

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL

**Selenoproteïnes i estrès oxidatiu a *Drosophila*:
regulació negativa de la via Ras/MAPK
i activació de l'apoptosi**

Marta Morey i Ramonell
Barcelona, Maig 2003

Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques
Programa de Doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Bienni 1999-2001

**Selenoproteïnes i estrès oxidatiu a *Drosophila*:
regulació negativa de la via Ras/MAPK
i activació de l'apoptosi**

Memòria presentada per

Marta Morey i Ramonell

Per optar al grau de

Doctor en Biologia

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Montserrat Corominas i Guiu i el Dr. Florenci Serras i Rigalt al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Els directors,

L'autora,

Dra. M. Corominas
i Guiu

Dr. F. Serras
i Rigalt

Marta Morey
i Ramonell

Barcelona, Maig 2003

PREFACI	1
INTRODUCCIÓ	3
Part I EL PROBLEMA BIOLÒGIC	3
1. Selenoproteïnes	3
1.1 Que són?	3
1.2 Biosíntesi	3
1.3 Identificació	5
1.4 Funció	6
2. Els radicals lliures	7
2.1 Que són?	7
2.2 Com es generen?	7
2.3 Toxicitat	8
2.4 Mecanismes de control	9
3. El balanç redox cel·lular i l'estrès oxidatiu	10
3.1 El balanç redox cel·lular: la hipòtesi de l'envelliment causat pels radicals lliures	10
3.2 Estrès oxidatiu puntual: funcions fisiològiques	10
3.3 Estrès oxidatiu patològic: mecanismes de resposta	11
Part II EL MODEL D'ESTUDI	14
1. <i>Drosophila melanogaster</i>: model d'estudi del problema biològic	14
2. El mutant <i>patufet</i>: <i>seld</i>^{ptuf}	15
2.1 Identificació	15
2.2 Caracterització molecular	17
2.3 Caracterització fenotípica	18
3. Interès de la mutació <i>seld</i>^{ptuf}	18
4. Maquinària de biosíntesi i selenoproteïnes a <i>Drosophila</i>	19
COROL·LARI	20
OBJECTIUS	21
RESULTATS	23
Introducció als resultats	23

Capítol I: L'increment de ROS degut a una reducció en la funció antioxidant de les selenoproteïnes modula la via de senyalització Ras/MAPK 25

Article 1: Morey, M., Serras, F., Baguñà, J., Hafen, E. and Corominas, M. (2001). Modulation of the Ras/MAPK signalling pathway by the redox function of selenoproteins in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 2001 Oct 1;238(1):145-56. 25

- *La via Ras/MAPK: funcions a l'ull i a l'ala de Drosophila* 25

- Precedents 27

- Resum 27

- Article 29

Article 2: Morey, M., Serras, F. and Corominas, M. (2003). Halving the selenophosphate synthetase gene dose confers hypersensitivity to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*. 2003 Jan 16;534(1-3):111-4. 41

- Precedents 41

- Resum 41

- Article 43

- Annex: Protocols genètics 47

Protocol d'escissió de l'element P i generació de línies isogèniques. 47

Protocol d'encreuaments dissenyats per tal de dur a terme l'anàlisi de l'efecte de l'expressió ectòpica del gen selD en motoneurons. 49

Capítol II: L'acumulació de ROS degut a una reducció en la funció antioxidant de les selenoproteïnes induïx apoptosi a través de la via Dmp53/Rpr. 53

Article 3: Morey, M., Corominas, M. and Serras, F. DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of selenoprotein function in *Drosophila*. Enviat a *J. Cell Sci*. 53

- *L'apoptosi a Drosophila* 53

- Precedents 55

- Resum 55

- Article 57

Capítol III: Identificació *in silico* i verificació *in vivo* de selenoproteïnes a *Drosophila* 81

Article 4: Castellano, S., Morozova, N., Morey, M., Berry, M.J., Serras, F., Corominas, M. and Guigó R. (2001). In silico identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *EMBO Rep*. 2001 Aug;2(8):697-702. 81

- Precedents 81

- Resum 81

- Aportació personal al treball realitzat 81

- Article i Material Suplementari 83

DISCUSSIÓ	93
1. La mutació <i>selD^{ptuf}</i> genera una situació d'estrès oxidatiu	93
2. Importància de les selenoproteïnes de <i>Drosophila</i> en el control de ROS	94
3. L'increment de ROS modula negativament la via Ras/MAPK	96
4. L'increment de ROS activa l'apoptosi a través de la via Dmp53/Rpr	102
5. Una visió integrada: defectes en proliferació i activació de l'apoptosi en el mutant <i>selD^{ptuf}</i>	103
CONCLUSIONS	107
REFERÈNCIES	109

Part I EL PROBLEMA BIOLÒGIC

En aquesta primera part es presenten les selenoproteïnes. Les peculiaritats d'aquestes proteïnes fan necessària l'explicació de la seva biosíntesi, identificació i funció. A més, per tal de recalcar la importància de la funció antioxidant de les selenoproteïnes, es tracta la temàtica dels radicals lliures, el balanç redox cel·lular i els efectes de l'estrès oxidatiu.

1. Selenoproteïnes

1.1 Que són?

Les selenoproteïnes són un grup de proteïnes que es caracteritzen per la presència de seleni (Se) en forma de selenocisteïna (Sec): l'aminoàcid 21 (Bock *et al.*, 1991a; 1991b). En relació al fet d'incorporar dit aminoàcid, l'mRNA de les selenoproteïnes (Fig. 1) té dues propietats fonamentals que permeten la identificació d'una selenoproteïna com a tal:

- la presència d'un o més codons UGA en pauta de lectura oberta en la seva regió codificant, on s'incorpora l'aminoàcid Sec.
- un estructura secundària en forma d'*hairpin*.

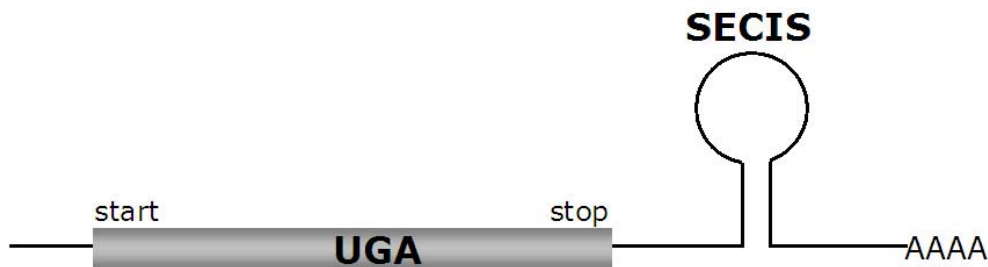


Fig. 1. Esquema de l'mRNA d'una selenoproteïna eucariota.

Les selenoproteïnes han estat identificades a procariotes i eucariotes (Low i Berry, 1996). Si bé els treballs inicials que van descobrir la biosíntesi i funció de les selenoproteïnes es van dur a terme en bacteris, l'interès de les mateixes ha propiciat que, actualment, el major volum de nova informació en el camp provingui del seu estudi en eucariotes.

1.2 Biosíntesi

La biosíntesi de selenoproteïnes es pot dividir en dos passos:

- a) síntesi de l'aminoàcid selenocisteïna.
- b) incorporació de l'aminoàcid a la selenoproteïna.

a) Síntesi de l'aminoàcid selenocisteïna

A diferència dels altres 20 aminoàcids, la Sec es sintetitza sobre el seu tRNA específic. Estudis genètics i bioquímics duts a terme en *Escherichia coli* van identificar tres gens essencials per la síntesi de dit aminoàcid:

- *selA*: codifica per l'enzim selenocisteïna sintasa.
- *selC*: codifica pel tRNA específic de selenocisteïna (tRNA^{Sec}).
- *selD*: codifica per l'enzim selenofosfat sintetasa.

Malgrat encara no s'ha trobat l'homòleg del gen *selA* a eucariotes, s'han identificat homòlegs dels gens *selC* i *selD*. Això fa pensar que la mecànica d'aquest procés a eucariotes, si bé no idèntica, deu ser molt semblant a la dels procariotes (Bock *et al.*, 1991b). Els homòlegs del gen *selD* a eucariotes són dos: selenofosfat sintetasa 1 (*Sps1*) i selenofosfat sintetasa 2 (*Sps2*). *Sps2* és en si mateixa una selenoproteïna, el que suggereix que estaria involucrada en la regulació de la seva pròpia síntesi (Guimaraes *et al.*, 1996).

La proposta actual pel que fa a la síntesi de Sec en eucariotes és la següent (Fig. 2). El tRNA^{Sec} és aminoacilat amb una serina (ser-tRNA^{Sec}) que servirà com a esquelet de carboni per la Sec. D'altra banda, l'enzim selenofosfat sintetasa és responsable de la síntesi del monoselenofosfat, el donador de Se, a partir del selenit. Per acabar, molt probablement una activitat selenocisteïna sintasa, incorpora el donador de seleni al ser-tRNA^{Sec} i s'obté l'aminoàcid Sec ja carregat sobre el tRNA: Sec-tRNA^{Sec} (Stadman, 1996; Driscoll i Copeland, 2003).

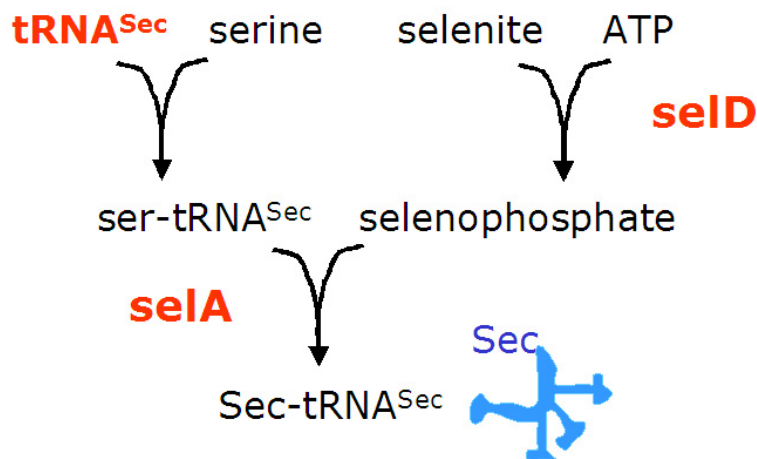


Fig. 2. Síntesi de l'aminoàcid selenocisteïna (Sec).

b) Incorporació de l'aminoàcid a la selenoproteïna

L'aminoàcid Sec és incorporat co-traduccionalment en el codó UGA present en la pauta de lectura oberta de la selenoproteïna. El fet que aquest codó tingui una funció dual com a codó d'*stop* i com a codó per Sec implica que la cèl·lula ha de tenir mecanismes per diferenciar entre les dues situacions. Els elements imprescindibles per al reconeixement del codó UGA com a codificant per Sec i per la incorporació de Sec a la cadena polipeptídica van ser primerament identificats a procariotes:

- l'element SECIS (Sec insertion sequence) és l'estructura secundària en forma de *hairpin* i es forma dins la regió codificant just després del codó UGA
- el gen *selB* codifica pel factor d'elongació específic de Sec

En el cas d'eucariotes, l'element SECIS és troba a la regió 3' no traduïda de l'mRNA de les selenoproteïnes. Degut a aquest posicionament del SECIS, per tal d'acoblar els

processos de reconeixement del codó UGA com a lloc d'inserció de Sec i de traducció, es requereix la proteïna SBP2 (SECIS binding protein 2, Copeland *et al.*, 2000). Dita proteïna interacciona amb el SECIS i els ribosomes. El factor d'elongació específic de Sec (EFsec, homòleg del gen *selB*, Fagegaltier *et al.*, 2000) també interacciona amb la proteïna SBP2, alhora que recluta Sec-tRNA^{Sec} i incorpora l'aminoàcid a la cadena polipeptídica de la selenoproteïna.

Si bé es sap de la formació del complex ribosoma-SBP2-EFsec-Sec tRNA^{Sec} associat al SECIS encara hi ha moltes incògnites sobre com es constitueix aquest complex i la mecànica de com es du a terme el reconeixement del codó UGA com a lloc d'inserció de Sec. Sigui com sigui, en última instància es produirà un plegament de l'mRNA per tal d'acostar el SECIS al lloc d'inserció de Sec (Fig.3). S'ha postulat que dit plegament i el complex proteic format al voltant del SECIS evitarien l'entrada dels factors de terminació de la traducció permetent la incorporació de Sec i la continuació de la transcripció (Driscoll i Copeland, 2003).

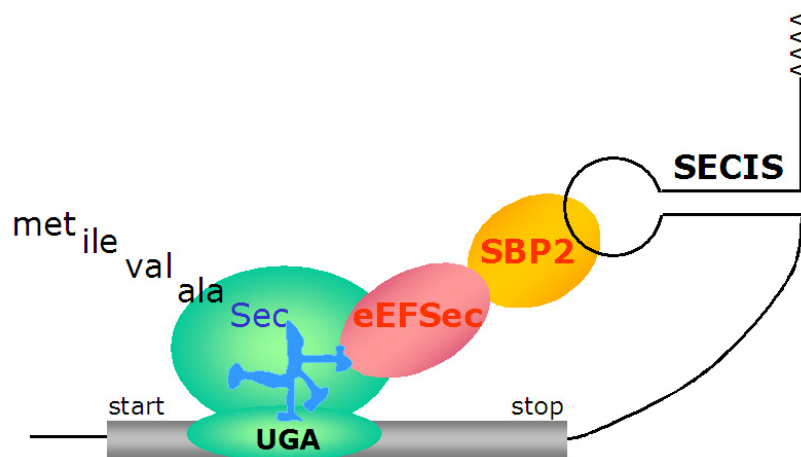


Fig. 3. Incorporació cotraduccional de l'aminoàcid Sec.

1.3 Identificació

A part de la presència del codó UGA en pauta de lectura i el SECIS, les selenoproteïnes no tenen cap motiu específic d'estructura 1ària, 2ària, 3ària o 4ària que permeti la identificació de totes elles. Es a dir, la identificació d'una determinada selenoproteïna no serveix per identificar-ne d'altres.

Un dels mètodes que s'han aplicat per tal d'identificar i caracteritzar selenoproteïnes es basa en les propietats del Se i els seus isòtops. La incorporació de ⁷⁵Se en una proteïna pot detectar-se en córrer un extracte proteic en un gel de poliacrilamida i exposar-l'ho. Quan s'ha aïllat una putativa selenoproteïna i es sintetitza en presència de ⁷⁷Se, es pot realitzar l'anàlisi de la mateixa per tècniques més sofisticades com diferents tipus d'espectroscopies i així obtenir informació estructural, mecànica i funcional sobre la selenoproteïna aïllada (Glagyshev i Hatfield, 2002). Una altra manera d'identificar selenoproteïnes sense la necessitat de conèixer la seva seqüència és mitjançant l'anàlisi computacional d'ESTs per trobar-hi la presència d'elements SECIS. Un cop s'ha identificat el cDNA candidat s'ha de

corroborar, pels mètodes anteriorment descrits, que codifica per una selenoproteïna (Kryukov *et al.*, 1999; Lescure *et al.*, 1999).

Les tècniques esmentades sols permeten la identificació de part de les selenoproteïnes: les expresades a nivells detectables i les presents en els bancs d'ESTs. La seqüenciació de genomes ha obert les portes al disseny d'eines bioinformàtiques per intentar identificar totes les selenoproteïnes presents en un determinat organisme.

1.4 Funció

El fet de que existeixi una maquinària tan complexa, i alhora tan específica i exclusiva per a la síntesi de selenoproteïnes, fa pensar que la seva funció no és trivial.

Les selenoproteïnes procarïotes estan involucrades en processos catabòlics i en la utilització del Se per catalitzar diverses reaccions redox (Stadman, 1996). Fins al moment s'han identificat 19 famílies de selenoproteïnes a eucariotes (Fig. 4., S. Castellano i R. Guigó, comunicació personal). De moltes encara no s'han realitzat estudis que desvelin la seva funció, però les caracteritzades funcionalment, al contrari que les procarïotes, participen en reaccions anabòliques d'oxido-reducció i funcionen com antioxidants. Es a dir, participen en el control del balanç redox cel·lular evitant els possibles efectes danyins que una alteració del mateix pot causar (Gladyshev i Kryukov, 2001).



Fig. 4. Selenoproteïnes identificades a eucariotes (imatge cedida per S. Castellano).

L'enzim glutatió peroxidasa (GPx) va ser la primera selenoproteïna identificada com a tal en els eucariotes (Rotruck *et al.*, 1973). Dos membres de la família GPx protegeixen les cèl·lules del dany causat per la peroxidació, reduint el peròxid d'hidrògen (H₂O₂) i els hidroperòxids. Un altre membre de la família redueix els hidroperòxids de fosfolípids, colesterol i esters de colesterol, protegint així a les cèl·lules de la peroxidació lipídica de les membranes. La tioredoxin reductasa (Trx) és una selenoproteïna també important en la detoxificació del H₂O₂. Tres membres d'aquesta família controlen l'estat redox cel·lular reduint la tioredoxina i altres substrats. Finalment, una altra família de proteïnes oxidoreductases, les deiodinases, són selenoproteïnes involucrades en el metabolisme de les hormones tiroidees (Hatfield, 2001).

Cal destacar que en les 19 famílies de selenoproteïnes identificades, es troben ortòlegs que tenen cisteïna (Cys) en lloc de Sec. Aquest mateix fenomen es dona també dins una mateixa espècie, doncs també es troben paràlegs de selenoproteïnes amb Cys. Estructuralment, l'aminoàcid Sec és idèntic a l'aminoàcid Cys a excepció de que conté Se en lloc de sofre. Tanmateix, la Sec té una avantatge funcional perquè el seu grup selenol és més reactiu que el grup tiol de la Cys. Estudis funcionals han mostrat que l'activitat catalítica de les selenoproteïnes és més gran que la que s'obté en substituir la Sec per una Cys (Axley *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1991).

2. Els radicals lliures*

2.1 Que són?

Els radicals lliures són espècies químiques que es caracteritzen per tenir electrons desaparellats a la seva superfície. Precisament això fa que siguin altament reactius i inestables, amb la qual cosa la seva vida mitja també és molt curta dificultant la seva detecció. En l'intent de guanyar estabilitat "roben" un electró a la molècula estable que tinguin més propera. Quan la molècula "atacada" perd un electró queda oxidada, i ella mateixa esdevé un radical lliure, engenant una cascada que si no es controla pot matar a la pròpia cèl·lula. A la vegada, les cèl·lules veïnes també es poden veure afectades pels radicals lliures iniciadors ja que són molècules petites i amb capacitat de difondre a través de les membranes lipídiques.

2.2 Com es generen?

Entre els radicals lliures, els més abundants a la cèl·lula són els derivats de l'oxigen (O_2). La constant generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) és la conseqüència del metabolisme aeròbic, que utilitza l' O_2 com acceptor final d'electrons durant la producció d'energia (l'ATP). Així doncs, la principal font de ROS és la cadena respiratòria mitocondrial. El transport d'electrons entre els diferents complexos enzimàtics de la cadena respiratòria permet la creació d'un gradient de protons necessari per la síntesi de l'ATP. Durant aquest procés, alguns electrons (e^-) s'extravien, s'associen amb les molècules d' O_2 i es genera el radical superòxid (O_2^-) (Fig. 5.). A partir d'aquí es generaran un seguit d'altres ROS (Fig. 6). En sí, el radical O_2^- no és el més tòxic, de fet, la seva importància radica en que és la font majoritària del peròxid d'hidrogen (H_2O_2). El H_2O_2 no és un radical lliure però és un agent oxidant, i a més, a partir d'ell es genera el radical més tòxic: l'hidroxil ($\cdot OH$). Altres ROS presents a la cèl·lula i generats com a conseqüència d'aquests primers o durant altres processos són: el singlet d'oxigen (1O_2), el radical peroxil ($ROO\cdot$), l'òxid nítric ($NO\cdot$), el peròxid nítric ($ONOO^-$) i l'àcid hipocloric ($HOCl$).

* La informació d'aquest apartat s'ha extret de les següents pàgines web:
<http://www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/antioxidants/index.htm>
<http://www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/freeradicals/index.htm>
http://www.rndsystems.com/asp/g_sitebuilder.asp?bodyId=222
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/ROS.html>
<http://www.sumeria.net/oxy/reactive.html>

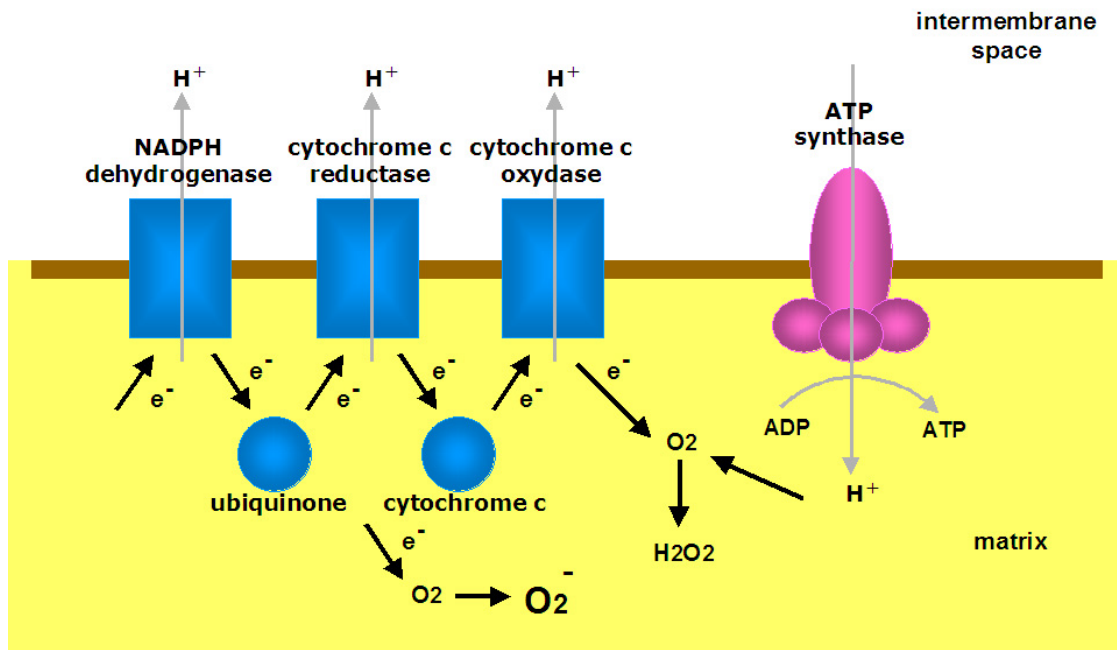


Fig. 5. Transport d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial i generació del radical superòxid.

Altres fonts minoritàries i puntuals de ROS són l'autoxidació de molècules com l'hemoglobina, catecolamines i la mioglobina que generen radicals O_2^- ; sistemes enzimàtics com la xantina oxidasa, prostaglandina sintasa, la lipooxigenasa, l'aldehid oxidasa, l'òxid nítric sintasa, la NADPH oxidasa i la mieloperoxidasa, i finalment, l'oxidació de metalls com el ferro i el coure, que generen radicals $\cdot OH$.

La generació de radicals lliures també pot ser deguda a causes exògenes. De manera directa, hi ha substàncies, com per exemple certs antibiòtics, drogues antineoplàsiques i pesticides, que en sí mateixes tenen activitat pro-oxidant. La inhalació de partícules inorgàniques com asbests, sílica o quarç està associada a la generació de radicals lliures. També hi ha situacions que de manera indirecta són font de radicals lliures. Un cas és la radiació ionitzant, que a part de causar lesions en el DNA, genera radicals lliures en incidir sobre les molècules d'aigua (H_2O).

2.3 Toxicitat

L'oxidació de biomolècules per part dels radical lliures té conseqüències importants. Els radicals lliures peroxiden els lípids, cosa que desestructura les membranes cel·lulars i a la llarga pot comprometre la seva funcionalitat. També ataquen les proteïnes alterant la seva conformació i/o activitat catalítica, el que desemboca en un efecte més o menys perjudicial, depenent de la funció de dita proteïna. En el cas dels àcids nucleics, poden generar talls en la seva cadena i modificacions de les bases nitrogenades. Especialment en el cas del DNA, el fet que aquestes lesions puguin ser transmises a altres cèl·lules si la portadora es divideix, fa que els radical lliures es considerin com a mutagens.

2.4 Mecanismes de control

Per combatre la constant amenaça dels radicals lliures i els seus efectes oxidatius sobre les biomolècules cel·lulars, les cèl·lules han desenvolupat sistemes antioxidants que es poden classificar en dues categories: enzimàtics i no enzimàtics.

Entre els sistemes de defensa enzimàtics els més importants són:

- la família superòxid dismutasa (SOD), que catalitza la conversió de O_2^- a H_2O_2 . S'han identificat tres SOD: una citoplasmàtica (Cu-ZnSOD), una mitocondrial (MnSOD) i una altra extracel·lular (CuSOD).
- l'enzim catalasa (Cat), que catalitza la conversió del H_2O_2 a H_2O i O_2 .
- entre les selenoproteïnes, l'enzim glutatió peroxidasa (GPX), que catalitza la conversió del H_2O_2 a H_2O , oxidant el cosubstrat glutatió (GSH). L'enzim glutatió reductasa (GR) s'encarrega de reduir el GSH oxidat per tal de reciclar-l'ho.
- la família de les peroxiredoxines (Prx) elimina peròxids amb l'ajuda de la tioredoxina (Trx), substrat de la selenoproteïna tioredoxin reductasa (TrxR).

Cal esmentar que els sistemes SOD, Cat i GPX estan finament regulats entre ells. A més de la funció descrita, la GPX també combat l'acció dels radicals lliures sobre les altres molècules, especialment la peroxidació de lípids.

Els sistemes de defensa no enzimàtics intracel·lulars inclouen: la proteïna GSH, que apart de ser cosubstrat de la GPX, elimina $l\cdot OH$ i el 1O_2 ; l'àcid úric elimina $l\cdot OH$, el $ROO\cdot$ i el 1O_2 ; el coenzim Q10, el retinol i l'àcid retinoic funcionen també com antioxidants. Igualment, s'ha demostrat que proteïnes del plasma sanguini com l'albumina, la transferrina i la ceruloplasmina tenen també funció antioxidant.

A més a més, obtinguts a través de la dieta, els beta-carotenoids, precursors de la vitamina A, i les vitamines C i E també tenen importants funcions antioxidants eliminant radicals lliures i combatent la peroxidació lipídica. Tots plegats, aquests sistemes contribueixen a minimitzar els nivells de radicals lliures i el seus efectes nocius.

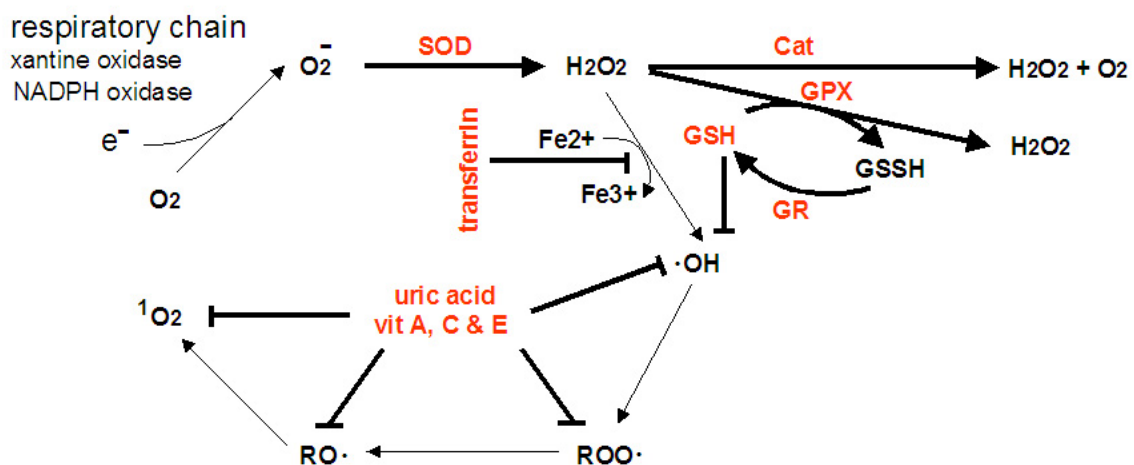


Fig. 6. Acció conjunta dels sistemes antioxidants (adaptat de Jacobson, 1996).

3. El balanç redox cel·lular i l'estrès oxidatiu

La generació de radicals lliures i la seva eliminació controla l'estat redox cel·lular, el qual ve determinat pel balanç entre les molècules oxidades i reduïdes de la cèl·lula. Com els sistemes antioxidants acabats d'esmentar no són totalment efectius, sempre hi ha una certa concentració basal de radicals lliures a la cèl·lula. Així doncs, en condicions normals, en el balanç redox cel·lular l'oxidació ja predomina lleugerament sobre la reducció. Si bé els nivells basals de radicals lliures no comprometen la viabilitat cel·lular a curt termini, s'ha proposat que els seus efectes al llarg del temps podrien ser uns dels responsables del procés de l'envelliment.

Un increment de radicals lliures que sobrepassa la concentració basal dels mateixos desequilibra el balanç redox cel·lular, de manera que l'oxidació de biomolècules s'intensifica i es genera una situació d'estrès oxidatiu. Increments puntuals de radicals lliures, controlats i generats per la pròpia cèl·lula, tenen funcions fisiològiques importants. Ara bé, front situacions patològiques, quan la cèl·lula es veu sotmesa a un increment sostingut de radicals lliures o a elevades concentracions dels mateixos, s'activen mecanismes de resposta a l'estrès oxidatiu.

3.1 El balanç redox cel·lular: la teoria de l'envelliment causat pels radicals lliures

Aquesta teoria suggereix que els radicals lliures són els agents causals de l'envelliment (Harman, 1956). La concentració basal de radicals lliures presents en condicions normals causaria un dany mínim dia a dia, però al llarg del temps l'efecte acumulatiu de les lesions generades seria el responsable de la senescència cel·lular. En aquest sentit, s'ha observat que cèl·lules i organismes senescents presenten un elevat nombre de lesions causades per radicals lliures al DNA (Beckman i Ames, 1998). El DNA mitocondrial és més sensible que el nuclear, possiblement degut a la seva proximitat a la font generadora de radicals lliures (la cadena respiratòria mitocondrial) i a que el sistema de reparació del DNA mitocondrial és limitat. De fet, s'han trobat reordenaments en el DNA de mitocondris sotmesos a radicals lliures, el que inevitablement condueix a un mal funcionament de l'òrganul i compromet la seva integritat. Així, com la cadena respiratòria funciona cada cop pitjor, es generen més radicals lliures i es causa més dany al DNA, començant de nou el cercle viciós (Wei i Lee, 2002). A mida que les cèl·lules envelleixen es genera una situació d'estrès oxidatiu que pareix estar implicada en malalties associades a l'envelliment com l'ateroscleròsi, la diabetis, l'artritis i malalties neurodegeneratives (Finkel i Holbrook, 2002).

3.2 Estrès oxidatiu puntual: funcions fisiològiques

Malgrat el seu efecte tòxic els radicals lliures tenen varies funcions fisiològiques importants. Cal esmentar que els radicals lliures que duen a terme aquestes funcions són generats de manera activa i puntual per la pròpia cèl·lula. Una funció fisiològica important dels radicals lliures és la que duen a terme en el sistema immune. Les cèl·lules fagocítiques del sistema immune, un cop activades, generen ROS dins els lisosomes mitjançant els enzims NADPH oxidasa i mieloperoxidasa. D'aquesta manera podran matar els bacteris que fagociten quan el fagosoma es fusioni amb els lisosomes (Baggiolini *et al.*, 1993).

Hi ha evidències que suggereixen que els radicals lliures funcionen com a segons missatgers (Finkel, 1998). L'òxid nítric, sintetitzat per l'enzim òxid nítric sintasa (NOS) n'és un exemple. A part de les seves funcions fisiològiques directes: en el sistema immune, com a defensa contra agents patògens, i en el sistema nerviós, com a neurotransmissor modulant fenòmens de sinaptogènesi i plasticitat sinàptica, també funciona com a segon missatger. La seva síntesi en cèl·lules endotelials regula de la dilatació de les fibres musculars de bronquis i vasos sanguinis, activant la via del GMP cíclic (Arnold *et al.*, 1977; Schmidt i Walter, 1994).

Un altra exemple de l'acció dels radicals lliures com a segons missatgers és la seva contribució a la modulació de la funció mitogènica de la via de transducció del senyal Ras/MAPK (Fig. 7). S'ha descrit que l'activació de la via Ras/MAPK pel factor de creixement EGF (epidermal growth factor) a través del seu receptor, dóna lloc a un increment transitori de ROS (Bae *et al.*, 1997). Igualment l'activació permanent de Ras, genera ROS que tenen una funció important en la modulació de dita via. El nexse d'unió entre l'activació de la via i la generació dels radicals lliures és Rac, una proteïna efectora de Ras. Així doncs, un cop Rac és activada, aquesta forma un complex amb l'enzim NADPH oxidasa que genera els radicals lliures (Irani *et al.*, 1997). Estudis posteriors han demostrat que la generació transitoria d'aquest pols de ROS inhibeix les fosfatases, permetent que la cascada de fosforilacions activadores al llarg de la via transdueixi el senyal al nucli (Lee *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2002). La inhibició puntual de fosfatases pel pols de ROS permet regular el període de temps en que la via Ras/MAPK roman activa.

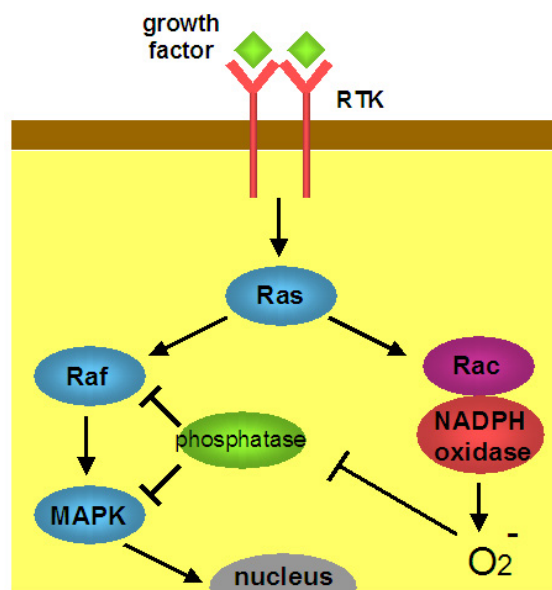


Fig. 7. Funció fisiològica dels radicals lliures sobre la via Ras/MAPK (adaptat de Pennisi, 1997).

3.3 Estrès oxidatiu patològic: mecanismes de resposta

Quan, de manera endògena o exògena, el nivell de radicals lliures és excessivament elevat o persistent, es dóna una resposta cel·lular. En front d'un estrès sever, la cèl·lula ha de decidir entre lluitar per la supervivència o condemnar-se a la mort pel bé de les altres cèl·lules. La supervivència dependrà de la capacitat de la cèl·lula per adaptar-se o resistir

l'estrès i de reparar o substituir les molècules danyades. Alternativament, la cèl·lula pot decidir entrar en apoptosi, un procés per qual les cèl·lules danyades són eliminades de l'organisme. L'efecte final de dita resposta dependrà de la magnitud del dany, el temps d'exposició i la quantitat de radicals lliures, i el tipus cel·lular. La resposta cel·lular es fa efectiva mitjançant l'activació d'una sèrie de vies de senyalització i/o mediadors centrals, que a part de tenir altres funcions, són capaces de d'activar-se en resposta a l'estrès oxidatiu (Martindale i Holbrook, 2002). Entre elles destaquen la via Ras/MAPK i la proteïna p53, ambdues àmpliament estudiades *in vitro* i en cultius cel·lulars.

La via Ras/MAPK

Nombroses evidències indiquen que l'estrès oxidatiu activa la via Ras/MAPK i que els receptors de factors del creixement com l'EGF i el PDGF (platelet derived growth factor), i el receptor de les cèl·lules T tenen una funció important en la mediació d'aquesta activació. S'ha mostrat que aquests receptors es fosforilen en situacions d'estrès oxidatiu generades per H₂O₂, asbests i radiació ultraviolada, i que interferències amb aquestes fosforilacions atenuen l'activació de la via en resposta a l'estrès oxidatiu (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Schieven *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Knebel *et al.*, 1996; Zanella *et al.*, 1996). Tanmateix, el mecanisme pel qual els radicals lliures activen la via Ras/MAPK no està del tot clar.

Per un costat, certs estudis han descrit que l'activació de la via Ras/MAPK per l'estrès oxidatiu està implicada en promoure la supervivència cel·lular (Guyton *et al.*, 1996a-b; Aikawa *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Ikeyama *et al.*, 2001; Peus i Pittelkow, 2001). D'altra banda, també s'ha descrit que l'activació de la via per estrès oxidatiu pot contribuir a l'apoptosi (Jimenez *et al.*, 1997; Bhat i Zhang, 1999; Petrache *et al.*, 1999; Ishikawa i Kitamura, 2000; Brand *et al.*, 2001). El que determina si l'activació de la via tindrà un efecte anti-apoptòtic o apoptòtic és una pregunta que resta per contestar. Possiblement té a veure amb la cinètica i duració de l'activació. De fet, mentre en els casos on l'activació de la via Ras/MAPK promou la supervivència la seva activació ocorre de manera ràpida i transitòria, en els casos on promou apoptosi l'activació és retardada i persistent.

La proteïna p53

Els radicals lliures causen lesions al DNA i la proteïna p53 és un sensor universal de dany al DNA. A més, com a factor de transcripció, regula l'expressió de gens involucrats en la parada del cicle cel·lular i/o l'apoptosi. D'aquesta manera, en el primer cas s'ofereix a la cèl·lula la possibilitat de reparar el dany o com a mínim evitar la seva transmissió a les cèl·lules filles, i en el segon cas, assegura l'eliminació de cèl·lules altament danyades. La decisió d'un o altre camí, dependrà de factors tals com: el tipus cel·lular, l'eficiència dels mecanismes de reparació del DNA, factors de creixement i supervivència i la intensitat de l'estrès entre d'altres (Burns i El Deiry, 1999; Sionov i Haupt, 1999).

La importància de p53 com a mediador de l'apoptosi causada per H₂O₂ està àmpliament documentada. La utilització de diferents aproximacions genètiques per modular l'activitat de p53 han demostrat que l'eliminació de la seva funció incrementa

la supervivència de cèl·lules tractades amb H₂O₂ (Yin *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Bushman *et al.*, 2000). A part de la transcripció de gens involucrats en l'apoptosi, una conseqüència important de l'activació de p53 per agents oxidants és incrementar encara més l'estrès oxidatiu a través del control transcripcional de determinats gens. Així, p53 activa la transcripció del gen PIG3, involucrat en la perpetuació de ROS, i reprimeix la transcripció de MnSOD, un enzim essencial en la detoxificació de ROS (Johnson *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1997; Drane *et al.*, 2001).

L'activació d'una d'aquestes i/o d'altres vies permetrà a les cèl·lules prendre la decisió més adequada pel conjunt de l'organisme en front d'una situació crítica d'estrès oxidatiu.

Part II EL MODEL D'ESTUDI

En la segona part de la Introducció es presenta el model d'estudi utilitzat en aquesta Tesi Doctoral: el mutant *selD^{ptuf}* de *Drosophila melanogaster*. En un primer apartat s'introdueix *Drosophila* i les característiques que la fan adient com a organisme model. Després es detalla la caracterització molecular i fenotípica del mutant *selD^{ptuf}*, duta a terme en el nostre grup i fruit d'una Tesi Doctoral anterior a aquesta (Alsina, 1999). Finalment, es ressalta l'interès d'aquest mutant.

1. *Drosophila melanogaster*: model d'estudi del problema biològic

El coneixement acumulat durant gaire bé 100 anys d'estudi, la facilitat per l'anàlisi genètica i les possibilitats tècniques existents a l'hora de manipular l'organisme, fan de *Drosophila melanogaster* un model d'estudi excel·lent en el camp del desenvolupament.

Altres característiques de *Drosophila* també han contribuït a la seva idoneïtat com a organisme model. És un insecte petit, fàcilment cultivable al laboratori i amb una alta capacitat reproductora. El seu cicle vital és molt curt i presenta una etapa larvària (larva I, II i III) i una adulta separades per un període pupal en el qual té lloc la metamorfosi. Durant aquest procés els discs imaginals, una mena sacs discoidals formats en els estadis de larva, evertexen per donar lloc a les estructures de l'adult (Fig. 8). Els discs imaginals ja es determinen durant l'embriogènesi a partir de cèl·lules precursors imaginals que més endavant invaginen per donar lloc al discs. Durant les primeres etapes larvàries, es donen processos de proliferació i formació de patró fent que els discs imaginals creixin i adoptin cadascun la seva forma específica. Durant la metamorfosi, els discs imaginals experimentaran processos de reorganització i diferenciació per tal de formar l'estructura cuticular corresponent a l'individu adult. Així doncs, els discs imaginals permeten l'estudi de diferents aspectes del desenvolupament.

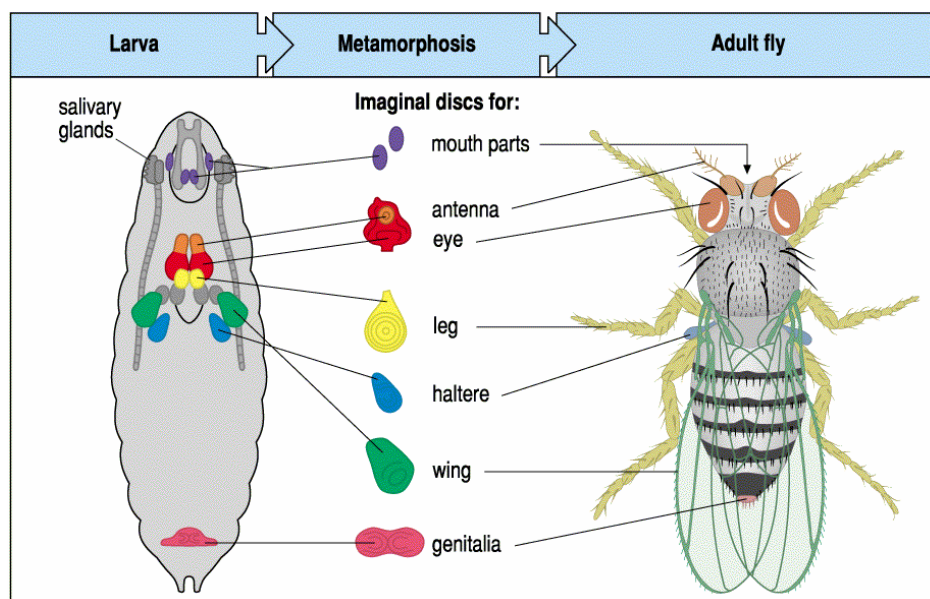


Fig. 8. Els discs imaginals donen lloc a les estructures de l'adult (Wolpert, 2001).

Una de les fites importants que ha potenciat l'ús de *Drosophila* en el camp de la Genètica i el Desenvolupament ha estat la possibilitat d'induir mutacions en el genoma i inferir la funció del gen mutat a partir del fenotip que s'observa. La Genètica permet descriure interaccions entre diferents gens segons diferents hipòtesis de treball. Per exemple: a) mutacions que produeixen un fenotip similar probablement identifiquen gens que participen en la mateixa via, ja sigui com a elements funcionals de la mateixa o moduladors indirectes; b) elements modificadors de mutacions que produeixen una activitat alterada, sigui reduïda o constitutiva, solen correspondre a gens que també participen en la mateixa via.

De les tècniques genètiques desenvolupades a *Drosophila*, una de les més importants és la generació de mosaics genètics (García-Bellido *et al.*, 1973; Xu i Rubin, 1993). Aquesta metodologia s'aplica en casos de mutacions letals recessives i permet estudiar l'efecte d'una mutació més enllà de la seva fase de letalitat, tan en discs imaginals com en l'organisme adult. Mitjançant la combinació de marcadors genètics i la inducció de recombinació mitòtica es poden generar clons de cèl·lules mutants distingibles de la resta de cèl·lules en un organisme viable. En un fons heterozigot per la mutació ($mut/+$) el procés de recombinació donarà lloc a un clon de cèl·lules mutants (mut/mut) i un clon de cèl·lules germanes normals per la mutació ($+/+$; *twin clone*). A més a més, l'ús de la tècnica *Minute* (Morata i Ripoll, 1975) permet eliminar el *twin clone* i donar avantatge proliferatiu al clon de cèl·lules mutants, fent possible un estudi més acurat de l'efecte de la mutació.

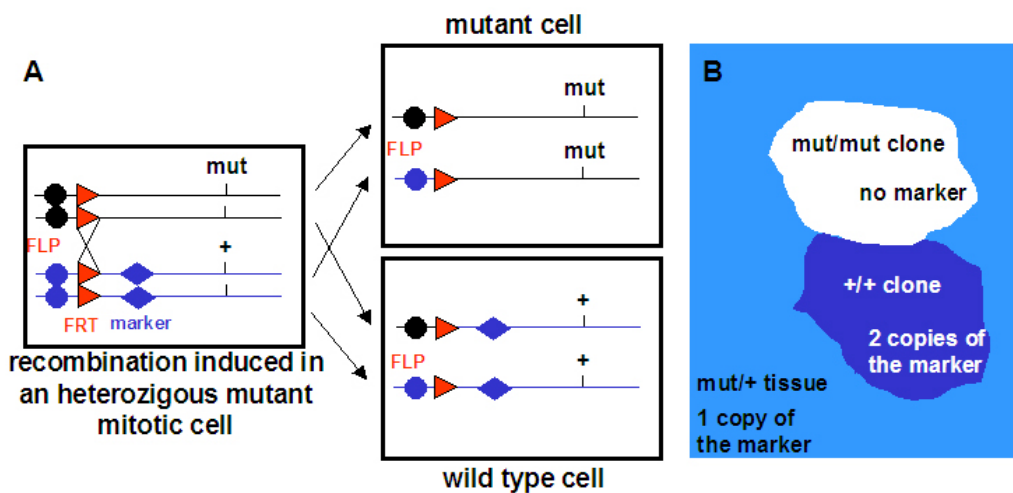


Fig. 9. A) Esquema de la recombinació mitòtica; B) Detecció del clon de cèl·lules mutants i del seu *twin clone* normal en un fons heterozigot per la mutació.

2. El mutant *patufet: seld^{ptuf}*

2.1 Identificació

La col·lecció de mutants del cromosoma II generats per la inserció del transposó *P-lacW* (Török *et al.*, 1993) es va utilitzar per identificar nous gens involucrats en els processos de proliferació i diferenciació cel·lular dels discs imaginals. El disseny de l'*screening* es

basava en cercar mutacions recessives que en homozigosi fossin letals a l'estadi de larva III (doncs és en aquest estadi on es veuran més reflectides alteracions en el processos acabats d'esmentar) i analitzar la morfologia dels discs imaginals. L'anàlisi de la mida i forma dels discs imaginals d'ala va permetre classificar els mutants en diferents categories: (i) sense discs o discs molt petits; (ii) discs petits però sense patró ni els plegaments característics; (iii) discs de mida normal però morfologia alterada, i (iv) discs amb sobrecreixement. Per tal d'intentar correlacionar aquests tipus de fenotips amb l'alteració de determinats paràmetres cel·lulars, es van mapar les insercions dels diferents elements *P* al genoma i es va procedir a l'estudi de l'efecte de dites mutacions en mosaics genètics a l'ala adulta (Roch *et al.*, 1998).

El mutant *l(2)k11320*, que mapa a la posició 50E del braç dret del cromosoma II, va ser un dels identificats dins el grup (i) sense discs o discs molt petits. La principal raó que va encoratjar al nostre grup a continuar l'estudi d'aquest mutant en concret, va ser els fenotips observats en clons de cèl·lules homozigotes a l'ala adulta (Fig. 10., Alsina *et al.*, 1998):

- a) els clons generats en un fons *Minute* són molt reduïts en mida i arrodonits, suggerint que les cèl·lules mutants tendeixen a minimitzar el contacte amb les seves veïnes. Probablement això explica el fet que tinguin una viabilitat reduïda, doncs els clons es troben en una baixa freqüència. L'estudi de clons "bessons" va corroborar aquest fet ja que el clon mutant era sempre molt més petit que el clon control.
- b) les cèl·lules dels clons també tenen una mida més petita que les cèl·lules del voltant. Donat que cada cèl·lula de l'ala desenvolupa un tricoma, la reducció en la mida cel·lular queda reflectida en la major densitat dels tricomes dins el clon.
- c) la majoria de clons que travessen una vena suprimeixen autònomament la seva diferenciació.
- d) a la vegada, quan el clon és proper a una vena, en alguns casos, es diferencia una vena ectòpica de manera no autònoma al costat del clon.
- e) també hi ha altres efectes no autòmons, com per exemple, canvi en la polaritat de les cèl·lules que envolten el clon, indicat per la diferent orientació dels tricomes.

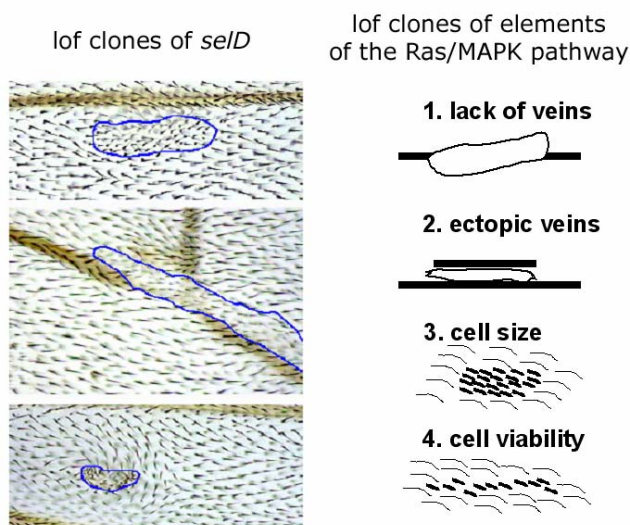


Fig.10. Semblança dels fenotips dels clons de pèrdua de funció de *selD* i elements de la via Ras/MAPK. Imatge dels clons *selD^{ptuf}* extreta d'Alsina *et al.*, 1998, i esquema modificat de Diaz-Benjumea i Hafén, 1994

Un dels atractius d'aquests fenotips radicava en la seva extraordinària semblança als fenotips descrits per mutacions de pèrdua de funció d'elements de la via de transducció del senyal Ras/MAPK (Fig. 10., Diaz-Benjumea i Hafen, 1994).

A causa del seu fenotip mutant de reducció de la mida dels discs imaginals, dels clons homozigots i de les cèl·lules d'aquests clons, el mutant *l(2)k11320* va rebre el nom de *patufet*. Per tal de saber quin era el gen afectat per la mutació *patufet* es va procedir a la seva caracterització molecular.

2.2 Caracterització molecular

El transposó *P-lacW* (Bier *et al.*, 1989), entre d'altres elements, conté seqüències plasmídiques que permeten el clonatge de les regions genòmiques flanquejants al mateix. La seqüenciació de dites regions genòmiques a partir d'encebadors específics del propi transposó va permetre identificar un possible gen afectat per la inserció del mateix. Posterior a l'*screening* d'una genoteca de cDNAs es va determinar l'estructura del gen identificat. L'element *P* estava inserit dins l'únic intró d'un gen a 116 parells de bases de la pauta de lectura oberta (Fig. 11). L'anàlisi de l'expressió d'aquest gen per *Northen blot* va demostrar que la mutació *patufet* és una mutació nul·la (Alsina *et al.*, 1998).

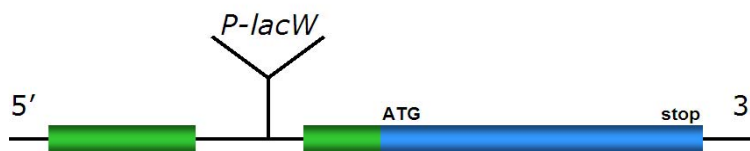


Fig.11. Lloc d'inserció de l'element *P-lacW* a la línia *l(2)k11320*.

La comparació de la seqüència nucleotídica i aminoacídica obtinguda amb els bancs de dades va mostrar que el gen identificat era l'homòleg a *Drosophila* del gen *selD* de bacteris i del gen *Sps1* (selenophosphate sintetase 1) d'eucariotes (Alsina *et al.*, 1998). Per tant, la mutació *patufet*, que a partir d'ara anomenarem *selD^{patuf}*, és una mutació nul·la de l'enzim selenofosfat sintetasa 1. A bacteris dit enzim és el responsable de la síntesi del monoselenofosfat, el donador de Se que posteriorment serà incorporat al ser-tRNA^{Sec} per sintetitzar la Sec. Així doncs, segons la via de síntesi de l'aminoàcid Sec descrita, es pot inferir que la conseqüència directa d'aquesta mutació (Fig. 12) serà, com a mínim, una reducció en el nivell de monoselenofosfat, i per tant de Sec, quedant afectada la biosíntesi de selenoproteïnes.

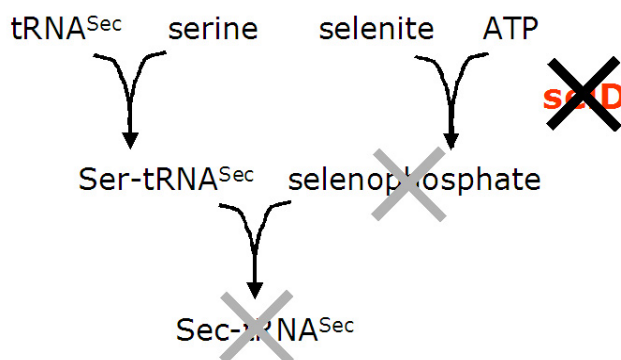


Fig. 12. L'efecte de la mutació *selD^{patuf}* és possiblement una reducció en els nivells de monoselenofosfat i conseqüentment una reducció en els nivells de Sec, amb la qual cosa la síntesi de selenoproteïnes es veu també comprometida.

2.3 Caracterització fenotípica

El mutant homozigot *selD^{ptuf}* (Alsina *et al.*, 1998; 1999) presenta un desenvolupament lleugerament retardat i letalitat a l'estadi de larva III. Els discs imaginals són extremadament petits i amb la condició epitelial seriosament alterada (Fig. 13). De fet, són tan anòmals que no es poden reconèixer per la seva forma o plecs característics, sinó sols per la seva localització dins la larva. El cervell també es troba reduït. Així mateix, la proliferació i el cicle cel·lular es veuen afectats. Aquesta observació lliga amb el fet de que el patró d'expressió del gen *selD*, malgrat ubiqu a nivells d'expressió baixos, presenta una expressió més elevada estretament associada a regions amb una alta taxa de proliferació tan en els discs imaginals com en el cervell. Així s'explica que la manca del gen *selD* faci que aquestes siguin les estructures més afectades.

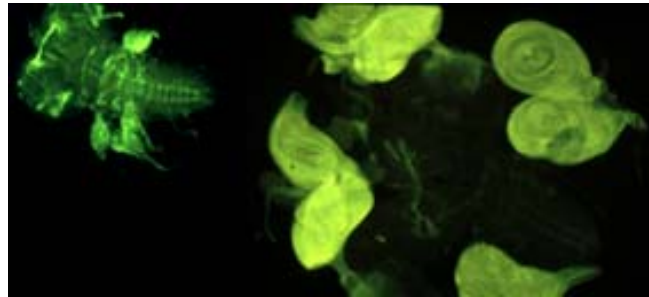


Fig. 13. Imatge presa a escala dels discs i cervell de l'estadi de larva III del mutant *selD^{ptuf}* homozigot en estadi de larva III a l'esquerra i d'una larva salvatge a la dreta.

Consistent amb el fet de que el gen *selD* és un element de la ruta biosintètica de les selenoproteïnes no s'observa síntesis de les mateixes en el mutant *selD^{ptuf}*. Experiments de suplementació del medi de cultiu de les mosques amb Se radioactiu per seguir la seva incorporació a les selenoproteïnes mostra que mentre en extractes proteics de larves salvatges certes proteïnes incorporen seleni, aquest no es el cas en les larves homozigotes *selD^{ptuf}*. D'acord amb la funció antioxidant descrita per les selenoproteïnes, les cèl·lules dels discs imaginals acumulen radicals lliures, i a més, moltes entren en apoptosi (Alsina *et al.*, 1999).

3. Interès de la mutació *selD^{ptuf}*

Fins al moment, el camp de les selenoproteïnes ha estat un camp purament bioquímic. Els estudis s'han centrat bàsicament en la ruta de biosíntesi d'aquestes, i en l'anàlisi de la mecanística i cinètica funcional, en experiments *in vitro* o en cultius cel·lulars, d'algunes de les selenoproteïnes conegudes. Si bé aquests estudis han estat imprescindibles per entendre les peculiaritats de les selenoproteïnes i la seva funció, mancava mostrar la seva importància funcional en un context biològic. La identificació del mutant *selD^{ptuf}* de *Drosophila melanogaster*, l'únic mutant eucariota d'un element de la ruta de biosíntesi de les selenoproteïnes, aporta un enfocament nou a aquest camp: la possibilitat de realitzar experiments *in vivo*, per esbrinar la importància funcional de les selenoproteïnes en el context d'un organisme sencer.

A més, donat que la mutació *selD^{ptuf}* altera la biosíntesi de les selenoproteïnes i que aquestes tenen una reconeguda funció antioxidant, el mutant *selD^{ptuf}* esdevé una eina molt valuosa per estudiar com una situació patològica d'estrès oxidatiu, en aquest cas causada per la manca de funció de les selenoproteïnes, afecta el desenvolupament d'un organisme. El mutant *selD^{ptuf}* ens permet estudiar quines vies intervenen i com ho fan en la resposta cel·lular front l'estrès oxidatiu. Concretament, hem analitzat com es veu afectada a la via de transducció del senyal Ras/MAPK i com s'activa l'apoptosi.

4. Maquinària de biosíntesi i selenoproteïnes a *Drosophila*

Fins al moment, els elements de la maquinària de biosíntesi de les selenoproteïnes identificats a *Drosophila* són dos: el tRNA^{Sec} (Zhou *et al.*, 1999) i els homòlegs del gen *selD*, les selenofosfat sintetases Sps1 i Sps2 (Persson *et al.*, 1997; Alsina *et al.*, 1998; Alsina, 1999; Hirose-Takamori *et al.*, 2000).

El fet de que Sps2 sigui en sí mateixa una selenoproteïna, suggereix que Sps1 seria l'enzim que inicialment s'encarregaria de sintetitzar uns nivells basals de Sec, per tal de llavors poder sintetitzar Sps2 (Guimaraes *et al.*, 1996). Així, s'ha vist que l'Sps1 d'humans complementa la mutació *selD* a *E. coli*, i les selenoproteïnes bacterianes incorporen la Sec sintetitzada a partir del monoselenofosfat sintetitzat per l'Sps1 (Low *et al.*, 1995). Al contrari que l'Sps1 d'humans, l'activitat selenofosfat sintetasa de Sps1 de *Drosophila* encara no s'ha pogut demostrar ni *in vitro* ni *in vivo* (Persson *et al.*, 1997), possiblement pel fet d'expressar-la en *E. coli* en lloc de en cèl·lules de *Drosophila*. Si més no, la disrupció del gen Sps1 en la mutació nul·la *selD^{ptuf}* altera la síntesi de selenoproteïnes, indicant que l'Sps1 de *Drosophila* està involucrada en aquest procés (Alsina *et al.*, 1999).

L'única selenoproteïna identificada fins al moment a *Drosophila* és la Sps2. Tanmateix, n'hi ha més encara no identificades: proteïnes pupals de 68, 42 i 25 kDa i una larvaria de 42kDa, incorporen Se (Robinson i Cooley, 1997; Alsina *et al.*, 1999). Aquestes evidències i la seqüenciació del genoma de *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000) ens han portat a analitzar si a part de les selenoproteïnes que es detecten per incorporació de seleni n'hi haurien més. La identificació de dites selenoproteïnes o de noves ens podria ajudar a entendre i interpretar la seva funció durant el desenvolupament de *Drosophila*.

COROL·LARI

Els radicals lliures són altament tòxics per la cèl·lula ja que oxiden les biomolècules. Això pot afectar la integritat i/o funció de les mateixes fins al punt de comprometre la viabilitat cel·lular. Malgrat tot, en determinades situacions els radicals lliures poden tenir funcions fisiològiques molt importants. De totes maneres, la constant generació dels mateixos com a conseqüència del metabolisme aeròbic ha d'estar estretament controlada per tal de mantenir el balanç redox cel·lular. Així, les cèl·lules han desenvolupat mecanismes per controlar la seva producció i efectes nocius. Les selenoproteïnes, mitjançant la seva funció antioxidant, són un d'aquests sistemes. El mutant *selD^{ptuf}*, l'únic mutant eucariota d'un element de la ruta de biosíntesi de selenoproteïnes, ens permet l'estudi *in vivo* de la funció de les selenoproteïnes en un organisme viu. A més, es presenta com un model d'estrès oxidatiu degut a l'increment en el nivells de radicals lliures causat per la manca de funció de les selenoproteïnes. Això fa que sigui un sistema idoni per estudiar i entendre la importància d'una funció cel·lular tan bàsica com el balanç redox cel·lular en els processos de desenvolupament, i més concretament, en la transducció de senyals i l'apoptosi.

OBJECTIUS

L'alteració de la síntesi de selenoproteïnes i l'acumulació de radicals lliures observats en el mutant *selD^{ptuf}* apunta a que aquest és un model per estudiar els efectes de l'estrès oxidatiu. Altres fenotips del mutant, com per exemple els discs imaginals extremadament reduïts, pareixen indicar que el manteniment del balanç redox cel·lular és necessari per a un correcte desenvolupament. L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral és entendre de quina manera l'alteració del balanç redox, degut a la manca de selenoproteïnes, afecta processos cel·lulars com la transducció de senyals i la mort cel·lular durant el desenvolupament dels discs imaginals de *Drosophila*. Així, els objectius concrets d'aquest treball són els següents:

1. En base a la similitud entre els fenotips de clons de pèrdua de funció d'elements de la via Ras/MAPK i els clons *selD^{ptuf}* en l'ala adulta, ESTUDIAR quina és la relació entre les selenoproteïnes i aquesta via de transducció del senyal.
2. Com una de les característiques del mutant *selD^{ptuf}* és una elevada mort cel·lular, ANALITZAR quina o quines vies apoptòtiques s'activen en resposta a la situació d'estrès oxidatiu deguda a la manca de selenoproteïnes.
3. Donat que la mutació *selD^{ptuf}* és una mutació en un element de la ruta de biosíntesi de les selenoproteïnes i per tant afecta la síntesi de totes elles, IDENTIFICAR selenoproteïnes concretes que poguessin explicar els fenotips observats.