificacions proteiques reversibles degudes a increments puntuals de radicals lliures permetrien el control de la activació de la via Ras/MAPK. Però també es sabut que els radicals lliures oxiden les proteïnes alterant la seva estructura i/o funció. Així, un nivell de radicals lliures no necessàriament massa elevat però persistent com és el cas de la mutació *selD^{ptuf}*, podria modificar irreversiblement els elements de la via Ras/MAPK, i conseqüentment, afectar el seu funcionament. Les següents modificacions proteiques causades per radicals lliures han estat descrites (Thannickal i Fanburg, 2000) i proposem que podrien ser les responsables de la modulació negativa de la via Ras/MAPK:

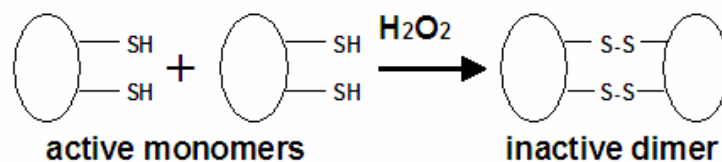
- l'oxidació irreversible de cisteïnes pot inactivar la funció de les proteïnes.



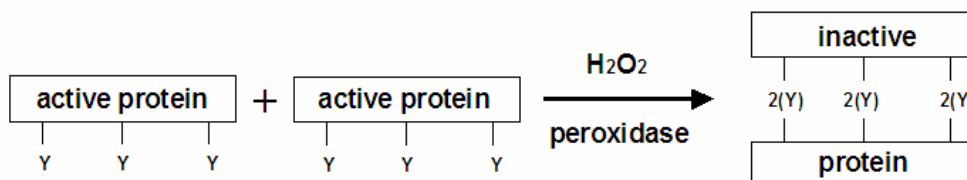
- la formació intramolecular de ponts disulfur pot alterar la funció d'una proteïna generant canvis conformacionals de la mateixa.



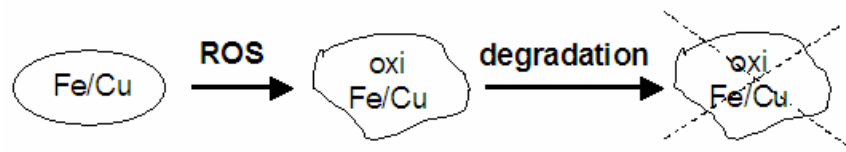
- dimerització de proteïnes per ponts disulfur intermoleculars pot inactivar la funció d'una determinada proteïna



- *cross-linking* de proteïnes mitjançant ponts ditirosina també inactiva les proteïnes.



- oxidació de proteïnes que contenen metalls com el Fe o el Cu altera l'estabilitat de les mateixes i pot desembocar en la seva ubiquitinització i degradació.



L'homozigot

Els experiments acabats de descriure indicaven que l'increment de radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* modulava negativament l'activitat de la cassette Ras/MAPK. Però precisament pel fet de treballar en heterozigosi i en un fons genètic *sensibilitzat* per la via Ras/MAPK, això era una informació merament qualitativa. Per tal de tenir una idea real i de caire més quantitatiu de l'efecte de l'increment dels radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* sobre l'activitat de la via Ras/MAPK, vàrem generar clons de cèl·lules *selD^{ptuf}* en un fons genètic normal per l'activitat de dita via. En aquest context, vàrem comprovar l'acumulació de radicals lliures i analitzar la modulació de la via Ras/MAPK.

Malgrat ja sabíem que els clons de cèl·lules homozigotes *selD^{ptuf}* a l'ala adulta eren molt semblants als de pèrdua de funció d'elements de la via Ras/MAPK, per a fer una anàlisi més detallada dels efectes dels radicals lliures sobre dita via, vàrem triar l'ull una altra vegada. Com ja s'ha esmentat, la via Ras/MAPK controla la diferenciació dels fotoreceptors (Freeman, 1996), a més, en el disc imaginal d'ull s'han descrit marcadors moleculars per a verificar les diferents etapes d'aquests procés. L'aplicació de la tècnica *Minute* en la generació de clons *selD^{ptuf}* era necessària per diversos motius. En primer lloc, donat que els clons *selD^{ptuf}* són de per sí molt petits, ens interessava donar avantatge proliferatiu a les cèl·lules mutants. En segon lloc, això ens permetia diluir encara més la *perdurance*. És a dir, en el moment de la recombinació mitòtica la cèl·lula mare heterozigota té un determinat nivell de selenoproteïnes, i en dividir-se en una cèl·lula salvatge i una mutant aquest conjunt de selenoproteïnes també es reparteix. Quantes més divisions dins el clon mutant, més es diluirà el nivell de selenoproteïnes provinent de la cèl·lula mare. En tercer lloc, com els radicals lliures que es puguin acumular en el clon difonen cap al teixit heterozigot, ens interessava que el clon fos el més gran possible. Així, en el centre del clon els radicals lliures romanen més estona i seus efectes es poden fer palesos.

S'ha descrit que la supervivència i diferenciació dels fotoreceptors ve controlada per diferents nivells d'activitat de la molècula Ras (Fig. 19; Halfar *et al.*, 2001). Així, els fenotips dels clons de pèrdua de funció amb diferents nivells d'activitat de Ras, mostren una correlació "activitat de la via Ras/MAPK-fenotip" molt útil per a inferir el nivell d'activitat de la cassette Ras/MAPK en els clons *selD^{ptuf}*, simplement per comparació de fenotips. La demostració de que Ras també es modulada pels radicals lliures ens permetia fer aquesta comparació (Article 3). Per tal de dur a terme aquest estudi vàrem realitzar els

mateixos tipus de tests i utilitzar la mateixa metodologia que els descrits en el treball de Halfar i col·laboradors (Halfar *et al.*, 2001): estudi dels clons a l'ull adult (induïts amb el sistema *eyFLP* i la mutació letal *clR2.11*, veure Article 3 *Material and Methods*) i tincions amb el marcador específic del fotoreceptor R8 Boss, amb Elav com a marcador neuronal de tots els fotoreceptors i TUNEL per a detectar l'apoptosi de les cèl·lules mutants en clons en els discs imaginals (induïts amb el sistema *hsFLP* i amb la tècnica *Minute*, veure Article 3 *Material and Methods*). L'anàlisi detallada dels fenotips obtinguts i la seva comparació amb els resultats de Halfar i col·laboradors, suggereixen que l'increment de radicals lliures, que també hem pogut demostrar en aquests clons de cèl·lules *selD^{ptuf}*, modula negativament l'activitat de la via Ras/MAPK, però sols d'una manera suau (Fig. 19). L'activitat de la via Ras/MAPK en un context *selD^{ptuf/ptuf}* estaria entre els nivells d'activitat descrits com a nivell baix i mitjà. Això es suporta en que els nivells d'activitat de la via presents en la condició mutant *selD^{ptuf}* permeten assolir diverses etapes en el procés de diferenciació i en que les cèl·lules, malgrat acaben morint massivament, ho fan de manera tardana com demostra el fet que els clons es detecten a l'ull adult. Si l'activitat de la via està molt reduïda (com és el cas de la mutació de Ras *ras^{D38E}*) la diferenciació dels fotoreceptors no arriba tan enllà com en el nostre cas i el teixit mutant mor i és eliminat molt abans de l'eclosió de l'individu, per la qual cosa no es detecta a l'ull adult. Cal esmentar però, que quan s'analitzen els clons *selD^{ptuf}* en el disc imaginal algunes cèl·lules ja entren en apoptosi.

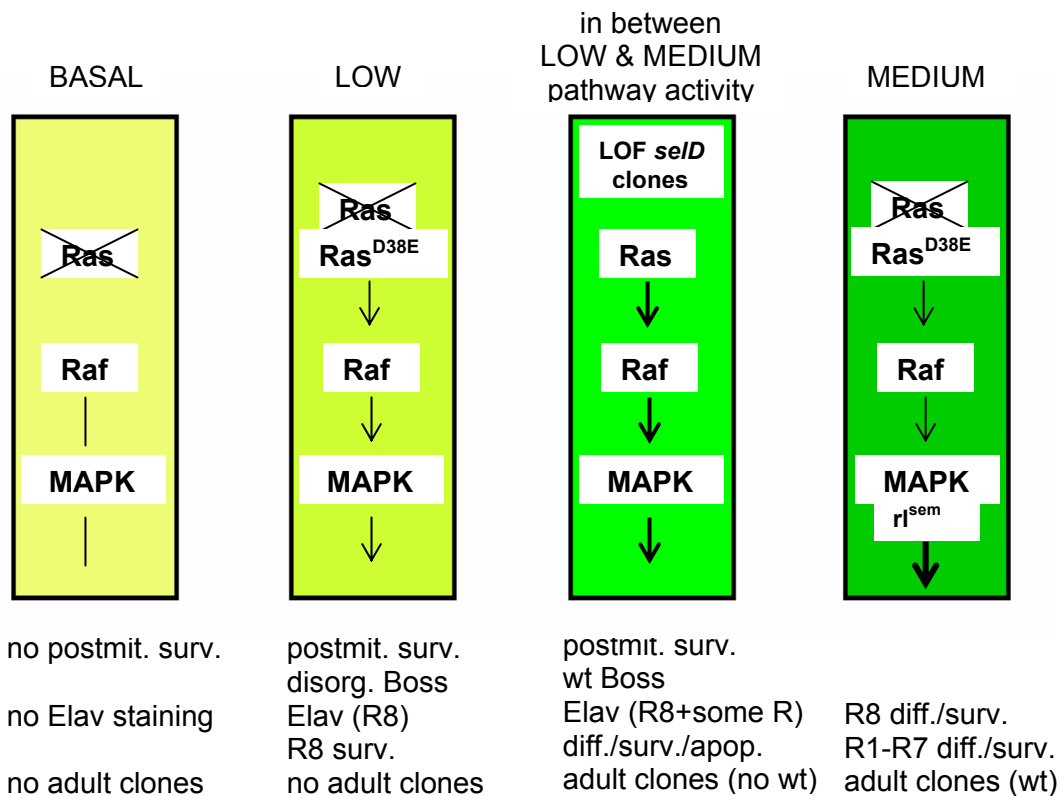


Fig. 19. Els clons de baixa activitat de Ras (*ras^{D38E}*) no permeten el correcte posicionament del fotoreceptor R8 ni el posterior reclutament de la resta de fotoreceptors. En canvi, l'acumulació de radicals lliures degut a la mutació *selD^{ptuf}* modula negativament la via Ras/MAPK a uns nivells que permeten el correcte posicionament de l'R8, el reclutament i diferenciació de part dels altres fotoreceptors, i allarga la seva

supervivència malgrat les cèl·lules mutants acaben morint. Aquesta mort és tardana: els clons *ras*^{D38E} no sobreviuen fins a l'etapa adulta mentre que els de *selD*^{ptuf} són presents a l'ull malgrat causen greus alteracions. Abreviacions: postmit., posmitotic; surv., survival; disorg., disorganized; diff., differentiation; apop., apoptosis (figura adaptada de Halfar *et al.*, 2001).

Com ja s'ha esmentat, les senyals de supervivència que actuen a través de la via Ras/MAPK regulen l'apoptosi i varis estudis han demostrat la necessitat de la via Ras/MAPK per la supervivència cel·lular a *Drosophila* (Simon *et al.*, 1991; Diaz-Benjumea i Hafen, 1994; Freeman 1996; Miller i Cagan 1998; Sawamoto *et al.* 1998; Baker i Yu, 2001; Halfar *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2002). Donat que els nostres experiments, tant en heterozigosi com en homozigosi, indiquen que la mutació *selD*^{ptuf} modula negativament la via Ras/MAPK es podria pensar que dita modulació negativa era responsable de l'apoptosi observada en el nostre mutant homozigot i en els clons de cèl·lules mutants. Tanmateix, tenim evidències que suggereixen que aquest no és el cas. La supressió dels fenotips de guany de funció dels elements de la cassette Ras/MAPK per l'heterozigot *selD*^{ptuf} no és deguda a apoptosi. L'ull és una estructura altament organitzada i tant l'excés com la manca de fotoreceptors dona un fenotip d'ull rugós. El fenotip de excés d'R7s s'assoleix perquè altres cèl·lules de l'ommatidi esdevenen R7s. Això fa que l'estructura de l'ommatidi quedi alterada. Si la supressió del fenotip fos per apoptosi mai observariem un rescat tan fort de la morfologia externa de l'ull, ni de l'estructura de l'ommatidi com l'observat en els talls semifins. En el cas de l'ala, l'exemple de la supressió del fenotip de guany de funció de Raf és definitiu. L'expressió ectòpica de Raf a l'etapa pupal desemboca en la pèrdua de venes en lloc de venes ectòpiques. Això és degut a que en aquest moment l'activitat de la via hauria d'estar reduïda per a permetre la diferenciació de les mateixes. La mutació *selD*^{ptuf} restaura el patró de venes i això implica la diferenciació de cèl·lules d'intervena cap a vena. La mort cel·lular no podria explicar mai aquest rescat (Article 1: Morey *et al.*, 2001). També s'ha demostrat que la proteïna proapoptòtica Hid és un sensor de l'activitat de la via Ras/MAPK. Quan l'activitat de la mateixa es veu disminuïda s'activa la transcripció de *hid* i la proteïna existent s'activa en no ser fosforilada per la MAPK (Bergmann *et al.* 1998; Kurada i White, 1998). Per tant, si l'increment de radicals lliures modulés negativament la via Ras/MAPK el suficient com per activar l'apoptosi, *selD*^{ptuf} o *Cat*ⁿ¹ en heterozigosi, o la seva combinació en transheterozigosi haurien d'incrementar l'activitat de Hid. Tanmateix, en cap cas hem detectat un increment del fenotip apoptòtic dels diferents nivells d'activitat de Hid testats (de més a menys activitat: *GMRhid*, *GMRhid sev-rasV12* i *GMRyan*^{Act}). A més, els resultats obtinguts de l'anàlisi dels marcadors moleculars en els clons de cèl·lules homozigotes a l'ull, suggereixen que la modulació negativa de la via no és extremadament forta, i per tant, pot ser que Hid no sigui sensible a una reducció tan subtil de l'activitat de la cassette Ras/MAPK. Finalment, l'expressió d'un guany de funció de la MAPK (*sevenmaker*) en el mutant homozigot per a tal de suplir la disminució de l'activitat de la via no rescata la morfologia dels discs imaginals (Article 3).

Malgrat no podem descartar que la modulació negativa de la via Ras/MAPK pugui ser responsable d'una part de l'apoptosi observada en mutant, totes les dades presentades indiquen, si més no, que la disminució en l'activitat de la via Ras/MAPK no seria la responsable majoritària de l'apoptosi observada en el mutant *selD*^{ptuf}.

4. L'increment de ROS activa l'apoptosi a través de la via Dmp53/Rpr

A mamífers s'ha descrit que els radicals lliures poden induir mort cel·lular (Buttke i Sandstrom, 1994; Simon et al., 2000). L'acció dels mateixos podria explicar la mort observada en els clons de cèl·lules *selD^{ptuf}* i en el mutant homozigot donat que en tots dos casos hem detectat la seva presència (Alsina et al., 1999; Article 3). L'apoptosi que trobem en el clon i als seus voltants es podria explicar per un increment sobtat de radicals lliures. Normalment aquesta mort s'observa en el centre del clon, on la dilució dels ROS triga més a donar-se, i en les cèl·lules al voltant del clon, que de sobte patiran un increment de radicals degut a la seva difusió des de el teixit mutant. Tanmateix, en els clons mutants encara hi ha moltes cèl·lules. Donat que els radicals lliures difonen, la mort més tardana de les cèl·lules del clon es podria explicar pel dany acumulatiu causat pels nivells baixos però persistents de ROS que es donarien en aquesta situació.

Els mecanismes que activen l'apoptosi en situacions d'estrès oxidatiu no són massa coneguts. Els radicals lliures danyen el DNA i la proteïna p53 és un sensor del dany genotòxic. A més, activa la transcripció de gens involucrats en l'apoptosi, i per tant, és una possibilitat que p53 engegui la mort cel·lular en resposta a un increment de radicals lliures. A *Drosophila*, el gen proapoptòtic *rpr* integra diferents senyals apoptòtiques que condueixen a la mort cel·lular. Això ho fa mitjançant la presència de diversos elements de resposta en el seu promotor. Un d'aquests elements de resposta és específic per Dmp53 (Brodsky et al., 2000).

El fet de detectar acumulació de ROS (Alsina et al., 1999), haver observat estabilització de la proteïna Dmp53, transcripció del gen *rpr* i activació de caspases en els discs imaginals homozigots (Article 3) suggeria que la via Dmp53/Rpr estava involucrada en l'apoptosi del nostre mutant. Com la mort cel·lular està tan avançada en els discs imaginals de larva homozigota, es podria pensar que l'activació de tota aquesta maquinària no fos específica de la nostra mutació, sinó comú a qualsevol mutació que també causes letalitat a l'estadi de larva III. Per tal de testar aquesta possibilitat també es varen realitzar tots els experiments en clons de cèl·lules *selD^{ptuf}*. Amb l'excepció de l'estabilització de Dmp53, tots els altres elements de la via Dmp53/Rpr s'han trobat activats en clons incloent l'acumulació de ROS (Article 3). Precisament, com aquests difonen del clon de cèl·lules mutants cap al teixit heterozigot que l'envolta, les cèl·lules del clon possiblement no tenen tant dany genotòxic com el mutant homozigot. Conseqüentment, l'estabilització de Dmp53 no deu arribar a nivells detectables o bé el temps d'estabilització en els clons és tan curt que no permet la seva detecció. De totes maneres, sembla ser suficient per activar la transcripció de *rpr* en els clons, que es més fàcil de detectar degut a l'elevada estabilitat de la proteïna β -galactosidasa utilitzada com a *reporter*.

Com ja s'ha esmentat a l'apartat de Resultats, els mitocondris són l'element central de la via intrínseca d'apoptosi. Un nivell elevat de radicals lliures pot danyar directament els mitocondris i estimular la formació de pores en la membrana mitocondrial externa i interna. Això causa la pèrdua del potencial de membrana i l'expansió de la matriu mitocondrial degut a una desregulació osmòtica. Finalment, la membrana externa rebenta alliberant al citosol factors proapoptòtics mitocondrials (Green i Reed, 1998). A part del citocrom *c*, que donarà lloc l'activació de les caspases, també s'allibera la molècula AIF (Apoptosis

Inducing Factor, Susin *et al.*, 1999) que indueix apoptosi de manera independent de caspases. AIF és una oxidoreductasa que en ser alliberada al citosol es transloca al nucli i fragmenta el DNA. A *Drosophila* existeix un clar homòleg d'AIF (CG7263; Vernooy *et al.*, 2000). Aquest podria ser un mecanisme ràpid d'inducció de mort per tal d'eliminar una cèl·lula amb un excés de radicals lliures i podria explicar la mort primerenca que observem en el centre dels clons i al voltant del mateix. Malauradament, de moment no existeixen eines a *Drosophila* per a testar aquesta possibilitat. Tanmateix, l'apoptosi independent de caspases no sembla ser la via majoritària d'apoptosi en el mutant *selD^{ptuf}* ja que la sobreexpressió de l'inhibidor d'apoptosi específic de caspases DIAP1 rescata fortament la viabilitat de les cèl·lules mutants.

5. Una visió integrada: defectes en proliferació i activació de l'apoptosi en el mutant *selD^{ptuf}*

Treballs anteriors duts a terme en el nostre grup varen demostrar que la proliferació i el cicle cel·lular també es veuen afectats en el mutant *selD^{ptuf}* (Alsina *et al.*, 1999). Experiments d'incorporació de BrdU mostren que el mutant presenta una taxa de proliferació reduïda comparat amb els organismes salvatges, suggerint que algunes de les cèl·lules mutants podrien tenir el cicle cel·lular enlentit degut a un allargament de la fase G1 o quedar aturades en fase G1. Tincions amb el marcador de mitosi Histona 3 fosforilada mostren que el nombre de mitosis en cèl·lules mutants de discs i cervells és menor que en la condició salvatge. També s'ha observat que les cèl·lules mutants acumulen ciclina B però no entren en mitosi, mentre que en la condició salvatge l'acumulació de ciclina B va associada a l'estadi de metafase i es degrada a l'estadi d'anafase, permetent el pas de G2 a mitosi. Això suggereix que algunes cèl·lules mutants podrien quedar aturades en G2. Per altra banda, en aquesta Tesi hem trobat que l'increment de radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* modula negativament la via Ras/MAPK. A més, aquests radicals lliures també semblen ser els responsables de la inducció de l'apoptosi observada en el mutant *selD^{ptuf}* mitjançant l'activació de la via Dmp53/Rpr.

La integració de totes aquestes dades ens permet proposar un model que lligaria els efectes observats en proliferació i apoptosi (Fig. 20). Així doncs, l'increment de radicals lliures modularia negativament la via Ras/MAPK. L'activitat proliferativa d'aquesta via es basa en la transcripció de la ciclina D, necessària per passar de G0 a G1 i adquirir competència per a entrar en el cicle cel·lular (Pruitt i Der, 2001). Una reducció en els nivells d'aquesta ciclina podria enlentir el cicle cel·lular i explicar per que en el mutant hi han menys cèl·lules en fase S com demostren els experiments d'incorporació de BrdU. D'altra banda, els radicals lliures causen lesions en el DNA i això activa la via de resposta al dany genotòxic (Zhou i Elledge, 2000). Així, molècules sensores, encara poc conegudes, engegen vies de transducció del senyal responsables de l'activació dels efectors. Un d'aquests efectors és la proteïna p53. L'acumulació de p53 activa la transcripció de la proteïna p21, un inhibidor del complex cdk2/ciclina E (Pietenpol i Stewart, 2002). Aquest complex és necessari per entrar a la fase S. Així, a *Drosophila*, l'estabilització de Dmp53 en les cèl·lules mutants podria activar la transcripció del gen *dacapo* (*dap*, l'homòleg de p21 a *Drosophila*) i aquesta inhibir el complex cdk2/ciclina E. Llavors, les cèl·lules mutants no entrarien a la fase S i quedarien aturades en fase G1. En aquest moment

podrien intentar reparar les possibles lesions al DNA abans de la seva replicació, doncs s'ha vist que p53 també activa la transcripció de gens involucrats en la reparació del DNA. Com el desequilibri en el balanç redox cel·lular en cèl·lules mutants *selD^{ptuf}* és constant, també ho és el dany en el DNA. D'aquesta manera, els nivells de Dmp53 es mantindrien elevats. S'ha descrit que p53 pot causar aturada a G2 inhibint la formació o activitat del complex cdk1/ciclina B, també conegut com MPF (Mitosis Promoting Factor), de diferents maneres (Pietenpol i Stewart, 2002). Una d'elles és, altra vegada, a través de la proteïna p21. Així, els alts nivells de proteïna Dmp53 estabilitzada podrien donar lloc a un excés de proteïna Dacapo, que podria ser responsable de l'aturada a G2 de les cèl·lules que haguessin escapat al *checkpoint* de G1. Finalment, tant en el cas d'aturada a G1 com a G2, si les cèl·lules no són capaces de prosseguir en el cicle acabaran morint. A part de la funció de p53 de promoure l'aturada a G1 i G2, una altra de les conseqüències de la seva estabilització és la transcripció de gens involucrats en apoptosi (Burns i El-Deiry, 1999; Schuler i Green, 2001). D'aquesta manera, en la cèl·lula mutant *selD^{ptuf}* aturada en G1 o en G2, Dmp53 activaria la transcripció del gen proapoptòtic *rpr* i s'engegaria la maquinària apoptòtica. També és molt probable que el dany genotòxic causat pels ROS en les cèl·lules mutants sigui tan sever que Dmp53 directament transcriu *rpr* i s'activi l'apoptosi sense aturar el cicle cel·lular per intentar reparar el dany causat al DNA.

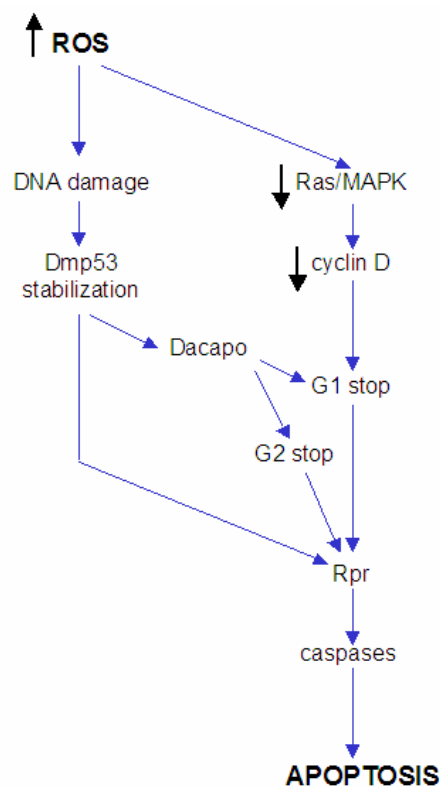


Fig. 20. Possible relació entre els defectes de proliferació i l'activació de l'apoptosi en el mutant *selD^{ptuf}*.

Els clons de cèl·lules mutants *selD^{ptuf}* són un exemple de cèl·lules amb desavantatge proliferatiu que són reconegudes com a tals i conseqüentment eliminades. Possiblement

Dmp53 sigui la molècula acobladora d'aquests dos processos doncs participaria en tots dos i en la mateixa direcció. D'una banda, controlaria la parada del cicle cel·lular i a la vegada activaria l'apoptosi. Com es reconeixerien les cèl·lules a eliminar? Pensem que l'etiqueta molecular que marcara les cèl·lules a eliminar seria l'increment de radicals lliures. Malgrat la seva volatilitat, exercirien el seu efecte senyalitzant el desavantatge proliferatiu a través de la modulació negativa de la cassette Ras/MAPK i senyalitzant la necessitat d'eliminar les cèl·lules mutants a través del dany genotòxic.

Ja que el mutant *selD^{ptuf}* pareix que afecta a la síntesi del conjunt de les selenoproteïnes de *Drosophila*, no podem correlacionar els efectes observats amb cap selenoproteïna en concret. El repte de futur en la recerca de la funció de les selenoproteïnes a *Drosophila* és investigar les diferents selenoproteïnes identificades. Això ens permetria esbrinar si cap d'aquestes selenoproteïnes té una funció destinada al control, directe o indirecte, del cicle cel·lular, de la diferenciació o de l'apoptosi, o si bé, simplement les selenoproteïnes intervenen en el control del balanç redox cel·lular de manera general sense cap especificitat en concret.

CONCLUSIONS

1. El gen *selD* modula la via Ras/MAPK a través de la síntesi de selenoproteïnes i la seva funció antioxidant. L'increment de radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* regula negativament la via Ras/MAPK.

- L'heterozigot *selD^{ptuf}* és més sensible als agents oxidants H₂O₂ i paraquat que les mosques control, suggerint que la síntesi de selenoproteïnes és menys eficient en la condició d'heterozigosi.
- La mutació *selD^{ptuf}* en heterozigosi suprimeix els fenotips de guany de funció dels elements de la via Ras/MAPK a l'ull i a l'ala de *Drosophila* inclosos els receptor Sevenless i DER.
- Els clons de cèl·lules mutants *selD^{ptuf}* acumulen radicals lliures.
- En clons *selD^{ptuf}* a l'ull l'activitat de la via Ras/MAPK està probablement reduïda donat que la diferenciació dels fotoreceptors, controlada per aquesta via, està afectada.

2. L'increment de radicals lliures causat per la mutació *selD^{ptuf}* engega l'apoptosi majoritàriament a través de la via dependent de caspases Dmp53/Rpr.

- La regulació negativa de la via Ras/MAPK causada pels radicals lliures no sembla ser la responsable de la mort cel·lular observada, cosa que suggereix si més no, que la seva contribució a l'apoptosi del mutant *selD^{ptuf}* és minoritària.
- Els radicals lliures, l'estabilització de la proteïna Dmp53 i la transcripció del gen *rpr* engeguen l'apoptosi del mutant *selD^{ptuf}*.
- L'activació de la caspasa iniciadora DRONC, el processament de la caspasa efectora DRICE i el rescat de la viabilitat cel·lular per l'expressió ectòpica de DIAP1 indiquen que l'apoptosi del mutant *selD^{ptuf}* induïda per l'acumulació de radicals lliures és, en la seva majoria, dependent de caspases.

3. A part de la selenoproteïna Sps2, *Drosophila* presenta almenys dues altres selenoproteïnes: dselG i dselM. Aquestes proteïnes tenen una expressió ubiqua.

REFERÈNCIES

A

Adams, M. D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.

Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., and Yazaki, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* **100**, 1813-21.

Alsina, B., Serras, F., Baguñà, J., and Corominas, M. (1998). patufet, the gene encoding the *Drosophila melanogaster* homologue of selenophosphate synthetase, is involved in imaginal disc morphogenesis. *Mol Gen Genet* **257**, 113-23.

Alsina, B., Corominas, M., Berry, M. J., Baguñà, J., and Serras, F. (1999). Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* **112**, 2875-84.

Alsina i Español, B. (1999). "Caracterització i anàlisi funcional del gen patufet de *Drosophila melanogaster*." Universitat de Barcelona, Departament de Genètica, Barcelona.

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3203-7.

Axley, M. J., Bock, A., and Stadtman, T. C. (1991). Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8450-4.

B

Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., and Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 217-21.

Baeg, G.-H., and Perrimon, N. (2000). Functional binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila*. *Current opinion in Cell Biology* , 575-580.

Baggiolini, M., Boulay, F., Badwey, J. A., and Curnutte, J. T. (1993). Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *Faseb J* **7**, 1004-10.

Baker, N. E., and Yu, S. Y. (2001). The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **104**, 699-708.

Basler, K., Christen, B., and Hafen, E. (1991). Ligand-independent activation of the sevenless receptor tyrosine kinase changes the fate of cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **64**, 1069-81.

Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-81.

Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K., and Steller, H. (1998). The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell* **95**, 331-41.

Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z., and Steller, H. (2002). Regulation of cell number by

MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* **2**, 159-70.

Berry, M. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W., and Larsen, P. R. (1991). Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* **266**, 14155-8.

Bhat, N. R., and Zhang, P. (1999). Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem* **72**, 112-9.

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., and et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the Drosophila genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* **3**, 1273-87.

Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., and Baron, C. (1991a). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* **16**, 463-7.

Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., and Zinoni, F. (1991b). Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* **5**, 515-20.

Brand, A., Gil, S., Seger, R., and Yavin, E. (2001). Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H₂O₂-induced apoptotic cell death via ERK activation. *J Neurochem* **76**, 910-8.

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

Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M., and Abrams, J. M. (2000). Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* **101**, 103-13.

Bruinsma, J. J., Jirakulaporn, T., Muslin, A. J., and Kornfeld, K. (2002). Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling. *Dev Cell* **2**, 567-78.

Burns, T. F., and El-Deiry, W. S. (1999). The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol* **181**, 231-9.

Buttke, T. M., and Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.

Buschmann, T., Yin, Z., Bhoumik, A., and Ronai, Z. (2000). Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem* **275**, 16590-6.

C

Carmel-Harel, O., and Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**, 439-61.

Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Driscoll, D. M. (2000). A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *Embo J* **19**, 306-14.

D

Diaz-Benjumea, F. J., and Hafen, E. (1994). The sevenless signalling cassette mediates Drosophila

EGF receptor function during epidermal development. *Development* **120**, 569-78.

Dickson, B. J., van der Straten, A., Dominguez, M., and Hafen, E. (1996). Mutations Modulating Raf signaling in Drosophila eye development. *Genetics* **142**, 163-71.

Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J. R., Hay, B. A., and Kumar, S. (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in Drosophila melanogaster cells. *J Cell Biol* **156**, 1089-98.

Drane, P., Bravard, A., Bouvard, V., and May, E. (2001). Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* **20**, 430-9.

Driscoll, D. M., and Copeland, P. R. (2003). Mechanism and Regulation of Selenoprotein Synthesis. *Annu Rev Nutr* **8**, 8.

F

Falconer, D.S. (1989). Introduction to quantitative genetics. 3rd Edition. Longman.

Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 248-53.

Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-47.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye. *Cell* **87**, 651-60.

G

Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of Drosophila. *Nat New Biol* **245**, 251-3.

Garcia-Bellido, A., and de Celis, J. F. (1992). Developmental genetics of the venation pattern of Drosophila. *Annu Rev Genet* **26**, 277-304.

Gladyshev, V. N., and Hatfield, D. L. (2000). Analysis of Selenocysteine-Containing Proteins. In "Current Protocols in Protein Science" (I. John Wiley & Sons, Ed.), pp. 3.8.1-3.8.18.

Gladyshev, V. N., and Kryukov, G. V. (2001). Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *Biofactors* **14**, 87-92.

Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartweg, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* **19**, 589-97.

Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.

Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death. *Genes Dev* **9**, 1694-708.

Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastelein, R. A., Bazan, J. F., and Zlotnik, A. (1996). Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15086-91.

Guyton, K. Z., Gorospe, M., Kensler, T. W., and Holbrook, N. J. (1996a). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res* **56**, 3480-5.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. (1996b). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* **271**, 4138-42.

H

Halfar, K., Rommel, C., Stocker, H., and Hafen, E. (2001). Ras controls growth, survival and differentiation in the Drosophila eye by different thresholds of MAP kinase activity. *Development* **128**, 1687-96.

Harman, D. (1957). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontology* **11**, 298-300.

Hatfield, D. L. (2001). "Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health." Kluwer, Boston.

Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* **22**, 3565-76.

Hirosawa-Takamori, M., Jackle, H., and Vorbruggen, G. (2000). The class 2 selenophosphate synthetase gene of Drosophila contains a functional mammalian-type SECIS. *EMBO Rep* **1**, 441-6.

Holley, C. L., Olson, M. R., Colon-Ramos, D. A., and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat Cell Biol* **4**, 439-44.

Huang, R. P., Wu, J. X., Fan, Y., and Adamson, E. D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol* **133**, 211-20.

I

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. *Embo J* **21**, 3009-18.

Ikeyama, S., Kokkonen, G., Shack, S., Wang, X. T., and Holbrook, N. J. (2002). Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *Faseb J* **16**, 114-6.

Ingham, P. W. (2001). Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* **294**, 1879-1881.

Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**, 1649-52.

Ishikawa, Y., and Kitamura, M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* **58**, 1078-87.

J

Jacobson, M. D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**, 83-6.

Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H., and Thummel, C. S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol Cell* **5**, 445-55.

Jimenez, L. A., Zanella, C., Fung, H., Janssen, Y. M., Vacek, P., Charland, C., Goldberg, J., and Mossman, B. T. (1997). Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H₂O₂. *Am J Physiol* **273**, L1029-35.

Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A., and Finkel, T. (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11848-52.

K

Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., and Miura, M. (2002). Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J Biol Chem* **277**, 28372-5.

Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R., and Becker, K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **291**, 643-6.

Karim, F. D., Chang, H. C., Therrien, M., Wassarman, D. A., Laverty, T., and Rubin, G. M. (1996). A screen for genes that function downstream of Ras1 during *Drosophila* eye development. *Genetics* **143**, 315-29.

Kitamura, Y., Ota, T., Matsuoka, Y., Tooyama, I., Kimura, H., Shimohama, S., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J., and Taniguchi, T. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* **25**, 154-64.

Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., and Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* **15**, 5314-25.

Kryukov, G. V., Kryukov, V. M., and Gladyshev, V. N. (1999). New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* **274**, 33888-97.

Kurada, P., and White, K. (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell* **95**, 319-29.

L

Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., and Rhee, S. G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* **273**, 15366-72.

Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol, A. (1999). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* **274**, 38147-54.

Low, S. C., Harney, J. W., and Berry, M. J. (1995). Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* **270**, 21659-64.

Low, S. C., and Berry, M. J. (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **21**, 203-8.

M

Mann, R. K., and Beachy, P. A. (2000). Cholesterol modifications of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 188-202.

Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B., and Perrimon, N. (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-47.

Martindale, J. L., and Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**, 1-15.

Meier, P., Silke, J., Leever, S. J., and Evan, G. I. (2000). The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *Embo J* **19**, 598-611.

Meng, T. C., Fukada, T., and Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* **9**, 387-99.

Miller, D. T., and Cagan, R. L. (1998). Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* **125**, 2327-35.

Missirlis, F., Phillips, J. P., and Jackle, H. (2001). Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 1272-7.

Morata, G., and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* **42**, 211-21.

Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* **12**, 1263-8.

N

Nordstrom, W., Chen, P., Steller, H., and Abrams, J. M. (1996). Activation of the reaper gene during ectopic cell killing in *Drosophila*. *Dev Biol* **180**, 213-26.

Nybakken, K., and Perrimon, N. (2002a). Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 280-91.

Nybakken, K., and Perrimon, N. (2002b). Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 503-11.

O

Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179-91.

P

Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P., and Boulianne, G. L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-4.

Pennisi, E. (1997). Superoxides relay Ras protein's oncogenic message. *Science* **275**, 1567-8.

Persson, B. C., Bock, A., Jackle, H., and Vorbruggen, G. (1997). SelD homolog from *Drosophila*

lacking selenide-dependent monoselenophosphate synthetase activity. *J Mol Biol* **274**, 174-80.

Peterson, C., Carney, G. E., Taylor, B. J., and White, K. (2002). reaper is required for neuroblast apoptosis during Drosophila development. *Development* **129**, 1467-76.

Petrache, I., Choi, M. E., Otterbein, L. E., Chin, B. Y., Mantell, L. L., Horowitz, S., and Choi, A. M. (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *Am J Physiol* **277**, L589-95.

Peus, D., and Pittelkow, M. R. (2001). Reactive oxygen species as mediators of UVB-induced mitogen-activated protein kinase activation in keratinocytes. *Curr Probl Dermatol* **29**, 114-27.

Pietenpol, J. A., and Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* **181-182**, 475-81.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-5.

Prober, D. A., and Edgar, B. A. (2000). Ras1 promotes cellular growth in the Drosophila wing. *Cell* **100**, 435-46.

Pruitt, K., and Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* **171**, 1-10.

R

Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium in human health. *Lancet* **356**, 233-41.

Richardson, H., and Kumar, S. (2002). Death to flies: Drosophila as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods* **265**, 21-38.

Robinson, D. N., and Cooley, L. (1997). Examination of the function of two kelch proteins generated by stop codon suppression. *Development* **124**, 1405-17.

Roch, F., Serras, F., Cifuentes, F. J., Corominas, M., Alsina, B., Amorós, M., Lopez-Varea, A., Hernandez, R., Guerra, D., Cavicchi, S., Baguna, J., and Garcia-Bellido, A. (1998). Screening of larval/pupal P-element induced lethals on the second chromosome in Drosophila melanogaster: clonal analysis and morphology of imaginal discs. *Mol Gen Genet* **257**, 103-12.

Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-90.

Ryoo, H. D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., and Steller, H. (2002). Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nat Cell Biol* **4**, 432-8.

S

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* **78**, 963-72.

Sawamoto, K., Taguchi, A., Hirota, Y., Yamada, C., Jin, M. H., and Okano, H. (1998). Argos induces programmed cell death in the developing Drosophila eye by inhibition of the Ras pathway. *Cell Death Differ* **5**, 262-70.

Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kirihara, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B., and Ledbetter, J. A. (1994). ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV-

and H₂O₂-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem* **269**, 20718-26.

Schmidt, H. H., and Walter, U. (1994). NO at work. *Cell* **78**, 919-25.

Schuler, M., and Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**, 684-8.

Schweitzer, R., and Shilo, B. Z. (1997). A thousand and one roles for the Drosophila EGF receptor. *Trends Genet* **13**, 191-6.

Selleck, S. B. (2000). Proteoglycans and pattern formation, sugar biochemistry meets developmental genetics. *TIG* **15**, 206-212.

Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Laverty, T. R., and Rubin, G. M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-16.

Simon, H. U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**, 415-418.

Sionov, R. V., and Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145-57.

Stadtman, T. C. (1996). Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* **65**, 83-100.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.

T

Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-28.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6.

Tormay, P., Sawers, A., and Bock, A. (1996). Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol. Microbiol.* **21**, 1253-9.

Torok, T., Tick, G., Alvarado, M., and Kiss, I. (1993). P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of Drosophila melanogaster: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* **135**, 71-80.

V

Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R., and Abrams, J. M. (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in Drosophila. *J Cell Biol* **144**, 701-10.

Vernooy, S. Y., Copeland, J., Ghaboosi, N., Griffin, E. E., Yoo, S. J., and Hay, B. A. (2000). Cell death regulation in Drosophila: conservation of mechanism and unique insights. *J Cell Biol* **150**, F69-76.

W

Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., and Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* **333**, 291-300.

Wang, S. L., Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Muller, H. A., and Hay, B. A. (1999). The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* **98**, 453-63.

Wei, Y. H., and Lee, H. C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 671-82.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in Drosophila. *Science* **264**, 677-83.

Wolpert, L. (2001). "Principles of Development." Oxford University Press.

Wu, J. W., Cocina, A. E., Chai, J., Hay, B. A., and Shi, Y. (2001). Structural analysis of a functional DIAP1 fragment bound to grim and hid peptides. *Mol Cell* **8**, 95-104.

X

Xu, T., and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-37.

Y

Yeh, E., Gustafson, K., and Boulianne, G.L. (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7036-40.

Yin, Y., Terauchi, Y., Solomon, G. G., Aizawa, S., Rangarajan, P. N., Yazaki, Y., Kadowaki, T., and Barrett, J. C. (1998). Involvement of p85 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress. *Nature* **391**, 707-10.

Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Muller, H. A., and Hay, B. A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* **4**, 416-24.

Z

Zanella, C. L., Posada, J., Tritton, T. R., and Mossman, B. T. (1996). Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* **56**, 5334-8.

Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-9.

Zhou, X., Park, S.I., Moustafa, M.E., Carlson, B.A., Crain, P.F., Diamond, A.M., Hatfield, D.L., and Lee, B.J. (1999). Selenium metabolism in Drosophila. Characterization of the selenocysteine tRNA population. *J. Biol. Chem.* **274**, 18729-34.

