



Migració i guiatge cel.lular durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila melanogaster*. Contribució de Hedgehog i Patched.

Elisenda Butí

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL:

**MIGRACIÓ I GUIATGE CEL·LULAR DURANT EL
DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI
DE DROSOPHILA MELANOGASTER.
CONTRIBUCIÓ DE HEDGEHOG I PATCHED**

Elisenda Butí
Barcelona, maig 2013

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona



**MIGRACIÓ I GUIATGE CEL·LULAR DURANT EL
DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI
DE DROSOPHILA MELANOGASTER.
CONTRIBUCIÓ DE HEDGEHOG I PATCHED**

Memòria presentada per
ELISENDA BUTÍ
per aspirar al grau de DOCTORA
per la Universitat de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Sofia J. Araújo a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) i a l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB).

Vist-i-plau del
Director/a

El Tutor/a

L'autor/a

Dra. Sofia J. Araújo

Dra. Montserrat Corominas

Elisenda Butí Barceló

*Als meus pares, Salvador i Maria Carme
i al Guillem.*

*Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.
Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí,
però no forcis gens la travessia.
És preferible que duri molts anys,
que siguis vell quan fondegis l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,
sense esperar que et doni més riqueses.
Ítaca t'ha donat el bell viatge,
sense ella no hauries sortit.
I si la trobes pobra, no és que Ítaca
t'hagi enganyat. Savi, com bé t'has fet,
sabràs el que volen dir les Ítaques*

I - Kavafis (Adaptació de Lluís Llach sobre una versió catalana de Carles Riba)



Portada:

Embrions de *Drosophila melanogaster*.
Sistemes traqueal i nerviós

Foto: Elisenda Butí Barceló
Disseny: Gerard Gómez Pagès

AGRAÏMENTS

Tots els camins tenen un inici i un final. El camí de la tesi no és un camí fàcil, i com tot a la vida té moments dolços i moments complicats. Tot i això, es tenen poques oportunitats de deixar per escrit els agraïments a les persones que han fet que en ocasions aquests camins siguis més planers, a la gent que et fa veure que el cim és més assequible i proper del que un mateix es creu. És per això que no vull deixar perdre la oportunitat d'agrair el recolzament a tots els que m'han acompanyat en aquest camí de cinc anys, tan des de dins com des de fora del laboratori.

A la Sofia, per la teva confiança, per haver-me escollit, per concedir-me la beca, per la paciència i per tot el que m'has ensenyat. I per permetre'm dedicar algunes hores extres a la divulgació, perquè gràcies a això he descobert un món engrescador.

Al Jordi per haver-me permès entrar en un gran grup, en tots els sentits, on a més de formar-me com a biòloga he après a treballar i a compartir. Gràcies per deixar-me formar part d'aquesta gran família.

Al meu comitè de tesi per fer-me posar les piles quan ha calgut, pels bons consells, no sempre fàcils de donar, i per fer-me tocar de peus a terra.

A la meva família, que per sobre de tot i de tothom ha estat sempre al meu costat, m'ha fet com sóc i m'ha ensenyat a estimar, a tolerar i a respectar. Per això voldria fer un esment especial als meus pares, Salvador i Maria Carme, els quals m'han fet créixer amb la curiositat d'aprendre i conèixer millor el món que m'envolta. Si sóc biòloga és gràcies a vosaltres. Al Guillem, el meu germà, que ha seguit el llinatge científic familiar i que ben aviat serà un ambientòleg com n'hi ha ben pocs. Poc després d'haver començat la tesi vaig perdre l'avi Salvador i poc abans d'acabar-la he perdut l'avi Jaume, per ells i per l'àvia Antònia, que tant orgullosos haurien estat de mi, i a l'àvia Maria, que tenim la gran sort de tenir-la a prop.

Al Araújós's group al complert, primer amb la Myrto, qui em va ensenyar a fer les primeres tincions, a la Delia, a qui li he intentat transmetre tot el que he après durant

la tesi, i perquè les mosques Hh-Ptc no han aconseguit separar-nos, i a l'Arzu i al Pablo, amb qui tants lab meetings hem compartit i tants bon consells m'han donat.

Quan vaig celebrar els 27 anys, els amics del laboratori em van fer una targeta amb els propòsits que havia de seguir per aquell any que tot just començava: el primer era que em posés morena a la platja; això em sap greu però en mi és molt difícil. El tercer que els convidés a casa (amagant el gat de passada); alguns sí que hi han vingut, i hi han dormit, esmorzat, dinat i sopat, i el Ginkgo ja s'amaga sol, així que aquest punt crec que l'he superat. El quart que em fes sòcia del Real Madrid... Visca el Barça i Visca els Països Catalans! "No hace falta decir nada más". El cinquè crec que l'he superat amb escriure ja que era que ensenyés a molts estudiants a fixar embrions; estudiants de primària, secundària, treball de recerca, professors i fins i tot de doctorat, ja està bé, no? El sisè que fes visites al Parc també per la gent gran; i també ho vaig fer. I el setè que fos molt feliç, i això ho procuro sempre! Però s'hi us heu fixat m'he saltat el segon punt. I és que és aquest el que em va emocionar més de la postal, el que més em va fer adonar (i més tard he pogut ratificat amb molt d'orgull) que estic envoltada de gent fantàstica, és a dir, TOTS VOSALTRES. En el segon punt em demanàveu que quedés més amb vosaltres. I sí que ho vaig fer: hem viatjat, celebrat, navegat, cavalcats, hem anat al teatre i al cinema, de festa, de calçotada... m'heu ensenyat una Barcelona que desconeixia, heu visitat la Vilanova que tan important és per a mi, m'heu acollit a casa vostra quan ha calgut, us heu deixat enredar quan us ho he demanat, m'heu recolzat, estimat, m'heu fet plorar i riure, però sobretot, m'heu fet sentir especial cada dia i això, amics, no té preu.

Núria, ha sigut un plaer compartir amb tu els tallers, les estones de cafè, les tardes de nenes, el teatre i la Plaça d'Osca, i espero poder prendre moltes més copes de vi en una terrassa amb tu durant molt de temps! Marco, què dir que no sàpigues? Has sigut el meu professor d'informàtica i estadística (de fet el de tot el laboratori), de biologia molecular i, fins i tot, el meu guia en diverses ciutats, en fi "tu ya sabes cuánto y porque". Leïore, que la ciutat de Catalunya que més vegades has trepitjat sigui Vilanova ja diu molt de tu, gràcies pel teu somriure i per encomanar-me les teves ganes de fer coses. Bárbara, tu energia es incansable, lo que el máster unió que no lo separe la distancia. Alessandro, el meu professor d'italià, és una llàstima que no hàgim coincidit més temps al laboratori, trobaré a faltar els cafès de mig matí i mitja tarda, i les cerveses

de la nit! Delia, la meva companya de taula i de laboratori, i germana de projecte. Esther, gràcies per encomanar la teva energia i el bon rotllo a tothom. Neus, la meva “personal shopper”, ets una passada, gràcies per la teva alegria incansable i trobar sempre el cantó positiu de les coses. Nico, el meu company d’esmorzars, les teves frases cèlebres passaran a la història. José, per fer-me costat en els bons moments però sobretot en aquells que han sigut més difícils. Òscar, gràcies pel teu optimisme infinit que s’encomana i s’agraeix, sort en tot el que et proposis i no canviïs mai! Ainoa, amb qui hem compartit hores de ràdio, algunes fins i tot en directe, i bons consells. Cristina, por las salidas en barco, por acogerme en tu piso y por el “pitas, pitas”. Mariajo, ens has ensenyat punts de vista diferents de la vida i consells casolans molt útils. La incansable Yolanda, hi ha un abans i un després de la teva entrada al laboratori. Fridermann, per les tardes amb xocolata. I també al Gaylord, la Pilar i la Neus. I ànims als nous, Guillermo, Ivet, Guillem.

I no m’oblido dels/es post-docs del meu laboratori! Anni *grazie mille* per fer-me sentir especial cada dia, i per fer-me de mama quan ha calgut. Kyra, *I am glad to have shared some time with you, inside and outside the lab*. Gael, *merci pour tes leçons de confocal, power point et ImageJ, pour les discussions sur la science et pour me permettre practiquer mon français de tans en tans*. Nareg, thank you for your patience and to change the american accent when required! Xavi, el roquetenc més simpàtic que conec. A la Marta per totes les discussions i el coneixement que m’ha transmès. I a l’Andreu, al Marc, la Sara i al Mahi.

A tots vosaltres, i als membres que han passat pel laboratori, Louis, Raquel i Gemma. Així com a la resta de gent del departament, Lara, Georgina, Érica, Federica, Carles, Marta, amb qui hem compartit tantes estones de passadís i de sala de mosques.

També voldria esmentar a la gent de Vilanova, la de tota la vida. A la Clara, per ser-hi sempre, per tot el que hem compartit, per tot el que encara m’has d’ensenyar i per creure en mi. A la Mari Carmen, per encomanar la teva voluntat de fer coses. A l’Esther, pels anys compartits, i per la passió dels carnavals i les festes majors. A la Griselda, tot i que et podria incloure en diferents apartats, gràcies perquè en definitiva tu ets la culpable que demanés la beca per fer el doctorat. A l’Aniol, per ser-hi quan ha calgut, pel “tempus fugit” i per la teva sinceritat incondicional. A les cossetanes: Alba i

Anna, sempre ens quedarà aquell Faraday, Meritxell Batlle concerts, festes majors, carnivals, què més ens queda? Meritxell Estaran, per les xerradetes i per la teva energia i Marta, què fariem sense els escrits emotius! Mireia, merci per ser-hi sempre que ha fet falta, per obrir-me les portes de casa teva, d'aquí i d'allà, i pels teus savis consells. A la Raquel i a la Neus perquè des del curs del CAP dels dissabtes als matins n'ha sorgit una gran amistat. A la Núria Radó per deixar-te enredar quan ha calgut i pels sentiments compartits. I al Xavi, per ser el Xavi.

Als meus correctors desinteressats de la tesi: José, Marco, Aniol, Pere, Ale, Clara i Núria, per les hores dedicades i per la paciència que heu tingut. I al Gerard pel disseny de la portada i pels concerts de Bulma!

Als biòlegs de viatge: Pere, Sílvia, Laia, Gemma i Laura, i evidentment Àlex, Marçal i Pin pels grans (i necessaris) dinars dels dimecres, per les “Biofritrobades” compartides, excursions, calçotades, casoris, viatges, lliçons, per anar on cal quan cal i per fer-me creure que tot és possible.

A les dones de Nicaragua, Cesca i Elisenda, per fer-me veure que Catalunya és un país petit com deia el Llach i per fer-me'l recórrer de concert en concert.

Al programa de “Recerca en Societat” del Parc Científic de Barcelona, perquè gràcies a vosaltres he pogut desenvolupar també la meva faceta de “divulgadora” que tant m'agrada!

Als “practiquistas”, Susana, Sara, Vane, Esther, Maria i Juan, que encara que estiguem lluny i ens veiem poc sempre recordarem aquell estiu, en el que tant vam compartir i aprendre junts, i perquè sempre que fem immersions pensem els uns amb els altres.

Segurament em deixo molta gent per anomenar, perquè realment han acabat sent cinc intensos anys de camí. En definitiva, gràcies a tots per compartir aquests anys, sense vosaltres res hagués estat igual.

ÍNDIX

ABREVIATURES	18
I. INTRODUCCIÓ	23
1. Desenvolupament embrionari	23
2. El desenvolupament de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3. Sistemes de migració i guiatge cel·lulars	24
4. Sistema traqueal de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
4.1. Funció	26
4.2. Patró embrionari del sistema traqueal	26
4.3. Histologia del sistema traqueal	28
5. Desenvolupament del sistema traqueal	31
5.1. Inducció traqueal	31
5.2. Invaginació traqueal	32
5.3. Ramificació de les branques primàries	33
5.4. Especificació i modulació de l'expressió de Bnl i la via de FGF	36
5.5. Especificació de la cèl·lula terminal en les BD	37
5.6. Ramificació de les branques secundària	39
5.8. Formació i guiatge de cèl·lules terminals o tubs de tipus IV	43
5.8.1. Guiatge de les BG dins del SNC	44
5.9. Maduració del tub	46
5.10. Absorció del líquid	47
6. Sistema nerviós de <i>Drosophila melanogaster</i>	48
7. Desenvolupament del sistema nerviós de <i>Drosophila melanogaster</i>	48
7.1. Desenvolupament embrionari del sistema nerviós central	48
7.2. Desenvolupament embrionari del sistema nerviós perifèric	49
7.3. Desenvolupament embrionari de les cèl·lules de la glia	50
7.4. Guiatge axonal	51
8. Via de senyalització de Hh	52
8.1. Via canònica de senyalització de Hh	53
8.2. Via de senyalització de Hh en vertebrats	55
8.3. Vies no canòniques descrites de senyalització de Hh	55
8.4. Contribució de la via de senyalització de Hh en el desenvolupament del sistema traqueal en l'embrió de <i>Drosophila</i>	56
8.5. Contribució de la via de senyalització de Hh en el desenvolupament del sistema nerviós en l'embrió de <i>Drosophila melanogaster</i>	57

II. OBJECTIUS	61
III. MATERIALS I MÈTODES	65
1. Línies de <i>Drosophila</i> utilitzades	65
2. Anticossos utilitzats.....	66
3. Preparació de cutícules embrionàries	66
4. Fixació d'embrions amb formaldehid	67
5. Immunohistoquímica	68
6. Immunofluorescència	69
7. Obtenció de sonda de RNA	69
8. Hibridació <i>in situ</i>	72
9. Seqüenciació	73
10. Real time PCR	74
11. Monitorització <i>in vivo</i> d'embrions de <i>Drosophila</i>	76
12. Microscopia.....	76
13. Tractament d'imatges.....	77
14. IMARIS.....	77
15. Estadística i gràfics	78
IV. RESULTATS.....	81
1. Cribatges per trobar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal.....	81
1.1. Cribatges de EMS per identificar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal de <i>Drosophila melanogaster</i>	81
1.2. La mutació GA833 presenta defectes de migració i fusió	83
1.3. La mutació D130 afecta al gen <i>patched</i> (<i>ptc</i>).....	87
2. Els mutants embrionaris de <i>ptc</i> ^{D130} presenten fenotip en els sistemes respiratori i nerviós.....	88
2.1. L'al·lel mutant de <i>ptc</i> ^{D130} presenta extensió fil·lopodis tot i no mostrar migració de les BG	92
2.2. L'al·lel mutant de <i>ptc</i> ^{D130} presenta una mutació puntual.....	93
2.3. Patched s'expressa en la part anterior de cada parasegment de l'embrió coincidint amb cèl·lules traqueals.	94
2.4. Altres al·lells mutants de <i>ptc</i>	96
2.5. Proteïna mutant de <i>ptc</i>	99
2.6. Fenotips traqueals de Smo i Hh.....	101
2.7. Autonomia de Ptc en el sistema traqueal.....	102
2.8. Identitat de les BG.....	105

2.9. El sistema traqueal dels mutants embrionaris de <i>ptc</i> presenta menys cèl·lules que els embrions salvatges.....	106
2.10. Expressió diferencial de DSRF entre embrions salvatges i mutants de <i>ptc</i> ^{D130}	112
2.11. La sobreexpressió de Hh al cordó nerviós ventral també evita la migració de les BG	113
2.12. Bnl és el responsable de la manca d'extensió de les BGs	116
2.13. Cal tenir la via de Hh activada en les cèl·lules productores de Bnl per tal de prevenir la migració de les BGs.....	118
2.14. Bnl es troba expressat en nivells més alts en mutants de <i>ptc</i> i en mutants on s'ha sobreexpressat la via de senyalització de Hh.....	120
2.15. L'augment dels nivells de Bnl en embrions heterozigots de <i>ptc</i> permet el rescat parcial de la migració de les BGs	122
2.16. Esquema del model.....	124
3. El morfogen Hedgehog actua com a quimioattractant en els axons de la línia mitjana de <i>Drosophila melanogaster</i>	125
3.1. Els mutants de Hh mostren un fenotip de guiatge axonal a la línia mitjana de l'embrió.	125
3.2. Hh s'expressa en un subconjunt de cèl·lules de la glia de la línia mitjana.....	128
3.3. El morfogen Hh actua com un atractant pels axons del SNC.....	130
3.4. L'activitat del quimioattractant Hh no sembla ser deguda a la pèrdua de cèl·lules a la línia mitjana o a canvis de destí cel·lular.....	134
3.5. Patched és el receptor pel senyal de Hh provinent de la línia mitjana.....	136
3.6. Esquema del model.....	138
V. DISCUSSIÓ.....	141
1. Cribatges per trobar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal.....	141
1.1. Mutagènesis en <i>Drosophila</i> . Avantatges i desavantatges dels cribatges de EMS..	141
1.2. Mutant embrionari GA833	143
2. Mutants embrionari de <i>ptc</i>^{D130}	145
2.1. Fenotip de <i>ptc</i> ^{D130}	145
2.2. Mutació de <i>ptc</i> ^{D130} i UPR.....	148
2.3. Altres al·lels de Ptc	149
2.4. Diferència entre Ptc>Hh-Ptc i Ptc>Ci ^{Act}	152
2.5. Expressió de DSRF	153
2.6. Expressió de Bnl	154
3. El morfogen Hedgehog actua com a quimioattractant en els axons de la línia mitja de <i>Drosophila melanogaster</i>	156

3. 1. Fenotips del SNC dels mutants de <i>hh</i> i <i>ptc</i>	156
3. 2. Hh com a quimioatracent de la línia mitjana	157
VI. CONCLUSIONS	161
VII. BIBLIOGRAFIA.....	165

ABREVIATURES

Adf	Adrift
AER	Apical ectodermal ridge o cresta apical de l'ectoderm
Af	Fascicle anterior o nervi intersegmental
Arm	Armadillo
BD	Branca dorsal
BE	Branques espiraculars
BG	Branca granglionar
Bnl	Branchless
BSA	Bovine Serum Albumin
Btl	Breathless
BV	Branques viscerals
CBP	Chitin Binding Protein
Cn	Nervis connectors
CNV	Cordó nerviós ventral
Crb	Crumbs
Ct	Connectius transversals
cv-c	Crossveinless c
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DI	Delta
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dpp	Decapentaplegic
DSRF	Drosophila Serum Response Factor
EMS	Ethyl methanesulfonate
FB	Branca del cos gras
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fu	Fused
Fz	Frizzled
GFP	Green Fluorescent Protein
GMA	Glia mitja anterior
GMP	Glia mitja posterior

H	Hairy
Hh	Hedgehog
IMCp	Inner Membrane Complex protein o complex proteic de membrana interna
Kni	Knirps
Knrl	Knirps related
Mec	Mesoectoderm
Moe	Moesina
Ms	Mesoderm
N	Notch
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBT	PBS-Tween
Pf	Fascicle posterior o nervi segmental
Ptc	Patched
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RFP	Red Fluorencent Protein
Rho	Rhomboid
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real time PCR
Sal	Spalt
Seq	Sequoia
Serp	Serpentine
Smo	Smoothened
SN	Sistema nerviós
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
SNS	Sistema nerviós “stomatogastric”
Spry	Sprouty
Sr	Stripe
ST	Sistema traqueal
TD	Tronc dorsal
TL	Tronc lateral
Trh	Trachealess

UAS	Upstream Activation Sequence
Unpg	Unplugged
UPR	Unfolded Protein Response
W	White
Wg	Wingless
Wt	Wild type
Yw	Yellow white
ZPA	Zone of polarity activity o zona d'activitat de polaritat

INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament embrionari

S'entén com a desenvolupament embrionari el conjunt de processos que condueixen a la formació d'un individu complet a partir de l'ou fecundat. Durant aquest procés es poden distingir tres etapes: (1) segmentació, en què el zigot pateix un seguit de divisions que donen lloc a una massa de cèl·lules indiferenciades; (2) gastrulació, fase durant la qual es comencen a formar els fulls embrionaris; (3) organogènesi, típica dels metazous més desenvolupats, és un procés a partir del qual es formen els teixits i els òrgans de l'individu. El desenvolupament implica canvis morfogènètics constants: les cèl·lules expressen gens que codifiquen proteïnes que poden estar implicades en adhesió, senyalització, metabolisme, estructura, remodelatge del DNA, etc., i tots aquests canvis en l'expressió dels gens i proteïnes confereixen unes característiques concretes a cada cèl·lula, depenent de la combinació de productes que hi siguin presents. Les cèl·lules amb característiques similars s'agrupen i s'integren per formar teixits específics, que es disposaran d'una manera determinada formant òrgans, que s'interrelacionen amb els teixits adjacents. Aquests processos morfogènètics són els que defineixen l'entitat d'un individu i són els mateixos per tots els metazous, encara que amb un grau de complexitat diferent. En el nostre cas en concret ens interessen els processos que s'esdevenen durant l'etapa final de l'embriogènesi, que és quan té lloc la organogènesi.

2. El desenvolupament de *Drosophila melanogaster*

La *Drosophila melanogaster*, mosca de la fruita o del vinagre, ha estat utilitzada històricament des de principis del 1900 com a organisme model genètic. Thomas Hunt Morgan va ser pioner en introduir la *Drosophila*, i va ser guardonat amb el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina, demostrant que els gens es trobaven en els cromosomes i que aquests són les bases de l'herència.

A partir d'aquest moment la *Drosophila* es va convertir en un dels organismes models més utilitzats per estudis de genètica, ja que presenta molts avantatges, com ara

la seva mida reduïda i una fàcil manipulació al laboratori, un baix cost de manteniment de les diferents soques, un cicle vital curt i amb molta descendència, a part de les múltiples i variades eines genètiques desenvolupades des d'aleshores.

El desenvolupament de *Drosophila melanogaster* és un procés altament estandarditzat. El cicle de vida dura uns 10 dies a 25°C. La femella diposita un ou fecundat que eclosiona passades 24 hores, emergint-ne una larva d'estadi 1 (L1) que muda dues vegades per tal de créixer (L2 i L3) i que, al cap d'uns 5 dies, forma una pupa en la que tindrà lloc una metamorfosi completa i d'on en sortirà la mosca adulta (Figura 1).

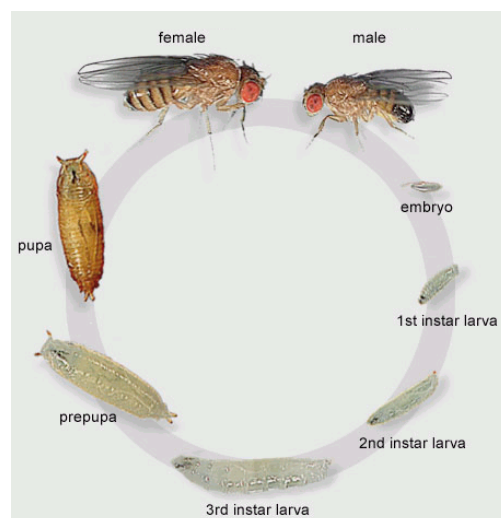


Figura 1. Cicle vital de *Drosophila melanogaster*. Extret de FlyMove

3. Sistemes de migració i guiatge cel·lulars

La morfogènesi dels organismes multicel·lulars depèn de la coordinació de varies vies moleculars capaces de controlar i coordinar diferents característiques cel·lulars com ara la seva proliferació, diferenciació, morfologia i migració. En particular, la migració i el guiatge cel·lulars són dos processos essencials durant la morfogènesi que requereixen una coordinació temporal i espacial molt precisa per tal que les cèl·lules puguin establir connexions a llargues distàncies. Conèixer la seva regulació és crucial per entendre el desenvolupament normal dels organismes multicel·lulars i els processos de carcinogènesi.

El sistema traqueal i nerviós de *Drosophila* han servit de model per estudiar la migració i el guiatge cel·lulars. Fins ara, l'estudi d'aquests dos sistemes s'havia dut a terme majoritàriament per separat, a pesar de que les seves característiques i propietats comunes suggereixen l'existència de mecanismes compartits i interaccions entre ells. En aquesta tesi doctoral, hem abordat l'estudi d'alguns d'aquests possibles mecanismes comuns. És per aquest motiu que la introducció d'aquest manuscrit està dividida en diferents apartats, els quals presenten els dos sistemes esmentats, traqueal i nerviós, i la via de senyalització que ha sigut objecte del nostre estudi.

4. Sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*

Els epitelis tubulars són molt comuns a la natura, tant en vertebrats com en invertebrats, i els inclouen òrgans com ara les glàndules mamàries, els pulmons, els ronyons i el sistema circulatori, tots ells encarregats del transport de gasos i líquids. D'altra banda, processos com l'angiogènesi o el desenvolupament del sistema vascular també requereixen la formació d'estructures tubulars. Per tal d'entendre com es formen aquestes estructures altament estereotipades i genèticament controlades, s'ha estudiat el sistema respiratori o traqueal embrionari de *Drosophila melanogaster*, el qual ens serveix com a model per analitzar funcions proteiques específiques i els mecanismes genètics que vetllen pel seu correcte desenvolupament.

El sistema traqueal de *Drosophila* està format per una xarxa d'estructures tubulars d'origen epitelial interconnectades entre sí, que es connecten amb l'exterior amb unes estructures anomenades espiracles i es ramifiquen a l'interior de l'organisme per tal de permetre el transport de gasos als teixits. La morfogènesi d'un elaborat arbre de branques ramificades com ara el sistema traqueal de *Drosophila* permet plantejar-se diverses qüestions com ara migració cel·lular, formació d'estructures tubulars i vies de senyalització. Cal destacar que durant el desenvolupament embrionari del sistema traqueal no s'observa proliferació ni mort cel·lular o canvis en números de cèl·lules. Els mecanismes que regeixen la tubulogènesi es troben altament conservats al llarg de l'evolució (Affolter et al., 2003; Lubarsky and Krasnow, 2003), de tal manera que un coneixement més extens del sistema traqueal de *Drosophila*, ens pot ajudar a entendre millor la morfologia d'aquestes estructures en vertebrats i humans.

4.1. Funció

El sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* és una estructura tubular la funció principal de la qual és la de distribuir l'oxigen i altres gasos a tot l'organisme. La respiració a través de les tràquees es realitza passivament mitjançant un gradient de concentració de gasos, el qual és possible gràcies a la mida reduïda de l'organisme. L'oxigen entra per difusió a través dels espiracles situats al tòrax i abdomen de la mosca, passa a les branques primàries, secundàries i finalment a les branques terminals o traqueòles, les quals estan molt ramificades, i es aquí on té lloc la major part de l'intercanvi gasós. L'entrada i sortida dels gasos a través dels espiracles es troba regulada per unes vàlvules controlades per cèl·lules musculars. Tanmateix, el fet que el CO₂ sigui soluble a la hemolimfa permet que una gran part s'elimini a través de l'epidermis. Tota la superfície apical del sistema traqueal es troba recoberta per una cutícula luminal que proporciona a l'organisme protecció contra microorganismes i la deshidratació, i evita el col·lapse dels tubs.

Tot i que, com ja s'ha esmentat, el transport gasós és la funció principal del sistema traqueal, també se n'han proposat d'altres com ara; (1) el suport estructural i de defensa, ja que el fet de tractar-se d'una estructura ramificada amb un lumen recobert de cutícula que és capaç d'arribar a tots els teixits, podria funcionar com a endosquelet. De la mateixa manera, proporciona una barrera contra la deshidratació i contra la invasió de microorganismes invasors; (2) la lleugeresa de l'organisme, ja que el sistema traqueal, i en particular els sacs aeris de l'organisme adult es troben plens de gasos, i com a conseqüència una part del volum de l'individu és gasós, reduint així la densitat de l'organisme; i finalment (3) la guia de la migració axonal, ja que l'arbre traqueal constitueix, en certa manera, el substrat a través del qual migren determinats axons neuronals i a la inversa, tan és així que algunes neurones es troben íntimament associades a determinades branques traqueals.

4.2. Patró embrionari del sistema traqueal

El sistema respiratori de *Drosophila* està altament estereotipat i posa de manifest una simetria bilateral i una repetició metamèrica (Figura 2). Està format per 10 unitats hemisegmentals, denominades Tr1-10 depenent de la seva posició, a cada costat de l'embrió (un total de 20). Aquestes unitats hemisegmentals es desenvolupen

independentment les unes de les altres, i al final del desenvolupament s'interconnectaran entre elles a través d'onze anastomosis dorsals i tres anastomosis ventrals. Les unitats hemisegmentals es formen entre els hemisegments T2 del tòrax i el A8 de l'abdomen.

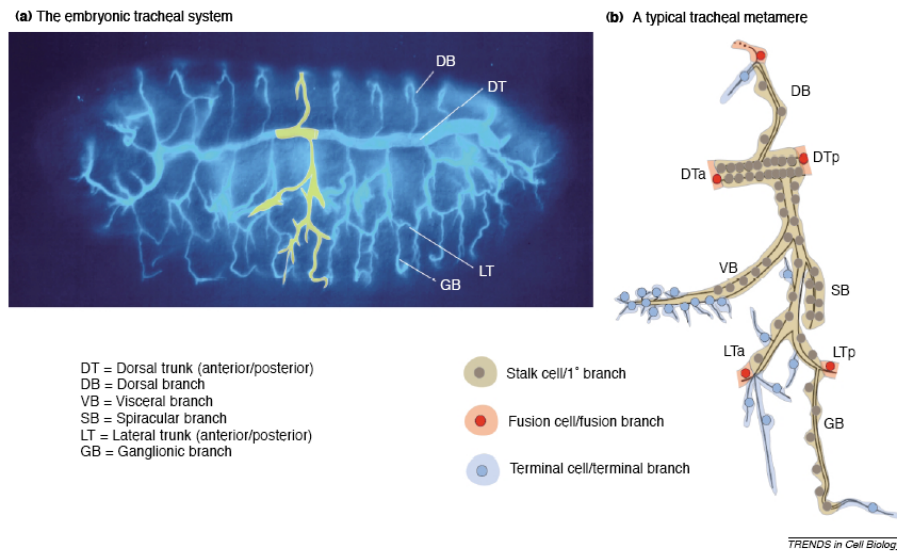


Figura 2. Sistema traqueal embrionari de *Drosophila*. (a) Les branques del sistema traqueal poden ser visualitzades gràcies al marcatge d'un anticòs luminal (2A12). El metàmer que està ressaltat en groc és que el es mostra ampliat en l'apartat b. (b) Cada metàmer està format per un patró estereotipat de branques. Vegi's en bru les branques multicel·lulars de tipus I i II, en blau les branques unicel·lulars de tipus IV que formen les cèl·lules terminals, i en vermell les cèl·lules de fusió o tipus III que uniran les branques primàries amb els metàmers adjacents (Uv, 2003).

El tronc dorsal (TD) pot considerar-se la branca principal de l'arbre traqueal. S'estén al llarg del eix antero-posterior de l'embrió, des de l'espíacle anterior, situat a Tr1 fins al posterior a Tr10. A partir del TD, i perpendicularment a aquest, es desenvolupen cap a la part dorsal de l'embrió 10 branques dorsals (BDs) que connectaran amb les respectives contra laterals mitjançant anastomosi dorsal. També des del TD però ara cap a la part ventral del l'embrió, surten 10 connectius transversals (CTs), que connecten el TD amb el tronc lateral (TL), tronc paral·lel a l'anterior però amb una estructura més fina i en forma de ziga-zaga. Del CT surten les branques viscerals (BV), que són les encarregades de subministrar oxigen al sistema digestiu, la branca del cos gras (FB) i les branques espiraculares (BEs) que arribaran fins a la superfície de l'embrió. Del TL sortiran, ventralment, 20 branques ganglionars (BGs),

que estendran fins al sistema nerviós central (SNC) i de les quals les tres primeres s'uniran amb les seves respectives contra laterals mitjançant anastomosis ventrals.

4.3. Histologia del sistema traqueal

El sistema traqueal està format per una monocapa de cèl·lules epitelials recobertes d'una cutícula a la superfície apical o luminal, i d'una làmina basal a la superfície basal. L'epidermis i la cutícula traqueal es troben connectades amb la cutícula de la superfície de l'embrió a través dels espiracles. Les tràquees formen una xarxa tubular constituïda per branques de diferents mida, gruix (des dels 50 µm de diàmetre de la TD als 0,1 µm de les traquèoles) i longitud.

4.3.1. L'epiteli traqueal

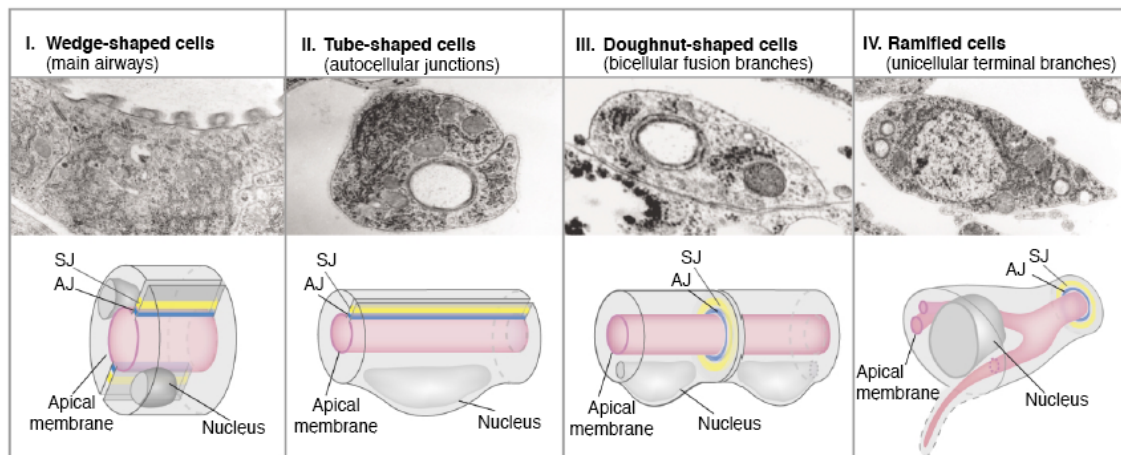
Les cèl·lules traqueals es caracteritzen per contenir un nucli aplanat i allargat situat a la zona més basal de la cèl·lula. A més, aquestes cèl·lules presenten a la membrana lateral les unions epitelials característiques de les cèl·lules epidermiques. Anàlisis de microscòpia electrònica han demostrat la presència de microvil·li en la membrana apical de les cèl·lules traqueals. En la superfície basal de la monocapa es troba la làmina basal, una estructura fibril·lar secretada en part per les cèl·lules traqueals.

4.3.2. Els diferents tipus de branques traqueals

El sistema traqueal de *Drosophila* es forma a partir de vint unitats independents (metàmers traqueals) amb un patró de ramificació similar que, al final de l'embriogènesi, acabaran connectats entre si. Cadascun d'aquests metàmers està format per 80 cèl·lules aproximadament (Samakovlis et al., 1996a). A través d'anàlisis estructurals s'han pogut diferenciar quatre tipus de tubs diferents que formen el sistema traqueal (Hemphala, 2003), i com que la formació de cada un d'ells està associat a l'expressió d'un grup concret de gens que actuen de marcadors traqueals, aquesta expressió ha de ser genèticament diferent, però filogenèticament conservada per que tingui lloc la correcta construcció dels diferents tubs (Figura 3):

- **Tubs de tipus I:** Branques multicel·lulars formades per cèl·lules aplanades que envolten el lumen. Aquests tubs els constitueixen de 2 a 5 cèl·lules unides per unions intercel·lulars que rodegen el lumen. En són un exemple les cèl·lules que constitueixen el TD (Beitel and Krasnow, 2000).

- **Tipus II:** Branques multicel·lulars formades per cèl·lules situades en línia que s'interconnecten per unions intercel·lulars. Aquests tubs estan formats per cèl·lules alineades que es dobleguen sobre si mateixes i es segellen mitjançant unions autocel·lulars envoltant així el lumen. A aquest grup pertanyen les BD, BV i BG. Els tipus de tubs I i II són els que es formen en primer lloc en el sistema traqueal embrionari, i durant la formació de les branques primàries (Beitel and Krasnow, 2000).



TRENDS in Cell Biology

Figura 3. El sistema traqueal està format per quatre tipus diferents de tubs. Vegi's tan els esquemes dels diferents tipus de tubs com les imatges de microscopia electrònica de transmissió (MET). (I) Tubs multicel·lulars de 4-5 μm de diàmetre els quals es troben formats de 2 a 5 cèl·lules embolcallant el lumen. (II) Tubs multicel·lulars d'aproximadament 1 mm de diàmetre en els que una mateixa cèl·lula es replaga sobre si mateixa amb unions autocel·lulars per permetre la formació del lumen en el seu interior. (III) Cèl·lules de fusió (anastomosomes) que connecten les metàmers adjacents formant unions intercel·lulars amb la respectiva cèl·lula de fusió contra lateral. El diàmetre d'aquestes cèl·lules correspon al de les branques primàries i oscil·la entre 0.5 mm i 5mm. (IV) Les cèl·lules terminals, compostes d'un lumen intracel·lular, no contenen unions autocel·lulars i fan uns 0.5 mm de diàmetre. Els nuclis de les cèl·lules està esquematitzat en gris fosc (Uv, 2003).

- **Tipus III** (fusió en anastomosi): Són els tubs que connecten els tubs de tipus I i II per tal d'unir els metàmers adjacents i permetre la formació d'una xarxa contínua de tubs. Aquests tubs estan formats per dues cèl·lules encarades amb un forat al mig. Cadascuna d'elles forma un anastomosi provinent de diferents branques primàries, i contacten entre elles per permetre la fusió del lumen de les branques en qüestió (Beitel and Krasnow, 2000).

- **Tipus IV:** Tubs cecs formats per una sola cèl·lula lliure d'unions autocel·lulars. Aquestes branques es formen a partir de projeccions llargues i estretes, a l'interior de les quals s'origina un lumen intracel·lular. Són els tubs que permeten l'intercanvi de gasos amb els teixits. Els tubs de tipus III i IV estan formats per unes cèl·lules diferents durant el segon i tercer procés de ramificació. Aquest grup d'estructures tubulars el formen les cèl·lules terminals (Beitel and Krasnow, 2000).

4.3.3. *Cutícula traqueal*

La cutícula traqueal, que és secretada per l'epiteli traqueal, presenta tres capes diferenciades: l'embolcall, l'epicutícula i la procutícula, cadascuna d'elles amb una composició química específica i unes característiques particulars (Locke, 2001) (

Figura 4). La cutícula consta de (1) l'embolcall que és la capa més externa, rica en lípids i repel·lent a l'aigua i es constitueix per cinc subcapes amb diferents propietats d'electrodensitat. A les branques terminals aquesta capa és molt fina o fins i tot inexistent. (2) L'epicutícula que és una estructura especialment rica en lípids constituïda per una subcapa electrolúcida en la part superior (subcapa amb una baixa electrodensitat en l'anàlisi de microscopia electrònica) i una subcapa electrodensa en la part inferior (subcapa amb una major opacitat electrònica). (3) La procutícula, que és la capa més interna, està en contacte directe amb la membrana apical de l'epiteli traqueal i està formada per microfibrilles de quitina.



Figura 4. Ultraestructura del lumen traqueal. Detall de l'estructura dels plecs taenidials de la TD. Vegi's les diferents capes que formen la cutícula: l'embolcall, l'epicutícula i la procutícula dins de cada plec taenidial (Araujo et al., 2005).

La cutícula traqueal presenta uns solcs en forma d'anell, com els d'interior d'un tub de l'aspiradora, projectats cap al lumen i anomenats plecs taenidials. Tenen com a funció proporcionar rigidesa als tubs a més de permetre l'expansió i la contracció dels tubs longitudinalment (Uv and Moussian, 2010).

5. Desenvolupament del sistema traqueal

El patró branquial del sistema traqueal és complex però altament estereotipat i es mostra repetit segmentalment i amb simetria bilateral (Figura 5).

5.1. Inducció traqueal

El primer pas en el desenvolupament del sistema traqueal és l'especificació del destí de les cèl·lules de la tràquea en el precursor de les cèl·lules traqueals de l'ectoderm. *tracheiless (trh)*, s'expressa en totes les cèl·lules traqueals durant el desenvolupament, i esdevé el precursor a les 4 hores després de la posta de l'ou. *trh* s'expressa en una posició concreta anterior-posterior (A-P) i dorso-ventral (D-V) en cada segment, suggerint que els eixos coordinen l'establiment del patró global d'aquestes posicions. Aquests grups de cèl·lules adopten una morfologia específica: cèl·lules columnars molt compactes entre elles, amb la membrana apical orientada cap a l'exterior i el nucli localitzat a la part basal, formant un epiteli pla anomenat placode o primordi traqueal.

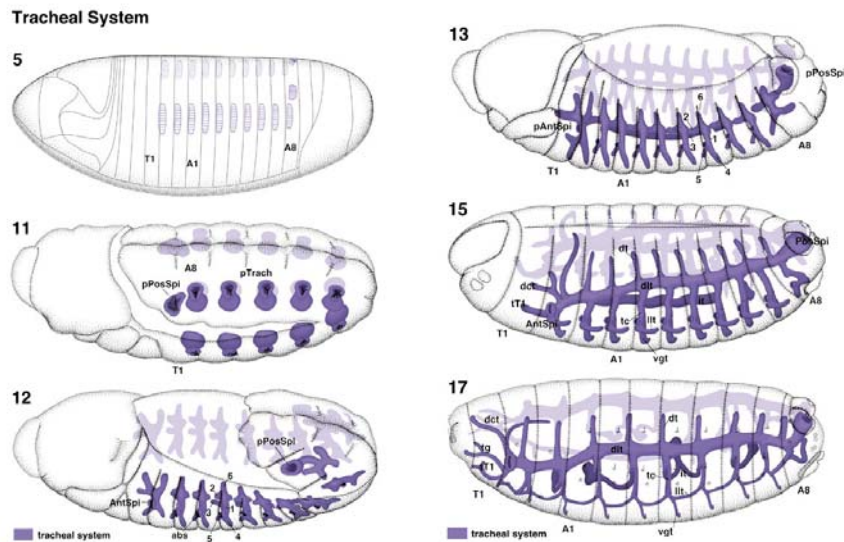


Figura 5. Esquema dels diferents estadis de desenvolupament del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. Extret de (Hartenstein, 1993).

5.2. Invaginació traqueal

L'inici de la invaginació de les cèl·lules de la tràquea ve determinat per la constricció apical en petits grups cel·lulars (Brodu and Casanova, 2006). L'expressió de *trh* destaca el camp d'invaginació i algunes cèl·lules adquireixen la propietat d'ingressar dins l'embrió (Figura 6). El mateix Trh inicia l'activació del senyal del receptor del factor de creixement epidermal (EGFR), a través de l'activació transcripcional de *rhuboid* (*rho*). *rho* codifica per una proteïna transmembrana que talla específicament el lligand de EGF, la qual cosa desencadena l'activació de la via de EGF a les cèl·lules traqueals. Aquesta via està finament controlada dins el placode i es veu parcialment reprimida a la regió dorsal per l'expressió de *spalt* (*sal*), de tal manera que permet una asimetria en la invaginació al llarg de l'eix dorso-ventral.

A més, analitzant el comportament cel·lular i la localització de la Miosina II durant la invaginació, s'ha observat que la via d'EGF s'activa en forma d'onada, la qual s'inicia al centre de la placode, on les cèl·lules s'estrenyen apicalment, coordinant així la temporalitat i el posicionament intrínsec de la internalització cel·lular (Nishimura et al., 2007). Una altra diana de Trh és *crossveinless c* (*cv-c*), que codifica RhoGAP, i proporciona un pas clau en la correcta distribució apical de l'actomiosina,

presumptament a través de la regulació de l'activitat de la petita GTPase Rho1 (Brodu and Casanova, 2006).

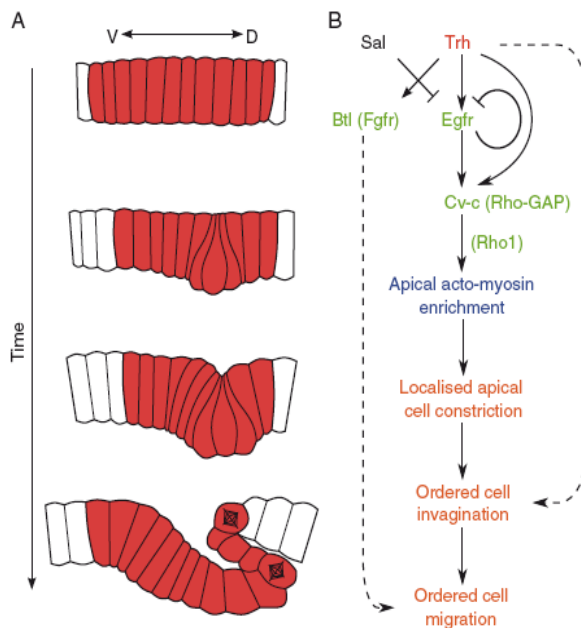


Figura 6. Invaginació de les cèl·lules traqueals. (A) Representació transversal d'invaginació d'un placode traqueal. Les cèl·lules representades en vermell expressen *trh*. (B) Model de senyalització i remodelació cel·lular necessari per dur a terme la invaginació traqueal. (Brodu and Casanova, 2006; Affolter and Caussinus, 2008).

La proteïna transmembrana Crumbs (Crb), un component de la zona subapical, es considera també un element clau en la determinació de la membrana apical, ja que la seva expressió provoca una “apicalització” de la membrana i la manca de funció una pèrdua d'adhesió i polaritat, la qual cosa comporta a una desorganització epitelial (Tepass et al., 2001; Gibson and Perrimon, 2003; Assemat et al., 2008). Crb és necessària en diferents moments del desenvolupament traqueal, per exemple per a l'elongació tubular (Forster et al., 2010; Laprise et al., 2010), i recentment s'ha descrit la seva implicació també en els processos d'invaginació i intercalació traqueals (Letizia et al., 2011). Crb controla la morfologia cel·lular a l'hora de la invaginació, i el reclutament de Moesina a la part apical de les cèl·lules que invaginaran.

5.3. Ramificació de les branques primàries

Les cèl·lules de la tràquea expressen un receptor d'un factor de transcripció FGF codificat per *breathless (btl)* (Klämt et al., 1992), així com una proteïna adaptadora específica de la via FGF codificada per *downstream-of-FGFR (dof)*, també conegut com *stumps* (Vincent et al., 1998; Imam et al., 1999; Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004). Tal i com passa amb l'expressió de *rho* i *cv-c*, l'expressió de *btl* i *dof* requereix Trh, i l'acumulació de *btl* i *dof* prepara les cèl·lules pel procés d'invaginació.

El procés de ramificació del sistema traqueal és degut, en bona part, al direccionament i a la migració cel·lular. La formació de les sis primeres branques requereixen l'expressió localitzada en l'estadi de placode (estadi embrionari 10) de Decapentaplegic (Dpp) (Vincent et al., 1997), Rhomboid (Rho) (Wappner et al., 1997) i Wingless (Wg) (Chihara and Hayashi, 2000; Llimargas, 2000) (Figura 7). L'activitat d'aquests promou una diferenciació regional de les cèl·lules de la tràquea, que es manifesta en una expressió selectiva de factors de transcripció. La senyal de Dpp és necessària per a la correcta formació de les branques dorsals (BDs), tronc lateral anterior (TLa) i tronc lateral posterior i branques ganglionars (TLp/BGs), i indueix l'expressió de factors de transcripció com Knirps (Kni) i Knirps-related (Knrl) en les cèl·lules traqueals adjacents. L'activació del factor de transcripció EGF per l'expressió de Rho en un conjunt de cèl·lules centrals és necessària per a la invaginació de les cèl·lules traqueals (Llimargas and Casanova, 1999; Bradley and Andrew, 2001), així com també pel correcte desenvolupament del tronc dorsal (TD) i les branques viscerals (BV). La diferenciació entre el TD i les BVs és mediat per la senyalització de Wg, que indueix el destí de les cèl·lules del TD. Els senyals de Wg i el receptor d'EGF promouen l'expressió del factor de transcripció Sal, el qual és reprimit per Kni i Knrl (Chen et al., 1998; Franch-Marro and Casanova, 2000). És en aquí on comença a tenir lloc l'especificació de la regió on tindrà lloc la migració de les primeres branques traqueals.

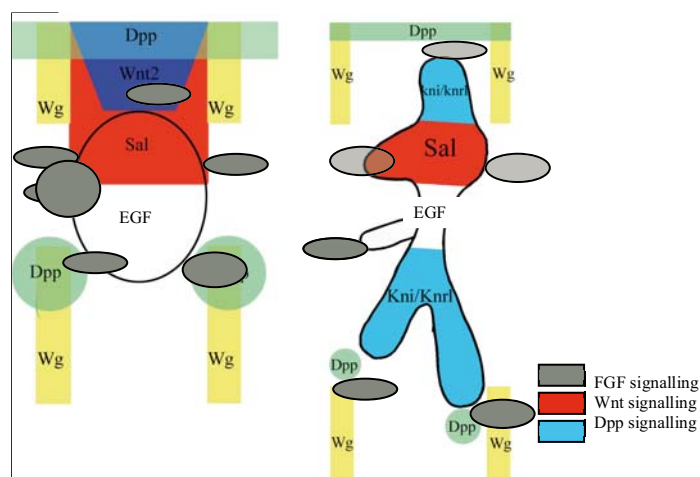


Figura 7. Expressió primerenca de gens que promouran la identitat específica de les diferents branques traqueals. Adaptat de la tesi doctoral de Xavier Franch-Marro.

Les cèl·lules traqueals migren cap a les cèl·lules o teixits veïns que expressen el lligand de Btl, Branchless/FGF (Bnl/FGF); la secreció especial de Bnl és la que controla en l'embrió de *Drosophila* la migració i la direcció del moviment traqueal, és a dir, actua com a inductor de la ramificació primària (Figura 8). *bnl* codifica l'homòleg de *Drosophila* FGF (Fibroblast Growth Factor) en vertebrats (Sutherland et al., 1996), i *btl* codifica l'homòleg de receptor de FGF (FGFR) i correspon a un receptor clàssic de tirosina quinasa (RTKs) (Glazer and Shilo, 1991; Klämbt et al., 1992). Just abans que comenci la ramificació primària, el receptor *btl* és activat a les cèl·lules traqueals per Thr/Tango i Vvl. Per la seva banda, el lligand *bnl* també s'activa, però no ho fa en les cèl·lules de la tràquea sinó en petits grups de cèl·lules epidèrmiques i mesodèrmiques que les envolten. La seva expressió és complexa i dinàmica, va canviant a mesura que avança el desenvolupament, i durant les primeres ramificacions la trobem localitzada a cada posició on tindrà lloc el primer brot.

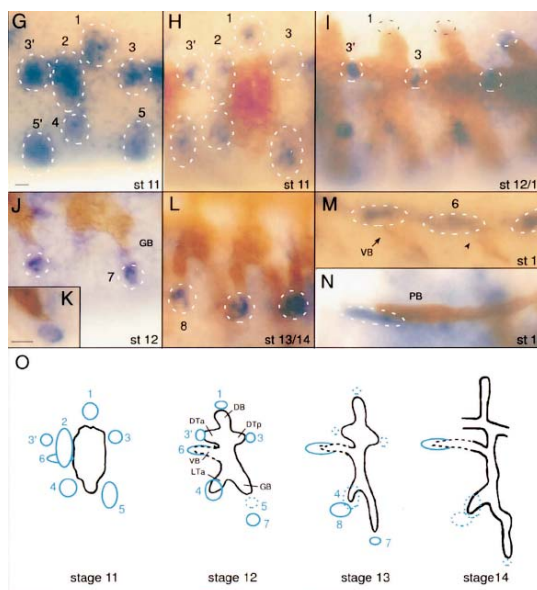


Figura 8. Expressió del RNAm de *bnl*. En l'estadi 11, just abans que tingui lloc la primera ramificació, s'observa l'expressió de *bnl* en cinc petits grups de cèl·lules que rodegen el sac traqueal, les quals corresponen a les 5 posicions on tindran lloc els primers brots. En l'estadi 12 s'observa l'aparició d'un sisè grup de cèl·lules que expressen *bnl*, que corresponen al lloc on tindrà lloc el sisè brot traqueal. A mesura que les branques primerenques van migrant, l'expressió de *bnl* va disminuint. Aquestes observacions demostren que Bnl és el quimioattractant responsable dels brots i de la migració primària de les cèl·lules traqueals, així com l'expressió de *bnl* determina el patró de les branques primàries (Sutherland et al., 1996).

Les branques traqueals primàries segueixen migrant tot i la progressiva desaparició de l'expressió de *bnl* gràcies a l'expressió remanescent de les cèl·lules que encara l'expressen, però aviat apareixen dos nous focus de cèl·lules que també l'expressaran. D'aquesta manera, la BG i el TLa començaran a migrar seguint aquests nous focus de cèl·lules que expressen *bnl*, i en el cas de les BG, per exemple, el guiaran fins a arribar al SNC.

5.4. Especificació i modulació de l'expressió de Bnl i la via de FGF

Totes les cèl·lules traqueals expressen el receptor Btl i responen a Bnl, el lligand de la via, que s'expressa a les cèl·lules que envolten la tràquea a les posicions on es formaran i posteriorment estendran les noves branques (Sutherland et al., 1996). Les cèl·lules terminals, un conjunt de cèl·lules especialitzades que formen tubs amb lumen intracel·lular en el seu interior, necessiten l'expressió de DSRF (Drosophila Serum Response Factor) o conegut oficialment com a Blistered (BS), ja que en mutants de DSRF la cèl·lula terminal és capaç d'estendre però no elonga correctament el lumen intracel·lular més distal, més enllà de la posició del nucli (Affolter et al., 1994; Guillemin et al., 1996; Sutherland et al., 1996; Gervais and Casanova, 2011) i el citoesquelet d'actina no s'organitza correctament (Gervais and Casanova, 2010). Recentment s'ha proposat un model de contribució de la via de FGF i del seu factor que es troba *downstream*, SRF per tal de promoure el desenvolupament del lumen intracel·lular de la cèl·lula terminal. Per una banda, la via de FGF desencadena el desenvolupament inicial de la cèl·lula terminal, mentre que per altra banda la mateixa via de FGF indueix la transcripció de *DSRF*, el qual assegura la seva correcta elongació (Gervais and Casanova, 2011).

Estudis previs han permès trobar nous factors que regulen l'expressió de Bnl. Un d'aquests estudis determina que el gen *sequoia* (*seq*) té un paper com a regulador negatiu de l'expressió de *bnl* d'una manera no-autònoma i en la determinació del nombre de cèl·lules terminals en les BG del sistema traqueal de *Drosophila*. Els mutants embrionaris del gen *seq* mostren bifurcacions en les BG que presenten més cèl·lules terminals que els embrions wt (Araújo and Casanova, 2011).

Un altre estudi postula que *hairy* (*h*), un gen "pair-rule" implicat en el patró de l'embrió primerenc, està implicat en la definició del destí cel·lular terminal de les branques primàries limitant el domini d'expressió de *bnl* en la musculatura que envolta les cèl·lules de la tràquea, de tal manera que només sigui una branca la que s'especifiqui com a terminal (Zhan et al., 2010a).

Les proteïnes Extradenticle i Homothorax també controlen l'expressió de *bnl* en un únic segment cel·lular, la cèl·lula pont del mesoderm (*bridge-cell*) (Merabet et al.,

2005). Hunchback, factor de transcripció que determina l'especificació de la cèl·lula pont, també és necessari per l'expressió de *bnl*. De tal manera que una de les funcions de la cèl·lula pont és sintetitzar i secretar el quimioatruent Bnl (Merabet et al., 2005).

Un altre element regulador de la via de senyalització de FGF és Stripe (Sr). Les cèl·lules ectodèrmiques que expressen Sr proporcionen una seqüència de senyals per a la migració de les cèl·lules musculars i traqueals. Sr i Bnl actuen conjuntament atraient les cèl·lules de la tràquea (Dorfman et al., 2002).

El gen *sprouty* (*sty* o *spry*), també va ser descrit com a regulador negatiu de la via FGF, s'expressa a les cèl·lules terminals i és induït per alts nivells de Bnl. Bnl activa el receptor Btl i indueix la degradació de Yan i l'activació de Pnt i Spry així com la de DSRF i altres gens implicats en la ramificació terminal. Nivells alts de Spry a les cèl·lules terminals actuen de manera no-autònoma bloquejant la senyalització de Bnl a les cèl·lules de la tija més distals. Aquest fet limita el rang de senyalització de Bnl, de tal manera que només la cèl·lula més propera a la font de Bnl serà la que formarà la ramificació secundària i la que esdevindrà cèl·lula terminal. Les cèl·lules adjacents romandran com a cèl·lules de la tija (Figura 9) (Hacohen et al., 1998).

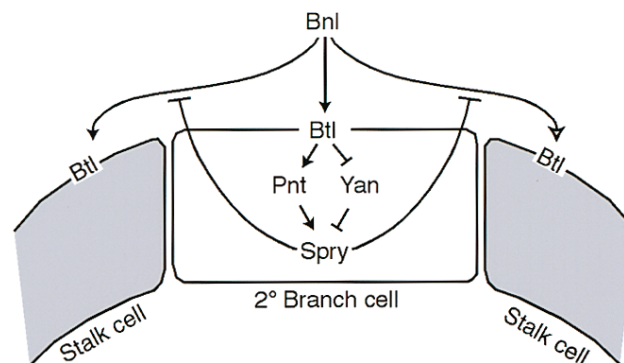


Figura 9. Circuit regulador de Bnl-Spry (Hacohen et al., 1998).

5.5. Especificació de la cèl·lula terminal en les BD

La determinació de la cèl·lula terminal en el cas de les BDs es produeix, a part de rebre senyals més alts de Bnl, per una inhibició lateral dependent de Notch (N) (Ghabrial and Krasnow, 2006), cosa que no es produeix en les BGs. La migració de les BDs i les BGs té lloc de manera diferenciada: les BDs mantenen dues cèl·lules en

posició terminal i només una d'elles esdevindrà la cèl·lula terminal pròpiament dita i l'altre esdevindrà la cèl·lula de fusió. La migració de les BGs, les quals no presenten la cèl·lula de fusió, no es veu afectada per un efecte autònom de N.

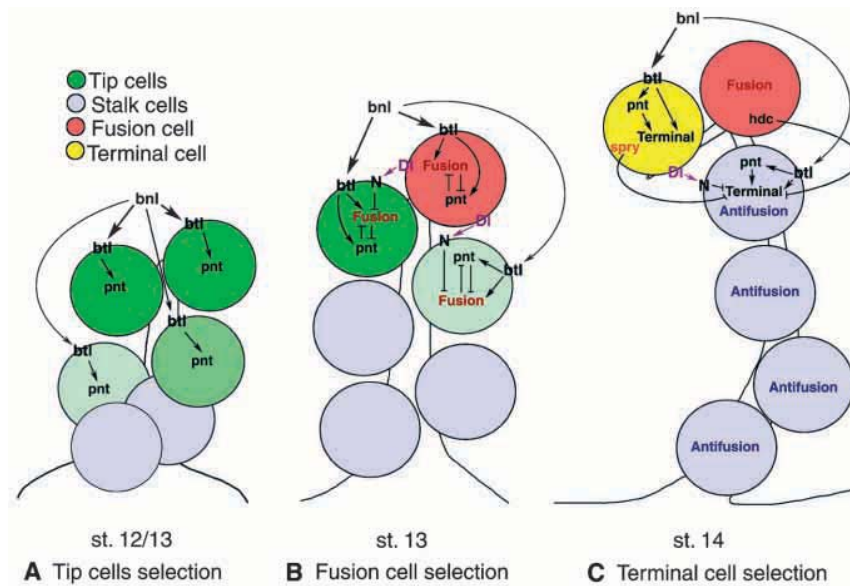


Figura 10. Model de diversificació de les cèl·lules de la tràquea a les BDs. Els diferents colors de les cèl·lules de la figura representen els diferents tipus cel·lulars esmentats a la llegenda. (A) En un primer pas, l'activació de *btl* selecciona un grup de cèl·lules competents que expressen uns marcadors específics. Les dues cèl·lules més properes a la font de Bnl expressen nivells més alts de *pointed* (*pnt*). (B) La persistent activació de *btl* o petites diferències en una de les dues cèl·lules més distals serà el que permetrà l'expressió de marcadors terminals. La falta de l'activitat de N serà suficient per la repressió del programa de fusió per part de *pnt* en aquesta cèl·lula. La cèl·lula de fusió envia senyals via *Dl* a les cèl·lules veïnes per tal de reprimir el destí de fusió, mentre que l'altre cèl·lula distal, també propera al senyal de Bnl rep senyals negatives per part de *N* i *pnt* per tal de no seguir el programa de fusió. (C) Més endavant el programa terminal s'activa en aquesta segona cèl·lula distal per l'elevada expressió de la via de *btl* i altres gens. La ja predestinada cèl·lula terminal evita (via *Dl* i *spry*) que les seves veïnes adoptin el destí terminal. A més, la cèl·lula de fusió envia senyals (mediades per *hdc*) a les cèl·lules de la tija per tal de reprimir el programa terminal. La repressió dels gens de fusió a les cèl·lules de la tija permet l'expressió dels marcadors antifusió (Llimargas, 1999).

Així doncs, un altre paper important de la via de senyalització de FGF durant el procés de ramificació és la inducció del senyal de Notch (N) (Figura 10). Alts nivells de la via de senyalització de FGF a les cèl·lules més distals (*tip cells*) de les branques primàries inicien l'activació de Delta (DI), el lligand de N, (Ikeya and Hayashi, 1999; Llimargas, 1999; Steneberg et al., 1999). L'expressió de DI en les cèl·lules més distals activa N en les cèl·lules veïnes de la tija, inhibint o reduint així el senyal de FGF en les

mateixes, en part a través de la inhibició de l'activitat d'un senyal regulador extracel·lular quinasa (Erk) (Ikeya and Hayashi, 1999). Ambdues vies, FGF i N, estan implicades en la decisió de destí cel·lular final durant el procés de ramificació, i garanteixen el nombre correcte de cèl·lules terminals i de fusió a l'extrem distal de la branca (Zelzer and Shilo, 2000).

5.6. Ramificació de les branques secundària

La morfogènesi del sistema traqueal requereix una sèrie de remodelacions epitelials, en el que un teixit pla acaba transformant-se en una estructura tubular de cèl·lules organitzades. Per tal que aquest procés sigui satisfactori han de modificar-se les unions cel·lulars durant el procés conegut com la intercalació i el qual s'ha modelitzat i diferenciat en quatre passos (Figura 11):

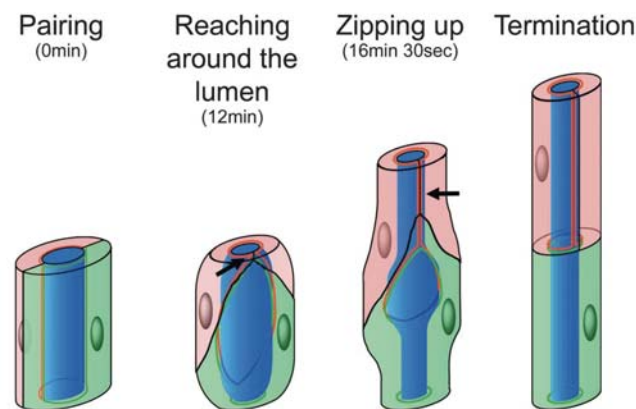


Figura 11. Formació d'unions autocel·lulars durant el procés d'intercalació. Observis els diferents passos esquematitzats: aparellament, extensió al voltant del lumen, tancament de cremallera i finalització. (Ribeiro et al., 2004)

- **Aparellament (“pairing”)**: inicialment les branques estan constituïdes per cèl·lules que es troben per parelles i unides entre si per unions intercel·lulars.
- **Extensió al voltant del lumen (“reaching around the lumen”)**: seguidament una de les dues cèl·lules implicades estén al voltant del lumen per la part més distal, mentre que l'altra estén per la part més proximal. És aquí quan es forma el primer contacte autocel·lular, gràcies a la formació de complexos de E-cadherina.

- **Tancament de cremallera (“*zipping up*”)**: les noves unions que s’han originat en cada cèl·lula s’estenen al llarg de la branca com si fos una cremallera, reemplaçant així les unions intercel·lulars.
- **Finalització (“*termination*”)**: les cèl·lules es troben embolcallant el lumen i segellades sobre si mateixes per unions autocel·lulars. En els extrems d’aquestes cèl·lules es generen dos petits anells que constitueixen les unions intercel·lulars entre les cèl·lules adjacents ara disposades en línia.

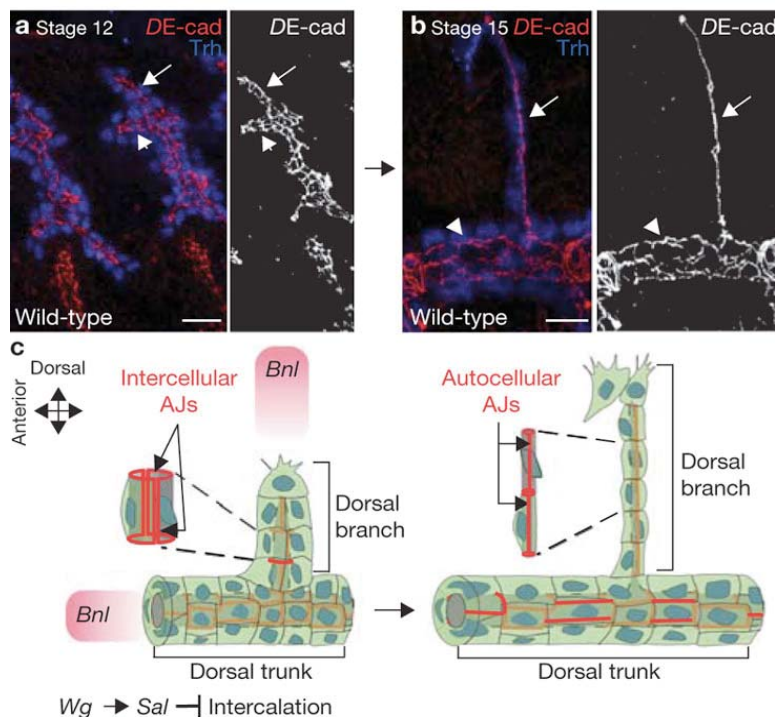


Figura 12. (a–c) Detall de les branques traqueals on tindrà lloc la intercalació i que ja l’han sofert. (c) Esquema que representa la regulació i l’execució de la intercalació d’una tràquea en desenvolupament. Vegi’s els cossos cel·lulars en verd, el nuclis en blau, les unions adherents en vermell i el lumen en gris. Les cèl·lules traqueals pateixen migracions en resposta al senyal de (Bnl)/FGF (representada en rosa). En estadis primerencs, les cèl·lules de la tràquea es troba de costat, unides per unions intercel·lulars en forma d’anell (DE-cadherina). Durant els estadis 13 i 14 la majoria de les branques intercalen, i quan aquest procés finalitza, les cèl·lules mostren unions autocel·lulars (vegi’s b i c dreta). La intercalació és inhibida a la TD per l’expressió de Sal, induïda per Wg (Shaye et al., 2008).

El procés d'intercalació té lloc en la majoria de branques del sistema traqueal, exceptuant les que formen el TD, el qual es tracta d'un tub multicel·lular, i és així perquè aquesta branca és l'única que expressa Sal (Kühnlein and Schuh, 1996), responsable de la inhibició de la intercalació i de la formació d'unions autocel·lulars (Figura 12).

5.7. Fusió de les branques i generació del tubs de tipus III

La fusió de les branques és un requisit necessari pel correcte funcionament de molts òrgans tubulars. Durant l'angiogènesi en mamífers, per exemple, els nous capil·lars es fusionen els uns amb els altres, o amb vesícules preexistents per tal de facilitar la circulació sanguínia. En *Drosophila*, la fusió branquial connecta les branques primàries dels 20 hemisegments traqueals independents formant una xarxa tubular contínua. Són dues cèl·lules, una al final de cada branca, les que duran a terme un complex procés de reconeixement i formació del tub intracel·lular per tal d'unir les dues branques adjacents. Tanmateix, l'estratègia que segueixen aquestes cèl·lules per formar aquests nous tubs ha de ser diferent a la que utilitzen les cèl·lules per formar el tubs primerencs, ja que els de fusió estan foradats per dintre i no tenen unions autocel·lulars (Samakovlis et al., 1996b). El procés de fusió va precedit per una sèrie d'extensions cel·lulars i seguit pel reconeixement i moviment cel·lular, i la formació del nou lumen que serà continu amb el de les branques primàries. Estudis detallats pel que fa la fusió de les BDs han demostrat que el tub que uneix les dues cèl·lules és extracel·lular, i produït per les cèl·lules adjacents, de la tija, mentre que la cèl·lula de fusió genera un petit tub intracel·lular (Gervais et al., 2012).

El primer pas molecularment parlant del procés de fusió és la deposició de DE-cadherina en el punt de contacte entre les dues cèl·lules de fusió (Tanaka-Matakatsu et al., 1996) (Figura 13). La DE-cadherina és una proteïna transmembrana epidèrmica d'adhesió que es troba en les unions adherents, i interactua amb Armadillo (β -catenina) i amb $D\alpha$ -catenina, les quals formen filaments d'actina que uniran la membrana plasmàtica amb el citoesquelet. Tant en les cèl·lules de fusió com en les epitelials, els complexos de cadherina-catenina es troben en les regions d'unió apicals, i són restringit a l'extrem de la cèl·lula de la tija quan té lloc la penetració. Una nova deposició de DE-cadherin a l'altre extrem de la cèl·lula també està associat amb la $D\alpha$ -catenina i amb filaments d'actina (F-actina). A més, Short Stop (Shot), una proteïna associada al

citoesquelet que interactua tant amb l'actina com amb els microtúbuls, té una distribució similar a la DE-cadherina al llarg del procés de fusió i es requereix per l'acumulació de la DE-cadherina a la interfase de la cèl·lula de fusió (Lee and Kolodziej, 2002).

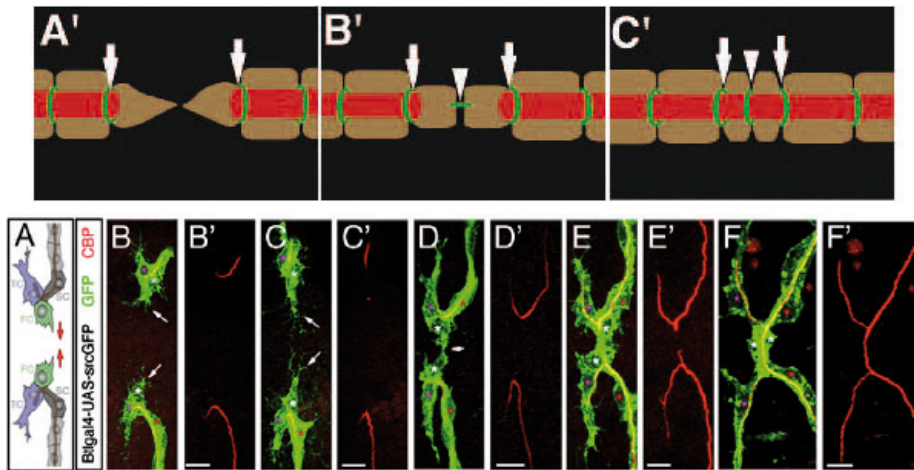


Figura 13. Procés de fusió de les BDs del sistema traqueal. En l'esquema de dalt de la figura (Tanaka-Matakatsu et al., 1996) s'hi dibuixa el procés de fusió d'una BD amb el lumen marcat en vermell, que dona lloc als tres anells de DE-cadherina (en verd) en el lloc de fusió. Vegi's en el segon esquema de la figura (Gervais et al., 2012) com tant les cèl·lules de fusió com les cèl·lules adjacents de la tija formen part en el procés de fusió. (B-F) Vegi's com canvia la morfologia cel·lular de les cèl·lules de fusió en els diferents estadis. Seguint la fletxa es pot observar que la major contribució del tub dins la branca ve donada per la cèl·lula de la tija i no pas per la cèl·lula de fusió.

A mesura que la fusió progressa, la DE-cadherina i les seves proteïnes associades es comencen a organitzar en direcció proximal-distal. Seguidament, la DE-cadherina s'organitza en un cercle perpendicular al que serà el lumen, a la interfase entre les dues cèl·lules de fusió, mentre que la F-actina forma una línia que uneix les dues cèl·lules. En aquest punt apareixen nous elements a la membrana apical. A mida que els dos lúmens en creixement es van apropant, es produeix el contacte entre les dues cèl·lules de fusió, tot desplaçant els cossos cel·lulars corticalment, i els filaments d'actina es desorganitzen per tal de reorganitzar-se seguidament en els nous anells d'unió entre les dues cèl·lules de fusió (Lee and Kolodziej, 2002). Els anells d'unió s'estenen fins a assolir la mateixa dimensió que les branques primàries que els connecten, i el lumen entre les dues cèl·lules de fusió genera una anastomosi bicel·lular (Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

5.8. Formació i guiatge de cèl·lules terminals o tubs de tipus IV

Les cèl·lules terminals són les encarregades de permetre l'intercanvi gasós als teixits adjacents. Hi ha dos aspectes principals de les branques terminals que fan que tinguin un interès especial i que les distingeix de les primeres etapes de la ramificació. En primer lloc cal esmentar l'estructura: són unes branques extremadament fines, de menys d'1 µm de diàmetre, que han de recórrer més de 50 µm durant l'embriogènesi, no presenten estructures d'unió al llarg de la cèl·lula terminal i estan formades per una sola cèl·lula que experimenta diversos processos de morfogènesi cel·lular. La cèl·lula terminal pateix una sèrie d'episodis d'extensió citoplasmàtica i la formació intracel·lular del lumen. (Guillemin et al., 1996; Samakovlis et al., 1996a; Gervais and Casanova, 2010).

La ramificació de les cèl·lules terminals ja que està regulada per la fisiologia de l'oxigen i no està estereotipat, no es constitueix per un desenvolupament fix. Cal que tinguin lloc ramificacions extensives per tal de formar varis tubs intracel·lulars durant l'etapa de larva i subministrar oxigen a cèl·lules diferents en el teixit de destí. Tot i això el patró de ramificació no és desorganitzat.

El primer brot de la cèl·lula terminal és anàleg al que té lloc en les cèl·lules de fusió. Les cèl·lules estenen el seu citoplasma en sentit contrari al de la ramificació primària i adquirint una ramificació inicial del lumen que vindrà donat per les cèl·lules veïnes (de la tija adjacent) de la branca primària. El següent procés de creixement de les branques es tracta, tanmateix, d'un procés intracel·lular, el qual suposa estendre fines protuberàncies citoplasmàtiques que poc a poc seran envaïdes pel lumen. Les cèl·lules terminals estan desproveïdes d'unions autocel·lulars, i tal i com passa als tubs del tipus III, el lumen creix en sentit de proximal cap a distal (Guillemin et al., 1996), la formació del lumen intracel·lular va associat amb el creixement de la membrana apical (Gervais and Casanova, 2010). Durant l'extensió de la branca terminal, el nucli de la cèl·lula terminal es manté immòbil i el creixement de la branca és similar al dels axons neuronals, exceptuant el moment en que les cèl·lules terminals s'introdueixen en el SNC.

Pel correcte creixement de la cèl·lula terminal es necessita l'expressió de DSRF, ja que en mutants de DSRF la cèl·lula terminal és capaç d'estendre però no elonga correctament el lumen intracel·lular més distal, més enllà de la posició del nucli (Affolter et al., 1994; Guillemin et al., 1996; Sutherland et al., 1996; Gervais and Casanova, 2011) i el citoesquelet d'actina no s'organitza correctament (Gervais and Casanova, 2010). Tal com s'ha comentat anteriorment, també hi ha una contribució de la via de de FGF per tal de promoure el correcte desenvolupament de la branca terminal (Gervais and Casanova, 2011).

5. 8. 1. Guiatge de les BG dins del SNC

Durant l'embriogènesi, les branques terminals segueixen uns camins predeterminats cap al SNC, que inclouen epidermis, musculatura, sistema digestiu i sistema nerviós central. La migració d'aquestes branques depèn de senyals que proporciona el SNC (font rica en senyals atractants i repel·lents), que es troben al voltant de cada hemisegment del CNV, de la mateixa manera que ho fan també alguns axons neuronals.

Inicialment la BG creix al llarg del nervi intersegmental cap al CNV. En el punt d'entrada la cèl·lula terminal canvia de substrat per seguir el nervi segmental fins a la línia mitjana ventral, aquest procés requereix l'expressió del homeodomini de la proteïna Unplugged (Unpg) (Chiang et al., 1995) i de la proteïna nuclear Adrift (Adf) a la cèl·lula terminal (Englund et al., 1999).

La proteïna Unpg, a part de permetre l'entrada de les BGs al SNC, és necessària pel correcte desenvolupament de la branca cerebral, una branca traqueal única provinent del primer segment toràcic. Els mutants d'*unpg* no presenten branques cerebrals, anastomosis cerebral associada, i un desenvolupament anormal de les BGs. *unpg* sembla estar involucrat en la morfogènesi branquial a través de la regulació de la migració o l'extensió cel·lular, ja que en l'absència d'aquestes funcions, les cèl·lules o bé moren o bé adopten altres patrons branquials. L'expressió d'*unpg* en les cèl·lules de les BGs és més tardana que en les de les branques cerebrals (estadis 9 versus estadi 12), la qual cosa suggereix que *unpg* deu tenir funcions secundàries durant el desenvolupament de les BG. Aquest fet es veu reforçat en els mutants de *unpg* on les BG es desenvolupen però no aconsegueixen estendre fins al SNC. Aquest fenotip és similar als al·lells hipomorfs dels mutants de *pnt* i *btl*.

Per altra banda, l'expressió del Complex-2 és un indicatiu de que les cèl·lules traqueals pateixen un cert grau de diversificació durant el desenvolupament branquial, i en aquest cas concret, l'expressió del Complex-2 defineix identitat de les BGs del sistema traqueal (Samakovlis et al., 1996a).

Com ja hem comentat anteriorment, les neurones duen a terme migracions complexes, i per tal d'esdevenir un SN funcional, aquesta informació de posicionament és potencialment aprofitada per altres cèl·lules per tal de migrar, entre elles les cèl·lules terminals del sistema traqueal, que contacten amb cèl·lules neuronals i de la glia per navegar dins el SNC, el gen *adf* és un dels requerits per dur a terme aquest procés. (Figura 14).

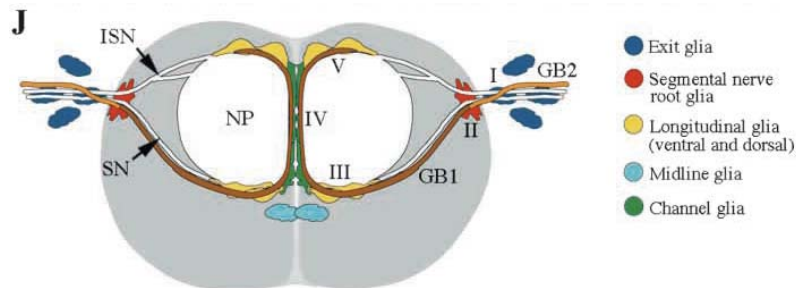


Figura 14. Guiatge de les BG traqueals dins del SNC. Esquema simplificat d'una projecció transversal del cordó nerviós (en gris) en estadi 16 per mostrar la posició de la BG (en taronja i marró) en el SNC. Els diferents passos de migració de les BG són els següents: (I) La BG canvia de substrat des del nervi intersegmental (ISN) fins a l'arrel del nervi segmental (SN) just abans d'entrar en el cordó nerviós ventral. (II) La BG migra dins del SNC a llarg del SN. La BG2 de l'esquema (en taronja) i el SN estan embolcallats per una cèl·lula del SN de l'arrel de la glia. (III) La BG1 (en marró) s'estén cap a la superfície ventral del neuropil (NP) per tal d'associar-se amb les cèl·lules longitudinals de la glia ventral; La BG2 es manté a la perifèria del SNC. (IV) A la línia mitjana ventral, la BG gira i migra dorsalment entre dos neuropils en estret contacte amb el canal de les cèl·lules de la glia. (V) Quan les BG arriben a la part dorsal del neuropil, aquestes s'associen amb les cèl·lules longitudinals de la glia i estén lateralment i posterior (Englund et al., 1999).

El següent pas del guiatge de la BG dins el SNC ve determinat per contactes cel·lulars específics entre la cèl·lula terminal i senyals des de diferents poblacions de cèl·lules de la glia. El senyal de Slit actua com a repel·lent tant per les cèl·lules terminals com pels axons per tal de prevenir que creuin la línia mitjana (Englund et al., 2002; Araújo and Tear, 2003; Sánchez-Soriano et al., 2007). Slit, un senyal de guiatge

axonal filogenèticament conservat, s'expressa en varis destins traqueals i és necessari tant per repulsió com per atracció. Roundabout (Robo) i Robo2 s'expressen en diferents branques, i ambdós són necessaris per la correcta orientació del creixement branquial (Araújo and Tear, 2003). El lligant de Robo és Slit. A la línia mitjana del SNC, Slit funciona com a repel·lent per les branques traqueals i la seva funció és mediada en primer lloc per Robo. Robo2 és necessari per la resposta traqueal d'atracció del senyal de Slit, i la seva funció és antagònica a Robo (Parsons et al., 2003).

5.9. Maduració del tub

Per un correcte funcionament del sistema respiratori, no només és necessari el control del patró de ramificació traqueal, sinó també el de la mida de les branques que el constitueixen, tant de longitud com de diàmetre. Aquests processos estan estereotipats i s'ha demostrat que es troben controlats genèticament (Beitel and Krasnow, 2000). L'expansió uniforme del diàmetre del tub requereix la formació d'una matriu luminal i transitòria de quitina (Araujo et al., 2005; Devine et al., 2005; Tønning et al., 2005; Moussian et al., 2006), ja que en absència d'aquesta el lumen es dilata d'una manera incontrolada. La quitina proporciona una bastida física que defineix la forma de les cèl·lules que envolten els tubs o bé transmet un senyal a les cèl·lules de la tràquea per tal que ajustin la seva forma d'una manera uniforme. A més, les modificacions químiques específiques de la matriu de quitina luminal, secretada apicalment via quitina desacetilases, sembla ser crucial per assolir la correcta longitud tubular (Luschnig et al., 2006; Wang et al., 2006). *vermiform* (*verm*) és una de les quitina desacetilases que s'allibera al lumen a través d'una via secretora especialitzada i que requereix *septate junctions* (Figura 15).

Per tal que la tràquea pugui realitzar la seva principal funció, cal que es produeixi el buidatge dels tubs i així permetre el pas de l'aire. Per aquest motiu s'ha de destruir la matriu de quitina o bé remodelar-la. S'ha descrit aquest fenomen de maduració del tub en un seguit de transicions epitelials (Tsarouhas et al., 2007) que comprèn la secreció de proteïnes luminals dins de l'espai del lumen guiant així una ràpida expansió d'aquest, i l'aclariment dels materials luminals sòlids i el buidatge del líquid.

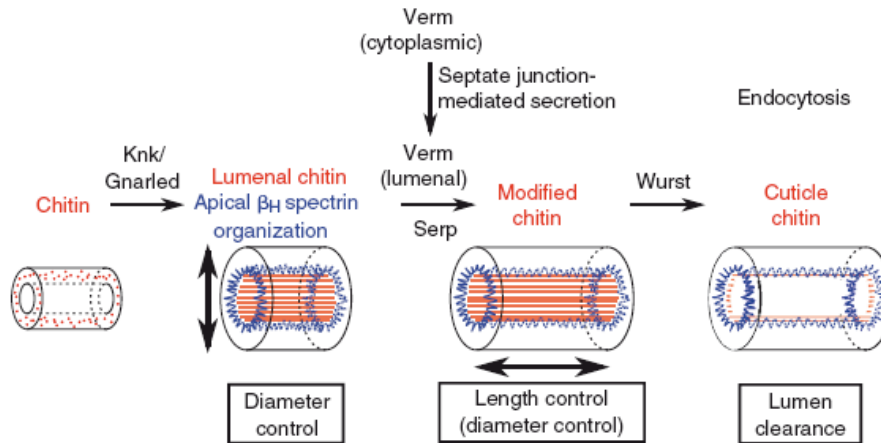


Figura 15. Control seqüencial de l'expansió i el buidatge el lumen del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. A l'estadi 14 de desenvolupament la quitina (en vermell) coordina l'expansió radial del lumen, creant posteriorment una matriu fibril·lar transitòria (línies vermelles). A l'estadi 16, les proteïnes que configuren les *septate junctions* són les encarregades de la secreció apical de Verm, qui conjuntament amb Serpentine (Serp) seran necessaris per modificar la matriu de quitina per tal de prevenir l'excessiu allargament dels tubs (Wang et al., 2006). A l'estadi 17, la proteïna Wurst és essencial per la remodelació de la matriu de quitina i pel buidatge de la tràquea per deixar pas a l'aire (Affolter and Caussinus, 2008).

5.10. Absorció del líquid

Al final de l'embriogènesi i dues hores abans de la formació de la larva, té lloc el buidatge del líquid que es troba en l'interior dels tubs de les tràquees i la seva substitució per aire (Manning and Krasnow, 1993). En embrions wt, la quitina i altres proteïnes d'unió associades són secretades al lumen dels tubs traqueals des de l'estadi 13 en endavant per formar un cable de quitina central i una regió al voltant sense quitina. S'ha demostrat que les proteïnes que formen les unions cel·lulars (*septate junctions*) i els enzims que modifiquen la quitina, són crucials per la correcta organització de la matriu extracel·lular i per la determinació de la mida del tub traqueal. A l'estadi 17 de l'embriogènesi, la quitina de la matriu extracel·lular és degradada i té lloc el buidatge del lumen el qual permet l'entrada de gas a l'interior dels tubs poc abans que tingui lloc l'eclosió de la larva. Wurst és una proteïna implicada en el buidatge del líquid de l'interior del lumen, i és essencial pel procés d'endocitosi mediat per les vesícules de clatrina, necessari per la determinació de la mida del tub traqueal i el seu buidatge (Behr et al., 2007).

6. Sistema nerviós de *Drosophila melanogaster*

Com ja hem comentat anteriorment, el sistema nerviós de *Drosophila* ha estat àmpliament emprat en estudis de migracions cel·lulars, necessàries per la construcció de les xarxes neuronals, on els axons i les dendrites han de navegar per trobar la corresponent cèl·lula sinàptica. En aquest apartat es fa una descripció d'aquest sistema, les parts que el constitueixen i les vies de senyalització generals que permeten el seu correcte desenvolupament, tot focalitzat pel fa referència al guiatge dels axons del sistema nerviós.

El sistema nerviós de *Drosophila* es pot dividir en tres diferents subtipus: (1) El sistema nerviós central (SNC) que prové dels neuroblasts i de progenitors cel·lulars de la línia mitjana i consta del cervell i el cordó nerviós ventral (VNC). (2) El sistema nerviós perifèric (SNP) que prové de progenitors cel·lulars de l'òrgan sensorial (SOP) i formarà el sistema sensorial. (3) El sistema nerviós "stomatogastric" (SNS) que prové de tres evaginacions de la regió dorsal del *stomodeum* i dona lloc al sistema nerviós que innerva el sistema digestiu. En aquest manuscrit ens centrarem en el SNC i una mica en el SNP.

7. Desenvolupament del sistema nerviós de *Drosophila melanogaster*

7.1. Desenvolupament embrionari del sistema nerviós central

Els precursors dels SNC, els neuroblasts, provenen d'una part especialitzada de l'ectoderm anomenada regió neurogènica. Separant la regió neurogènica ventral (VNE) i el mesoderm (ms) es troba el mesoectoderm (mec), una capa de cèl·lules a banda i banda de l'embrió que, entre d'altres, donarà lloc a varis precursors neuronals (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985; Goodman and Doe, 1993) (vegi's estadi 5 Figura 16).

Poc després de la gastrulació (estadi 8 del desenvolupament), les cèl·lules de l'ectoderm neuronal ventral augmenten de volum i a l'estadi 9 els neuroblast delaminen de l'ectoderm. Entre els estadis 9 i 13, els neuroblasts experimenten tres onades de mitosis asimètriques, donant lloc a un nou neuroblast i a una cèl·lula mare ganglionar (GM), les qual es situaran entre els neuroblasts i el mesoderm. Cada una d'aquestes GM pot dur a terme una altra divisió produint neurones o cèl·lules de la glia.

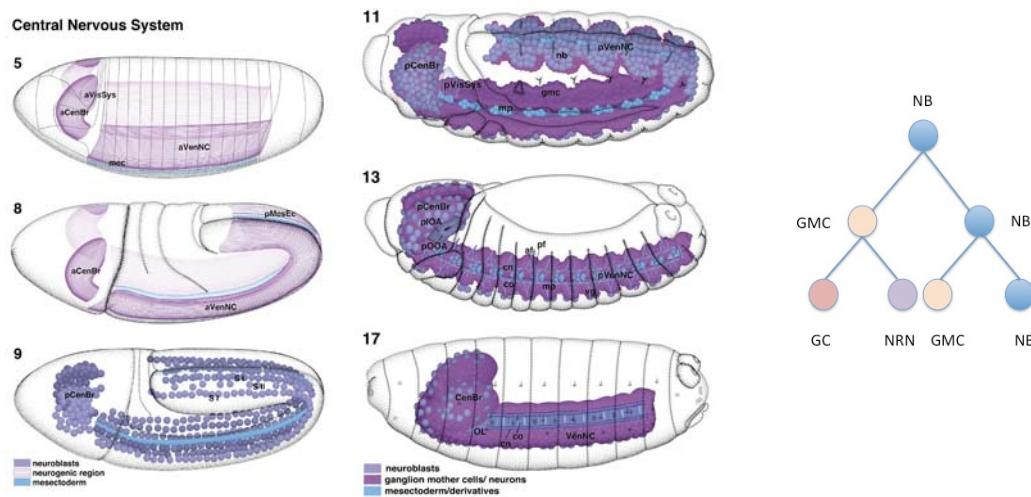


Figura 16. (A) Esquema dels diferents estadis de desenvolupament del sistema nerviós central de *Drosophila melanogaster*. Extret de l'*Atlas of Drosophila Development* de Volker Hartenstein (1993). (B) Esquema de la neurogènesi. Els neuroblast es divideixen per formar un altre neuroblast i una cèl·lula mare ganglionar, i alhora aquestes seran les progenitores per generar neurones o bé cèl·lules de la glia.

La diferenciació neuronal comença a l'estadi 13 quan una població de neurones deixen una bastida de fibres a la superfície dorsal del SNC. Posteriorment apareixen uns axons que formen feixos al llarg dels "pioneer tracts". Fibres longitudinals formen els nervis connectors (cn); fibres transversals formen dues commissures (co) a cada segment que creuen la línia mitjana i axons que deixen el SNC formen un fascicle anterior (af; també anomenada nervi intersegmental) i un fascicle posterior (pf; nervi segmental). A l'inici de l'estadi 14, el VNC es condensa, i a l'estadi 17, desapareixen els solcs profunds dels marges laterals de la VNC, que han separat els neuròmers individualment (Figura 16).

7.2. Desenvolupament embrionari del sistema nerviós perifèric

El precursor de les cèl·lules de la *sensilla* es troba a l'ectoderm de l'estadi 11 embrionari, i aquestes cèl·lules es desenvolupen en una regió concreta anomenada clústers proneuronals. Dins d'aquests clústers, els precursors duen a terme dues o tres divisions per produir diferents cèl·lules que formaran la *sensilla*. La primera onada de diferenciació es produeix durant l'estadi 13, mentre que la segona onada seguirà en els estadis 14 i 15. Els axons sensorials formen dues extensions en cada segment, les quals s'uneixen amb els axons sensorials i motors. A l'estadi 17, totes les cèl·lules de la

“sensilla” estan diferenciades, els axons sensorials han assolit al SNC i els motors han crescut fins a la musculatura (Figura 17).

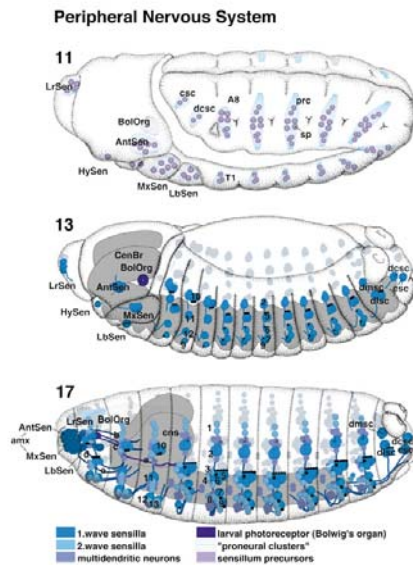


Figura 17. Esquema dels diferents estadis del desenvolupament del sistema nerviós perifèric de *Drosophila melanogaster*. Extret de l'*Atlas of Drosophila Development* de Volker Hartenstein (1993).

7.3. Desenvolupament embrionari de les cèl·lules de la glia

Les cèl·lules de la glia tenen una àmplia varietat de funcions durant el desenvolupament embrionari del SN. Són capaces de controlar la proliferació dels neuroblasts veïns, poden secretar factors neurotròpics i salvaguardar i aïllar elèctricament el feix axonal. Les interaccions entre neurones i glia són necessàries pel correcte posicionament de la bastida axonal.

Les cèl·lules de la glia es poden dividir en cèl·lules de la glia mitja o cèl·lules de la glia lateral en base a la posició i expressió gènica. Les cèl·lules de la glia mitja tenen un origen mesectodermal separat, ja que deriven dels neuroblasts de la línia mitjana, mentre que les cèl·lules de la glia lateral provenen dels glioblasts laterals que tenen un origen neuroectodèrmic (Figura 18).

Hi ha altres cèl·lules de la glia que es poden trobar al SNC com ara les cèl·lules de la glia subperineural i les cèl·lules canal de la glia, les quals deriven dels mateixos neuroblasts que donen lloc a les neurones. I com a mínim hi ha dues classes de cèl·lules de la glia que comparteixen precursors amb les neurones: les que s'associen amb axons perifèrics i amb les neurones d'òrgans sensorials.

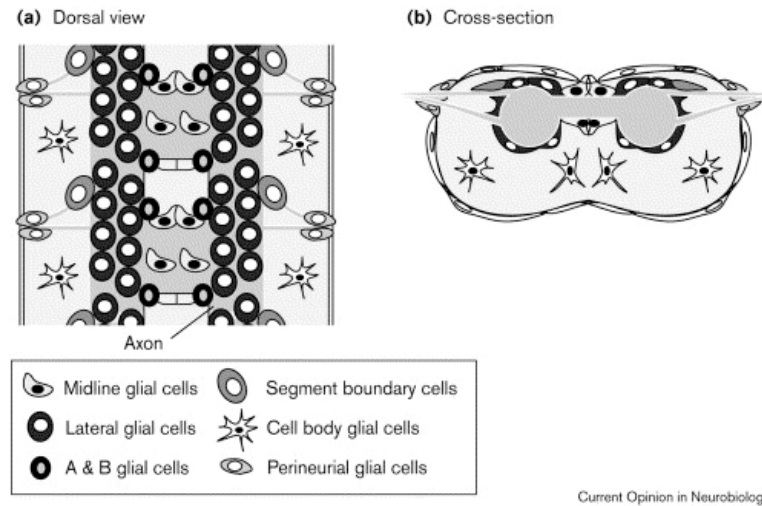


Figura 18. Esquema de les diferents classes de cèl·lules de la glia que es poden trobar en el SNC embrionari de *Drosophila*. (A) Visió esquemàtica dorsal de dos neuròmers. (B) Esquema d'un tall transversal d'un neuròmer (Granderath and Klambt, 1999).

7.4. Guiatge axonal

El desenvolupament del SNC de *Drosophila* requereix tant de la determinació dels tipus cel·lulars com de l'establiment de la connectivitat neuronal. La unió precisa d'un gran nombre de neurones amb les seves dianes ja siguin neuronals o no estableix un circuit complex de funcions neuronals. Nombrosos estudis han pogut identificar alguns dels gens i molècules que es requereixen per aquests processos (Araújo and Tear, 2003). En aquests estudis s'evidencia que el SNC de *Drosophila* proporciona un sistema model excel·lent, ja que molts dels mecanismes cel·lulars i les molècules caracteritzades en aquests organismes presenten homologies amb funcions similars en el desenvolupament del sistema nerviós dels vertebrats (Chisholm and Tessier-Lavigne, 1999; Tear, 1999). En aquests dos sistemes, la via de senyalització de Notch actua aviat en el desenvolupament a fi d'especificar els precursors neuronals, *numb* és segregat asimètricament per tal de diferenciar les cèl·lules filles dels seus precursors, i Lim, un domini homeòtic, especifica el destí neuronal (Thor et al., 1999; Rincon-Limas et al., 2000; Herzig et al., 2001). Els axons són guiats cap a les seves dianes gràcies a molècules de la superfamília de les Ig (fasciclin II/N-CAM, roundabout, frazzled/DCC), les plexins, les semaphorines i les netrines (Goodman and Doe, 1993). Aquestes molècules de guiatge actuen com a receptors i lligands per tal d'activar vies de senyalització intracel·lulars que dirigeixen les extensions axonals, o com a molècules d'adhesió que proporcionen vies moleculars fins al destí (Dickson, 2002).

Molts dels estudis moleculars realitzats en el SNC de *Drosophila* estan enfocats en la regulació del creixement dels axons pioners a la línia mitjana. Els axons que creuen la línia mitjana són atrets per molècules de Netrina i els creuaments mediat per Comm (Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Tear et al., 1996). Els axons que eviten la línia mitjana són repel·lits per Slit a través del receptors de Robo (Kidd et al., 1998; Kidd et al., 1999). Els tres receptors de Roundabout, Robo, Robo2 i Robo3, s'expressen en dominis solapats que defineixen les zones medials, intermèdies i laterals de les vies longitudinals a distàncies creixents de la línia mitjana. Cada axó longitudinal és dirigit a una zona concreta depenent de la combinació expressada dels receptors de Robo (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000). Tanmateix, una descripció completa del desenvolupament del SNC requereix la identificació de més molècules implicades en el guiatge dels axons pioners que segueixen les vies longitudinals i dels axons no pioners que els segueixen i es desenvolupament més tard. Aquests axons de desenvolupament més tardà, els mecanismes moleculars de regulació dels quals és força desconeguda, sovint assoleixen les seves dianes a través de vies prèviament formades i deixant-les de seguir una vegada assoleixen la seva diana destí o arriben a una via alternativa. En els vertebrats, la majoria dels axons segueixen preferentment les vies principals per tal d'assolir les seves dianes, fet que s'evidencia en el SNC on els anticossos contra diverses molècules d'adhesió com ara la Fasciclina I i la Fasciclina II, mostren una organització dels axons longitudinals en feixos discrets (Bastiani et al., 1987). Aquesta fasciculació o formació de feixos és necessària pel guiatge dels axons de desenvolupament més tardà per les vies apropiades (Raper et al., 1984; Hidalgo and Brand, 1997). S'ha vist també, que les cèl·lules de la glia, les qual es localitzen al llarg dels axons longitudinals dins el SNC, presenten un paper important en la regulació tant de l'extensió dels axons pioners, com en la decisió de formar feixos (Hidalgo and Booth, 2000).

8. Via de senyalització de Hh

El motiu pel qual introduïm un apartat dins la introducció dedicat a la via de senyalització de Hh és perquè es va seleccionar un mutant embrionari de *patched (ptc)*, membre i receptor negatiu de la via de Hh, per tal d'estudiar-ne el fenotip tant en el sistema traqueal com en el sistema nerviós.

El gen i el nom original de Hedgehog (Hh) va ser descobert en *Drosophila*, i es va anomenar així pel fenotip del mutant que presenta l'embrió cobert de denticles punxeguts, recordant un eriçó. La via de senyalització de Hh és una de les vies fonamentals en el desenvolupament animal, tant de vertebrats com d'invertebrats, i s'ha vist implicada també en el manteniment de cèl·lules mare i en processos de carcinogènesi. La família de Hh en vertebrats consta de 3 membres: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh), i Indian hedgehog (Ihh), mentre que en *Drosophila* n'hi ha un. Shh va ser el primer descobert en vertebrats i és el més ben estudiat com a lligand de la via de senyalització (Gilbert, 2000), jugant un paper important en la regulació de l'organogènesi, com ara el creixement dels dits i l'organització cerebral, i pel desenvolupament de la retina.

8.1. Via canònica de senyalització de Hh

En la visió clàssica o canònica de la via de senyalització de Hh, el lligand Hh s'uneix al seu receptor Ptc provocant la seva internalització i inhibint així la seva activitat. Smoothened (Smo), una proteïna transmembrana que juga un paper clau en la transmissió del senyal al nucli a la via de senyalització de Hh, es troba inhibida per Ptc quan aquest no està unit a Hh. Quan Ptc i Hh estan internalitzant, Smo queda lliure i és aleshores quan pot localitzar-se a la membrana plasmàtica, on serà fosforil·lat. En *Drosophila*, quan Smo està actiu, el senyal passa per un complex que conté varis elements com ara Costal 2 (Cos2), Fused (Fu), Suppressor of fused (Su(fu)) i Cubitus interruptus (Ci), sent aquest últim el que pot entrar dins del nucli i activar la transcripció. Quan Smo és inhibida, situació que té lloc quan Hh no està unit a Ptc i per tant aquest és capaç d'unir-se a Smo, el complex Cos2/Fu/Su(fu)/Ci es queda associat a microtúbuls i Ci serà fosforil·lat i tallat per Cos2. El tros que queda lliure de Ci actua ara com a repressor transcripcional, inactivant així la via de senyalització. Així doncs, la forma de Ci activada indica que la via de senyalització està activa (Figura 19).

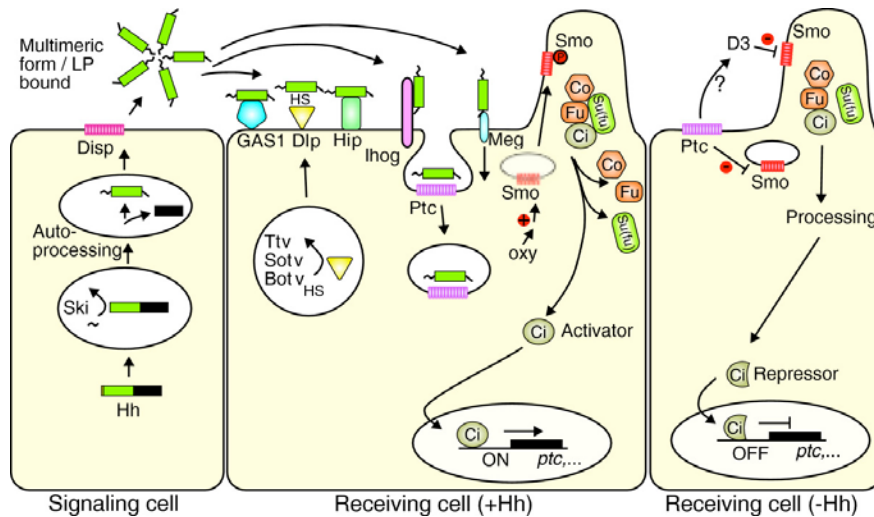


Figura 19. Esquema de la via de senyalització de Hh. Esquema realitzat combinant dades tant de *Drosophila* com de vertebrats. Quan Hh es troba unit a Ptc, Smo queda lliure per activar la via de senyalització. Quan Hh no és present, Ptc queda lliure per reprimir a Smo i també la via de senyalització de Hh (Burglin, 2008).

Després de la recepció de Hh, el complex receptor-ligand és internalitzat, qüestió que s'ha hipotitzat per tenir un paper important en el manteniment i la regulació del gradient del morfogen al medi extracel·lular. Aquest fet s'ha pogut ratificar gràcies a experiments que separaven els fenòmens de internalització i transducció del senyal, tot utilitzant un mutant de Ptc incapaç de segrestar Hh però tanmateix amb la propietat d'activar la via de senyalització (Chen and Struhl, 1996; Torroja et al., 2004).

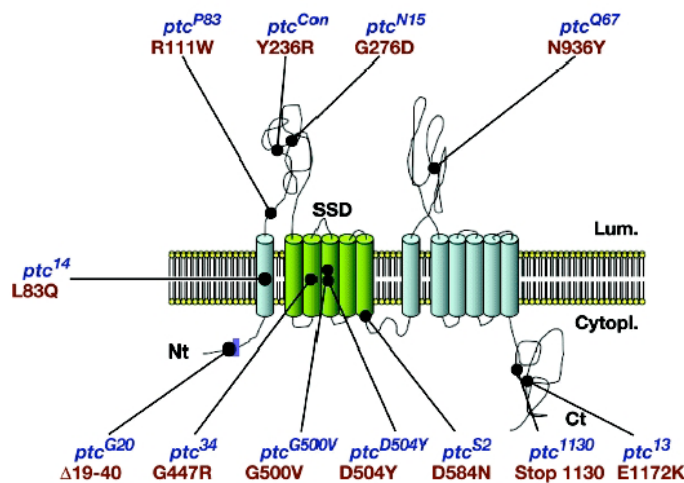


Figura 20. Diferents mutacions de Ptc. Les mutacions *ptc^{P83}*, *ptc^{N15}*, *ptc^{Q67}* i *ptc^{Con}* afecten tant al segrest com a la transducció del senyal. Les mutacions *ptc¹³*, *ptc³⁴*, *ptc^{S2}*, *ptc¹¹³⁰*, *ptc^{G500V}*, *ptc^{D504Y}* i *ptc^{G20}* afecten només a la senyalització. En el mutant *ptc¹⁴* només es veu afectada la capacitat de segrestar Hh.

Diversos anàlisis de diferents mutants de *ptc* han pogut demostrar que les dues funcions de Ptc, la de segrestar i internalitzar Hh i la de permetre la transducció del senyal de la via, es poden separar genèticament (**Figura 20**).

8. 2. Via de senyalització de Hh en vertebrats

La família de Hh en vertebrats conté tres membres: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh), i Indian hedgehog (Ihh), mentre que en *Drosophila* n'hi ha un (Hh). En els mamífers trobem dues formes de Patched, Ptc1 i Ptc2, on la forma Ptc1, en humans, s'ha descrit com un gen supressor de tumors (Cohen, 2003), i on el gen *ptc2* codifica una proteïna una mica més petita amb una tipologia i uns dominis similars a Ptc1. La transcripció de Ptc és regulada directament pel factor de transcripció Gli, Ci en invertebrats, i tant Ptc1 com Ptc2 estan sota la regulació de la resposta de Hh (Pearse et al., 2001).

8. 3. Vies no canòniques descrites de senyalització de Hh

S'han descrit també l'existència de diferents escenaris on la via de senyalització de Hh es desenvolupa d'una manera diferent a la via canònica (Jenkins, 2009). (1) Una d'aquestes situacions té lloc quan la senyalització de la via de Hh involucra els seus components però la via no acaba amb l'activació del factor de transcripció Gli, sinó amb un repressor Gli-R, i que es reflecteix en una regulació de la migració cel·lular (Bijlsma et al., 2007). (2) Un altre exemple és quan els components de la via de senyalització de Hh interaccionen amb elements d'altres vies de senyalització. Aquest és el cas de Shh-Ptch1-Cyclin B1, que actuen com a reguladors de la proliferació cel·lular. Ptc impedeix l'entrada al nucli de la Cyclin B1, aturant el cicle cel·lular a la fase G2. La unió de Ptc amb el lligand Hh inhibeix la interacció de Ptc amb la Cyclin B1 promovent així la transició a la fase G2-M i per tant la proliferació cel·lular (Barnes et al., 2001). (3) Finalment, les cèl·lules que expressen Ptc entren en apoptosi via caspases. La unió de Hh a Ptc atura aquest procés mantenint la supervivència cel·lular depenent del morfogen (Bredesen et al., 2005).

8. 4. Contribució de la via de senyalització de Hh en el desenvolupament del sistema traqueal en l'embrió de *Drosophila*

La via de senyalització de Hh regula el creixement i el patró de diversos òrgans en *Drosophila*, i entre ells el sistema traqueal. Hh s'expressa en l'embrió seguint un patró de bandes, i coincidint en el límit anterior de la placode traqueal a l'estadi 10 del desenvolupament (Glazer and Shilo, 2001). A mesura que avança el desenvolupament, l'expressió de Hh s'observa en les cèl·lules de l'ectoderm, just per sobre del anterior de la placode. Per la seva banda Ptc, a l'estadi 10, s'expressa cobrint tres quartes parts del parasegment a la part posterior de les cèl·lules de la placode traqueal. A mesura que avança el desenvolupament l'expressió de *ptc* es va estrenyent en bandes de cada vegada menys cèl·lules.

Hh participa en el posicionament del nombre correcte de cèl·lules en les placodes traqueals durant el desenvolupament primerenc. En l'estadi 12 està implicat en la migració cel·lular, ja que en mutants de *hh* aquest procés es veu altament afectat. I finalment, la via de senyalització de Hh és necessària per a la correcta formació del patró de les cèl·lules terminals de les BD (Glazer and Shilo, 2001).

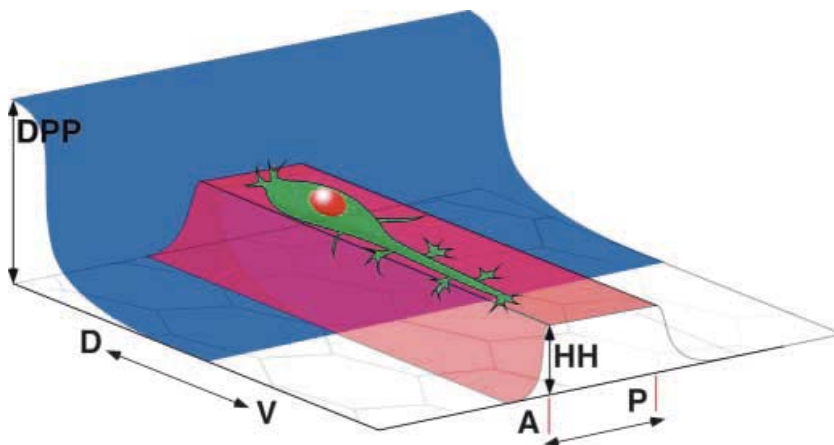


Figura 21. Model de guiatge de les branques terminals. Hh s'expressa en el compartiment posterior i forma un gradient de concentració que difon tan en direcció anterior com posterior. Les cèl·lules terminals adherides a la superfície basal de l'epidermis reben Hh, el qual manté el posicionament de la cèl·lula terminal allà on el gradient és més alt. Dpp actua com una barrera en contra de la ramificació terminal (Kato et al., 2004).

Hh també s'ha descrit conjuntament amb Dpp, els quals s'expressen en bandes ortogonals en l'ectoderm dorsal, per contribuir en el correcte guiatge durant la migració de les branques terminals (**Figura 21**). Hh actua com una senyal permissiva de la migració al llarg del compartiment posterior, mentre que Dpp actua com una senyal repulsiva que promou el creixement monopolar de les branques terminals (Kato et al., 2004). D'aquesta manera, Hh estimula l'adhesió de les cèl·lules terminals a l'epidermis a través de l'activació de Ci, i els cossos cel·lulars de les cèl·lules terminals es troben situats en els punts on la concentració de Hh és més elevada.

8. 5. Contribució de la via de senyalització de Hh en el desenvolupament del sistema nerviós en l'embrió de *Drosophila melanogaster*

En la línia mitjana de l'embrió en desenvolupament de *Drosophila* són varies les molècules responsables del correcte guiatge dels axons d'una banda a l'altra del sistema nerviós. Durant el desenvolupament embrionari, els axons responen a una sèrie de senyals de guiatge, ja siguin repulsives a atractives, per tal d'assolir el seu destí final. Aquesta migració té lloc seguint un procés estereotipat altament conservat en vertebrats i invertebrats, i varis estudis previs han permès identificar diferents gens i molècules implicades en aquests processos (Araújo and Tear, 2003; Evans and Bashaw, 2010; Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

El cordó nerviós ventral (CNV) de *Drosophila melanogaster* és un bon model per a l'estudi del guiatge axonal i la neurogènesi, i presenta molta similitud a la placa del terra dels vertebrats. Durant el desenvolupament, els axons projectats han de viatjar llargues distàncies fins arribar al seu destí final i creuant la línia mitjana, la qual actua de diana intermediari influint en la seva trajectòria a través de l'expressió de senyals atractius o repulsius (Evans and Bashaw, 2010). El tàndem lligand/receptor de Netrin/DCC, Slit/Robo i Semaphorin/Plexin/Neuropilin, són alguns dels gens implicats en el correcte guiatge a través de la línia mitjana de l'embrió. Recentment, els morfògens, molècules senyal produïdes en una regió concreta d'un teixit capaces de difondre i crear gradients de concentració, han permès ampliar el repertori de factors implicats en el guiatge axonal (Charron et al., 2003; Schnorrer and Dickson, 2004).

En la línia mitjana de *Drosophila*, no s'han mostrat evidències que Hh estigui implicat en el guiatge dels axons comissurals. Mutacions en gens de polaritat segmental com ara *wingless (wg)* i *ptc* mostren fenotips específics de defectes cel·lulars en subconjunts neuronals durant la neurogènesi, mentre que el SNC de mutants de *fused (fu)* i *ci* no presenta defectes significatius (Patel et al., 1989; Bhat and Schedl, 1997). Per altra banda Ptc, s'ha descrit per especificar la identitat neuronal al CNV, i com a conseqüència, els mutants embrionaris de *ptc* presenten menys neurones (Merianda et al., 2005). Tanmateix, en els mutants de *hh*, els SNC es troba molt desorganitzat, malgrat l'inici normal del patró neuronal, insinuant un possible efecte d'aquest morfogen en el desenvolupament del SNC.

OBJECTIUS

II. OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquest projecte és la identificació de nous factors implicats en la migració i el guiatge cel·lulars. El punt de partida per tal de dur a terme aquest propòsit ha estat una col·lecció de mutants embrionaris de *Drosophila melanogaster* provinents de dos cribatges de EMS els quals presentaven fenotip tan en el sistema nerviós com en el sistema traqueal. D'aquests cribatges es van seleccionar dos mutants que presentaven problemes de migració cel·lular:

1. El mutant GA833 presenta problemes de migració entre els segments adjacents del sistema traqueal, implicant també problemes de fusió cel·lulars.
2. El mutant de *ptc*^{D130} va ser escollit per presentar un fenotip de falta de migració de les branques ganglionars. Aquest estudi s'ha centrat principalment en la contribució de Hedgehog i Patched en la migració i el guiatge cel·lulars a través de la modulació de la via de FGF (Bnl) pel que fa la migració.
3. El mutant de *ptc*^{D130} s'havia descrit anteriorment per mostrar defectes en el CNV de *Drosophila* sobretot per presentar menys neurones. En aquest estudi s'ha analitzat la contribució de la via de senyalització de Hh en el guiatge dels axons a la línia mitjana de l'embrió de *Drosophila melanogaster*.

MATERIALS I MÈTODES

III. MATERIALS I MÈTODES

1. Línies de *Drosophila* utilitzades

A tenir en compte en els dos apartats de resultats d'aquest projecte. L'stock de mosques *yw* és el que s'ha utilitzat com a embrions salvatges o Wild-type. S'ha utilitzat el sistema GAL4 (Brand and Perrimon, 1993) per experiments de sobreexpressions o mis-expressions. Els stocks i els creuaments de *D. melanogaster* s'han conservat seguint les condicions estàndards a 25°C. Tots els experiments de sobreexpressions s'han realitzat a 29°C si no s'indica el contrari. La determinació dels estadis dels embrions ha tingut lloc seguint la descripció de Campos-Ortega i Hartenstein (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). Els embrions de les figures, si no s'indica el contrari, es troben orientats amb la part anterior a l'esquerra i la part dorsal a dalt.

La descripció de tots els al·lels mutants es pot trobar al web de FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>) (2013) i si no s'especifica el contrari, els al·lels provenen de Bloomington. Per a l'apartat del **sistema traqueal** s'ha utilitzat: UAS-*src*GFP, UAS-Bnl (M. Krasnow), UASCD8GFP (G. Lebreton) per les pel·lícules, UAS-p35 per inhibir l'apoptosi, UAS-Hh (A. Casali), UAS-Hh-Ptc (A. Casali) i UAS-CiAct (T. Orenic) per activar la via de senyalització de Hh, UAS-Ptc^{Δloop2} per reprimir la via de senyalització de Hh (A. Casali), *btlRFPmoe* (M. Affolter), *btl*GAL4 (M. Affolter), *btl*GAL4UAS*tau*GFP (M. Llimargas) i *trh*GAL4 com a *drivers* generals del sistema traqueal, *ptc*GAL4, *insc*GAL4, *twi*GAL4, *mef2*GAL4 i *mesoderm*GAL4 (també conegut com a *5053*GAL4). Ptc-LacZ (A. Casali), Pruned1-LacZ (M. Krasnow), Complex-2-LacZ (C. Samakovlis). I *bnl*^{P1} (també conegut com a *bnl*⁰⁰⁸⁵⁷), *ptc*^{D130} (cribatge EMS), *ptc*^{IIIW} (Chen et al., 1998), *ptc*^{S2}, *ptc*^{I4} (Torroja et al., 2004), *hh*², *hh*²¹, *hh*^{Ac}, *smo*^{D16} (Chen et al., 1998), DfH99, *crb*^{11A22}, *cycA*, GA833 (cribatge EMS), GA582 (cribatge EMS), Df(2R)BSC307, Df(2R)BSC361, *fas*^I, *fas*⁰⁵⁴⁸⁸ i *fas*^{EY03881}.

Per a l'apartat del **sistema nerviós** també s'ha utilitzat *hh*^{ts}. *sema2Btmyc* (G. Tear) i *elav*GAL4 (G. Tear) ha estat utilitzat com a *driver* neuronal general tardà, *sca*GAL4 (M. Krasnow) com un *driver* neuronal primerenc, *sim*GAL4 (G. Tear) com a *driver* de la línia mitjana, *en*GAL4UASGFP (J. Casanova) com a *driver* segmental i *ap*GAL4UASGFP (M. Milán) per expressions en cèl·lules positives per *apterous*. Per tal d'evitar el requeriment de Hh en estadis primerencs en el sistema nerviós, s'ha

utilitzat un mutant sensible a la temperatura *hh^{ts}*. Per aquest motiu es van mantenir aquestes mosques a la temperatura permissiva de 18°C durant 24 hores i després es traslladaven a la temperatura restrictiva de 29°C durant 4 hores.

A fi d'identificar els embrions mutants homozigots, s'han usat el segon o tercer cromosomes balancejats amb CyO-wg-LacZ, TM3-ftz-LacZ TM3-twi-GFP.

2. Anticossos utilitzats

S'han utilitzat anticossos que reconeixen la FasII (mAb1D4, DSHB), mAb2A12 (DSHB), GFP (Molecular Probes i Roche), β Gal (Cappel and Promega), Repo (DSHB), Ptc (A. Casali), mAbBP102 (DSHB), RFP (BioLabs), DSRF (BioLabs), CBP (NEB), Caspasa3 (G. Morata), Myc (Santa Cruz), DpERK (Sigma), Trh (J. Casanova) i HRP conjugat amb fluorescència (Roche) o Alexa488 i Alexa-555 conjugat amb anticossos secundaris (Jackson ImmunoResearch). Per HRP immunohistoquímica, el senyal va ser amplificat usant el kit de Vectastain-ABC (Vector Laboratories) quan ha sigut necessari. A més, per tal d'intensificar la senyal de la reacció del DAB s'ha utilitzat NiCl₂, excepte pels marcatges dobles.

3. Preparació de cutícules embrionàries

La cutícula de *Drosophila* tarda 24 hores a formar-se a 25°C des de que es pon l'embrió. És per això que després de fer postes, que poden ser de més o menys durada (fins a 24 hores), cal mantenir les plaques durant 24 hores més a 25°C per tal que aquesta estructura es desenvolupi correctament.

Primerament cal decorionar els embrions. Es cobreix la placa amb lleixiu i es frega amb el pinzell sense prémer gaire, per desenganxar els embrions de la placa. Es mantenen en lleixiu durant 5' i passat aquest temps es renten amb PBT 0,1%. Seguidament cal devitel·linar els embrions. Es prepara un vial per cada placa de posta amb 2 mL de metanol i 2 mL d'heptà. Amb l'ajuda d'un pinzell es passen els embrions de la membrana al vial i s'agiten durant 4' suaument. S'extreuen del fons del vial amb una pipeta Pasteur i es passen a un tub Eppendorf. Es fa un rentat amb metanol i dos amb PBT 0,1%. Per tal de muntar el embrions es recullen amb una pipeta Pasteur i es dipositen en un portaobjectes. S'elimina l'excés de líquid amb un paper de cel·lulosa.

Es col·loquen unes gotes de Hoyer/Làctic, que és una barreja 1:1 entre medi de muntatge i àcid làctic (van der Meer, 1977). L'àcid làctic s'encarregarà de degradar les estructures toves de l'embrió o la larva, deixant-ne només l'exoesquelet. S'incuba en una estufa a 56°C durant 24 hores. Les preparacions es poden observar utilitzant un microscopi òptic de camp fosc o de contrast de fase.

4. Fixació d'embrions amb formaldehid

La fixació química dels embrions permet realitzar tot un seguit de tècniques moleculars sobre aquests. Amb l'ajut del formaldehid, s'aconsegueix que totes les proteïnes cel·lulars quedin totalment estàtiques, i això permet que puguin ser observades tant les proteïnes com els RNAs en un moment determinat.

Per a treure el còrion (capa més externa de l'embrió) els embrions es desenganxen de la placa afegint aigua destil·lada, amb l'ajuda d'un pinzell i es recullen en una cistelleta. Es cobreixen amb lleixiu durant 4 minuts per tal de treure el còrion, i seguidament es renten amb aigua destil·lada. Per a la fixació dels embrions cal preparar un vial de 4 mL per placa de posta on s'hi afegeix:

PBS 1x	1400 µL
Formaldehid al 37%	200 µL
Heptà	1600 µL

Amb l'ajuda del pinzell es transfereixen els embrions de la cistelleta al vial, els quals se situaran a la interfase, i es deixen en agitació durant 20 minuts. Passat aquest temps s'extreu el PBS (fase inferior del vial) amb una pipeta Pasteur de vidre, afegim 2 mL de metanol i s'agita utilitzant un Vòrtex. Es recullen els embrions que han precipitat i es transfereixen en un Eppendorf de 1,5 mL. En aquí fem un parell de rentats amb metanol i es poden guardar a -20°C per fer tincions immunohistoquímiques.

5. Immunohistoquímica

La detecció de proteïnes suposa normalment l'ús d'anticossos específics i la reacció de diferents compostos que donen una coloració determinada que permet la localització de la proteïna.

Es parteix dels embrions prèviament fixats i emmagatzemats amb metanol a -20°C . S'extreu el metanol dels embrions i s'afegeix PBT (PBS-Tween), amb el qual es fan 3 rentats i es deixen hidratar durant 30 minuts. Seguidament es substitueix el PBT per PBT-BSA (0,5%) i es deixen 30 minuts més en agitació. S'afegeix l'anticòs primari (un o varis segons calgui) diluït en PBT-BSA com correspongui (veure les dilucions a l'Annex) i es deixar incubar O/N a 4°C . S'extreu l'anticòs, el qual es pot reciclar fins un parell de vegades, i es fan 3 rentats amb PBT de 30 minuts cadascun. S'afegeix l'anticòs secundari diluït 1:500 en PBT-BSA i es deixa incubar durant 2 hores a temperatura ambient. Paral·lelament es fan rentats amb PBT, en un tub apart es fa la incubació dels agents A i B en PBT ($2,5\ \mu\text{L}$ de cada en $500\ \mu\text{L}$) durant 30 minuts. S'afegeix la preincubació dels agents A i B en els embrions i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient. Es fan els rentats pertinents amb PBT i es substitueix el PBT pel DAB, on s'ha afegit prèviament $1,5\ \mu\text{L}$ de H_2O_2 per $500\ \mu\text{L}$ de DAB (Figura 22).

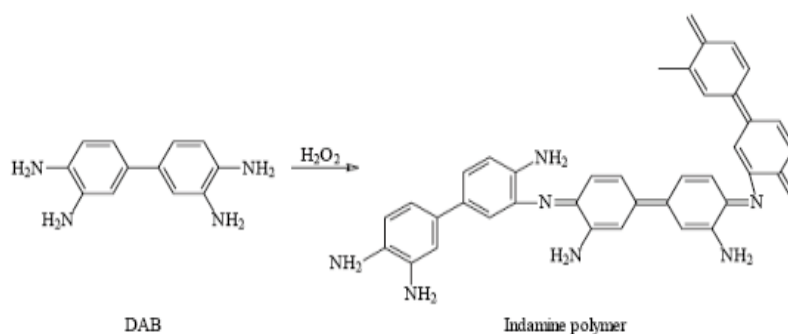


Figura 22. Reacció d'òxido-reducció del DAB.

La reacció es deixa que tingui lloc fins que els embrions agafen la coloració desitjada (normalment de 5 a 10 minuts). S'atura la reacció fent rentats amb PBT, i després s'afegeix glicerol al 70% i s'espera fins que els embrions precipitin al fons del tub.

6. Immunofluorescència

El fonament és exactament el mateix que en el cas anterior, però enlloc de realitzar una reacció colorimètrica que permet visualitzar la localització de la proteïna d'interès, es fan servir fluorocroms. Aquests fluorocroms, en rebre energia lumínica d'una determinada longitud d'ona, l'absorbeixen i emeten fluorescència que es pot observar mitjançant la microscòpia adequada.

Es parteix dels embrions fixats i emmagatzemats amb metanol a -20°C (veure apartat 4). S'extreu el metanol dels embrions i s'afegeix PBT 0,1% (PBS-Tween), amb el qual es fan 3 rentats i es deixen hidratar durant 30 minuts. Seguidament es substitueix el PBT per PBT-BSA (0,5%) i es deixen 30 minuts més en agitació. S'afegeix l'anticòs primari (un o varis segons calgui) diluït en PBT-BSA com correspongui (veure les dilucions a l'Annex) i es deixen incubar O/N a 4°C . S'extreu l'anticòs, el qual es pot reciclar fins un parell de vegades, i es fan 3 rentats amb PBT de 30 minuts cadascun. S'afegeix l'anticòs secundari diluït generalment 1:500 en PBT-BSA i s'incuba durant 2 hores a temperatura ambient protegit de la llum. Es fan rentats amb PBT i es preparen els embrions per a la seva observació amb el medi de muntatge *Fluoramount Mounting Medium*.

7. Obtenció de sonda de RNA

De la mateixa manera que es pot detectar la presència d'una proteïna, es pot detectar l'mRNA que dona lloc a aquesta proteïna.

Es dissenyen una sèrie de reaccions de PCR per tal d'amplificar els fragment del DNA genòmic que ens interessa utilitzant diferents combinacions de *primers*. Un cop tenim les reaccions de PCR, fem córrer el producte de PCR en un gel d'agarosa.

Quantitats per un gel gran d'agarosa:

TAE 1x	150 μL
Agarosa	1,5 gr
Gel Red	1,5 μL

Per a la purificació de bandes utilitzem el kit de GFT CR DNA and Gel Band Purification Kit, seguint el protocol “*For Purifications of DNA from TAE and TBE agarosa gel.*”

- Es talla la banda d'interès, es col·loca en un Eppendorf de 1,5 μ L lliure de DNAsa i s'afegeix 10 μ L de *Capture buffer* per cada 10 mg d'agarosa. Es col·loca el tub a 60°C fins que l'agarosa es dissolgui completament.
- S'afegeixen 600 μ L de *Capture buffer* dins la columna (i el tub col·lector). S'incuba durant 1 minut a temperatura ambient i es centrifuga 30 segons a 16000 rpm. Es descarta el sobrenedant i repetim l'operació.
- S'afegeixen 500 μ L de wash buffer i es centrifuga durant 1 minut a 16000 rpm. Es descarta el tub col·lector i es transfereix la columna dins d'un Eppendorf de 1,5 μ L lliure de DNAsa.
- S'afegeixen 50 μ L d'Elution buffer, s'incuba durant 1 minut a temperatura ambient, es centrifuga durant 1 minut obtenint l'ADN purificat a -20°C.

A fi de **lligar** el fragment que hem amplificat en un vector pGEMT (Figura 23), deixem 1 hora a temperatura ambient les quantitats de productes següents:

- 1 μ L del vector pGEMT
- 1 μ L de lligasa
- 5 μ L de buffer de lligació 2x
- 3 μ L producte de PCR

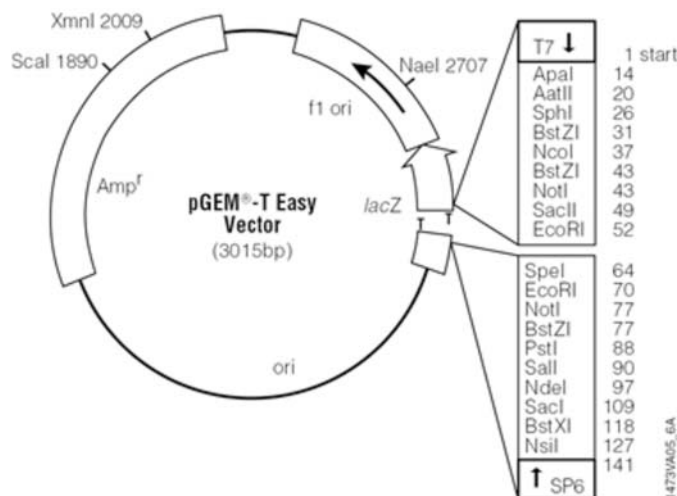


Figura 23. Vector pGEMT - easy

Es descongelen lentament cèl·lules competents, que les tenim emmagatzemades a una temperatura de -80°C , deixant-les 45 minuts en gel, 5 minuts a 37°C . S'afegeix la lligació a les cèl·lules competents i deixem la barreja i un altre minut en gel. Tot seguit s'afegeixen les cèl·lules en una placa on prèviament hem afegit:

- 75 μL de IPTG
- 15 μL de Xgal 8%
- 100 μL de LB + ampicil·lina

La placa es deixa tota la nit protegida de la llum i a 37°C . L'endemà es seleccionen les colònies blanques, que seran les que han incorporat l'íncert i es fan créixer en 2 mL de cultiu líquid, també durant tota la nit. És convenient deixar les plaques ben bé 1 hora a la nevera per tal de poder diferenciar millor el color blau del blanc.

Per tal d'obtenir el **vector amb l'íncert d'interès**, traspassem els cultius en tubs de 2 mL i els centrifuguem a màxima potència durant 1 minut. Descartem el sobrenedant i prosseguim a seguir el protocol de *Gene Jet Plasmid Miniprep Kit*, el punt de partida del qual és el pèl·let, és a dir, les cèl·lules.

- a) Al pèl·let hi afegim:
 - 250 μL de Resuspension Solution (i seguidament s'agita amb el vòrtex)
 - 250 μL de Lysis Solution (i seguidament s'inverteix el tub)
 - 350 μL de Neutralization Solution (i seguidament invertim el tub)Centrifuguem durant 5 minuts i traspassem el sobrenedant en una columna. Tornem a centrifugar durant 1 minut.
- b) Afegim 500 μL de *Wash Solution* i centrifuguem durant 1 minut. Seguidament descartem el sobrenedant. Aquesta operació la repetirem dues vegades. I després centrifuguem la columna "buida" durant 1 minut.
- c) Transferim la columna en un tub nou, afegim 50 μL d'*Elution Buffer* i ho incubem durant 2 minuts. Centrifuguem durant 2 minuts més i guardem el producte final a -20°C .

Per tal de **digerir** el fragment d'interès s'afegeixen en un tub 5 μL de DNA, 2 μL de buffer específic per l'enzim que s'ha utilitzat, 0,3 μL d'enzim i 12,7 μL d'aigua s'incuben 2 hores a 37°C . Seguidament té lloc la **transcripció** de la sonda en la que

s'utilitzen 10µL de buffer de transcripció, 10µL d'ATP/GTP/CTP/UTP Mix, 25µL del DNA linealitzat, 1,25µL d'inhibidor de RNA, 1,5µL de RNA polimerasa (T7 i Sp6) i aigua DEPC fins arribar a un volum final de 50µL, i s'incuba la reacció durant 2 hores a 37° C. Un cop passat aquest temps s'incuba durant 15 minuts a 37° C DNAsaI lliure de RNAsa.

La sonda es precipita amb clorur de liti, i quan s'ha evaporat, es ressuspèn sonda en 20 µL d'aigua i es guarda a -20° C.

8. Hibridació *in situ*

Es fan rentats amb PBT als embrions prèviament fixats (veure apartat 4). Seguidament s'equilibren els embrions amb solució d'hibridació (HS) al 50% en PBT en agitació i es repeteix amb HS sola. La pre-hibridació es fa amb HS durant com a mínim 3 hores a 56°C. Per a la hibridar es dilueix 100µL d'HS amb 1µL de la sonda (o segons concentració convinguda), si la sonda és nova s'ha de bullir 5 minuts i deixar refredar 2 minuts en gel, si és reutilitzada (fins a tres vegades) es posa 5 minuts a 70°C i es deixa refredar 2 minuts més en gel. La sonda es deixa incubant O/N a 56°C.

Es retira i guarda la sonda a -20°C. Es fan rentats a 56°C amb la HS sola, amb HS 50% en PBT i seguidament varis rentats de 20 minuts amb PBT a temperatura ambient. Seguidament es fa la incubació amb 600µL de l'anticòs d'antidigoxigenina (dilució 1/2000 final) en PBT durant 2 hores a temperatura ambient i protegint de la llum. Aquest anticòs, que és comercial de la casa Roche, està conjugat amb fosfatasa alcalina i reconeix la digoxigenina de la sonda. Passades les 2 hores es fan rentats de 20 minuts amb PBT, seguit d'un rentat amb el tampó de la fosfatasa alcalina i per revelar s'afegeixen 490µL de tampó i 10µL de BCIP/NBT. La fosfatasa alcalina desfosforil·la el BCIP donant un producte d'oxidació de color blau fosc. El NBT serveix com a oxidant (**Figura 24**). Durant el revelat s'ha de protegir de la llum i vigilar la reacció.

Tampó fosfatasa alcalina:

	En 10mL
NaCl (4M)	250 µL
MgCl ₂ (1M)	500 µL
Tris (1M i pH 9,5)	1mL
Tween-20 10%	100 µL
H ₂ O	8,2 mL

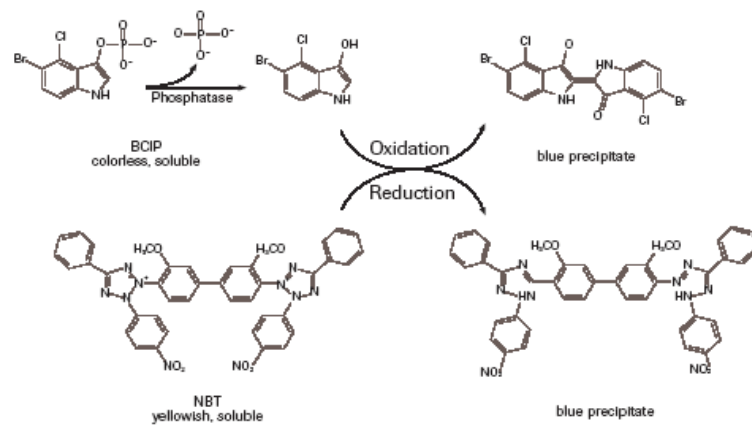


Figura 24. Esquema de la reacció redox generadora de color.

Una vegada el revelat ha adquirit la coloració desitjada s'atura la reacció fent un seguit de rentats amb PBT i finalment es deshidraten els embrions amb glicerol al 70% per a la seva posterior observació. És possible també fer una tinció d'immunofluorescència després de la hibridació *in situ*, en aquest cas abans de la deshidratació amb glicerol, reprendrem el protocol de l'apartat 6.

9. Seqüenciació

Obtenció del ADN genòmic

S'extreu el DNA genòmic dels embrions mutants que ens interessin. En el nostre cas s'utilitzen embrions dels mutants de GA833, GA582. Utilitzant el *Genomic DNA purification protocol Kid*.

- Es decorionen i seleccionen els embrions (GA833/GA833 i GA582/GA582). Es treu el màxim de sobrenedant i s'aixafen els amb un homogenitzador.

S'afegeixen 180µL de *Digestion Solution* i 20µL de proteïnasa K i es deixa 1h a 56°C.

- b) S'afegeixen 20µL de RNAsa A, es vortegen i es deixen 10 minut incubant a temperatura ambient. Afegim 200µL de *Lysis Solution* i s'homogenitzem amb el vòrtex durant 15 segons. Afegim 400µL d'etanol al 50% i es vortege.
- c) Transferim el lisat a una columna col·lectora del kit "*Gene Jet Genomic DNA Purification Column*", es centrifuga durant 1 minut a 6000 rpm i es descarta el tub col·lector.
- d) Es posa la columna en un tub net de 2 mL, s'afegeixen 500 µL de Wash Buffer I i es centrifuga 1 minut a 8000 rpm.
- e) Es descarta el sobrenedant i es traspassa la columna a un altre tub col·lector, on s'afegeix 500 µL del Wash Buffer II. Es centrifuga durant 3 minuts al màxim.
- f) Descartem el tub col·lector i posem la columna en un Eppendorf de 1,5mL on afegim 200 µL de l'*Elution Buffer* per obtenir el DNA genòmic.

El disseny de la PCR, i els processos de purificació de bandes, lligació del fragment, transformació en cèl·lules competents, obtenció del vector amb l'incert d'interès i digestió estan desglossats en l'apartat de l'obtenció de la sonda. Una vegada es tenen els fragments de DNA d'interès s'envien al servei de seqüenciació del PCB. Per l'alineament de les seqüències obtingudes dels mutants GA833 i GA582 s'ha utilitzat el programa CLC Main Workbench.

10. Real time PCR

La RT-PCR, també anomenada qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)), presenta un ventall molt ampli d'aplicacions com ara la quantificació de l'expressió gènica, la detecció de patògens i per mesurar el RNA d'interferència. Normalment, aquesta tècnica es combina amb una transcripció reversa per tal de quantificar el RNA missatger (mRNA) en cèl·lules o teixits.

Extracció del RNA (TRIZOL RNA Isolation Protocol).

S'homogenitza el teixit, embrions en el nostre cas, amb l'aguda d'una punta homogenitzadora amb 500µL de Trizol. S'incuba l'homogenat durant 5 minuts a temperatura ambient i es transfereix el sobrenedant en un tub. S'afegeix 0,1 mL de

cloroform, s'agita la mostra mitjançant un Vòrtex durant uns 15'' i s'incuba a temperatura ambient durant 2' o 3'. Es centrifuguen les mostres a 12.000 rpm durant 15' a 4°C. Després de la centrifugació la mostra es separa en una fase de fenol-cloroform, una interfase, i una fase superior aquosa i incolora que conté el RNA. Es transfereix la fase superior aquosa amb cura a un tub net. Es precipita el RNA de la fase aquosa afegint 250 µL d'isopropil alcohol.

La **RT-PCR** es fa va fer amb l'aparell de Roche LightCycler 480 utilitzant el mètode SYBR Green I d'acord amb les instruccions del fabricant. Els dos jocs de *primers* per *bnl* i pel control *rp49* van ser dissenyats en una zona intraexònica per evitar amplificació de genòmic, utilitzant el Primer Express software (Applied Biosystems). Per avaluar els nivells d'expressió es va extreure el RNA total dels embrions amb Trizol reagent (Invitrogen) seguint el protocol de l'apartat anterior. Els embrions homozigots mutants de *patched* van ser seleccionats manualment gràcies a un gen balancejador amb GFP. Es van preparar els cDNAs amb el RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) utilitzant random hexamer primers. La naturalesa dels productes de la PCR es van confirmar a través dels anàlisis de les "melting curve". Tots els anàlisis posteriors van ser realitzats utilitzant l'eina Relative Expression Software Tool (REST) seguint el manual i les referències. Els passos automàtics principals de REST són els següents: les eficiències de PCR van ser calculades per cada parell de *primers* generant un seguit de corbes estàndards de dilucions creixents de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Es va assumir que *rp49* s'expressa d'una manera quantitativa en els embrions wt i en els embrions mutants, i es va utilitzar com a referència per tal de normalitzar les dades obtingudes. Es va calcular una proporció entre els senyals normalitzats dels gens analitzats en els mutants i en el wt, i es fa expressar l'increment/decreixement, i estadísticament comprovat per un *bootstrap test* (10000 randomizations).

Es van analitzar mostres amb tres replicues per placa, per cada un dels genotips embrionaris testats, utilitzant un conjunt d'encebadors per *bnl*, i cada experiment es va repetir en dues ocasions independents.

11. Monitorització *in vivo* d'embrions de *Drosophila*

Hi ha situacions en que la visualització d'un procés per tècniques moleculars clàssiques no és suficient per explicar un procés complex. Sovint els canvis morfogènètics que es volen observar tenen lloc petit lapse de temps o són molt ràpids, i una manera de poder-los visualitzar és mitjançant l'ús de pel·lícules. Per poder fer això es necessita marcar d'alguna manera allò que es vol veure, i s'ha de fer de tal forma que no s'afecti la viabilitat i el comportament cel·lular. La proteïna ideal per fer això és la GFP (*Green Fluorescent Protein*), que és capaç d'emetre fluorescència quan s'excita amb la llum adequada. A més, és una proteïna que no afecta l'estructura ni el comportament de la proteïna a la que es fusiona, i tampoc resulta tòxica per la cèl·lula, en la majoria de casos.

Pel muntatge de les pel·lícules es van utilitzar embrions *bt1Gal4>UAS-CD8GFP*, wild-type o mutants de *ptc*, i es van muntar per *live imaging* com esta descrit a (Araujo et al., 2007). Les imatges es van capturar amb microscopi confocal Leica TCS-SP5-AOBS i van ser processades utilitzant el programa Fiji (Schindelin et al., 2012). Les seccions van ser enregistrades cada 3 minuts durant 6 – 8 hores.

12. Microscopia

Les preparacions de les cutícules es van observar en un microscopi Axioscop (ZEISS), tant en camp fosc (objectius 4X i 10X) com de contrast de fase (objectiu 20X).

Les immunotincions i les *in situ*s es van observar en un microscopi de camp clar ECLIPSE 80i (Nikon), aprofitant la possibilitat d'emprar el filtre Nomarski (objectius 10X, 20X i 40X).

Les imatges observades en aquests dos microscopis es van recollir amb una càmera digital DXM1200F (Nikon).

Les tincions fluorescents es van sotmetre a microscòpia confocal en un microscopi LEICA TCS SPE (Leica) del laboratori i/o en un microscopi LEICA TCS SP5 (Leica) dels Serveis Científics Comuns del Parc Científic de Barcelona. La composició de les pel·lícules es va realitzar exclusivament en l'últim dels confocals.

Les fotografies han estat capturades utilitzant una càmera adossada al microscopi Nikon Eclipse 80i, amb la possibilitat d'emprar el filtre Nomarski (objectius 10X, 20X i 40X). Les imatges de fluorescència van ser captades a utilitzant la microscòpia confocal (Leica TCS-SPE-AOBS system) .

13. Tractament d'imatges

Els embrions de les figures, si no s'indica el contrari, es troben orientats amb la part anterior a l'esquerra i la part dorsal a dalt.

Les imatges de fluorescència van ser processades utilitzant Fiji (Schindelin J, 2012), ImageJ i Adobe Photoshop. Les imatges són projeccions màximes de les seccions en Z del confocal.

Per obtenir les imatges amb la càmera digital DXM1200F es va fer servir el programa ACT-1 (Nikon). Les pel·lícules i les imatges de confocal es van obtenir amb el programa Leica Application Suite versió 1.5.1, de Leica Microsystems.

14. IMARIS

Per tal de fer el comptatge de les cèl·lules que formen l'arbre traqueal en els embrions *wt*, *ptc^{D130}* i *cycA*, es va utilitzar el software de l'IMARIS, un programa que permet fer reconstruccions en 3D, enumerar i comptabilitzar els elements d'interès, els nuclis de les cèl·lules en el nostre cas. A fi de fer el comptatge reproduïble es van establir els següents procediments:

- Es van tenyir els embrions mutants i *wt* utilitzant l'anticòs contra Trh el qual marca el nucli de les cèl·lules de la tràquea.
- El comptatge es va fer en embrions d'estadis des de placode fins al 14 com a màxim, ja que més endavant les cèl·lules es posicionen cap a l'interior de l'embrió i es fa més difícil el seu seguiment.
- Les imatges van ser capturades amb un microscopi confocal a 0,2 µm.

15. Estadística i gràfics

Els resultats s'expressen com a mitjana aritmètica i variança per a cada un dels grups de valors. Per establir si hi ha diferències significatives entre grups diferents s'aplica el test t de Student. El nivell de significació es representa per $P < 0.01$. Les comparacions es realitzen respecte al grup control (embrions wt), excepte que s'especifiqui el contrari. L'anàlisi de les dades es va realitzar amb el programa Microsoft Excel 2004.

Per les representacions gràfiques de les dades d'alguns dels resultats s'ha utilitzat: Box plot (R version 2.11.1 (2010-05-31) Copyright (C) 2010. The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0) i GraphPad.

RESULTATS

IV. RESULTATS

Els resultats estan dividits en tres grans blocs. El primer fa referència als resultats obtinguts a partir del cribatge de EMS destinat a trobar nous mutants embrionaris implicats en el desenvolupament dels sistemes respiratori i nerviós de *Drosophila melanogaster*, en aquest bloc es descriuen dos exemples de mutants que han estat analitzats. El segon apartat mostra els resultats obtinguts arrel de l'estudi exhaustiu d'un dels mutants del cribatge seleccionats; la contribució de *patched* en el desenvolupament del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. I en el tercer apartat es desenvolupa la contribució de la via de senyalització de Hedgehog en el sistema nerviós de *Drosophila melanogaster*.

1. Cribatges per trobar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal.

1.1. Cribatges de EMS per identificar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal de *Drosophila melanogaster*

Els mutants que es van seleccionar per analitzar en profunditat en el projecte de tesi van ser extrets de dos cribatges o *screens* de EMS (S. Araújo, no publicat). Els dos es van dur a terme per tal de trobar nous gens involucrats en el desenvolupament del sistema nerviós, i van tornar a ser analitzats per tal de trobar, en els embrions mutants que mostraven fenotip en el sistema nerviós, fenotip també en el sistema traqueal de l'embrió. Per l'anàlisi dels fenotips del sistema traqueal es va utilitzar l'anticòs 2A12 el qual ens permet visualitzar el lumen dels tubs.

En el primer cribatge realitzat específicament a fi de detectar defectes en els axons motors (usant FasII), de les 25 línies aïllades per mostrar fenotip en el sistema nerviós, 19 mostraven també defectes a la tràquea, cosa que demostra possibles punts en comú entre els dos sistemes (Taula 1).

Classificació del fenotip traqueal	Mutants
Defectes en les branques ganglionars	B070, B149, D064, B155, C022, H156, F029, G012, B199
Trencaments / Defectes de fusió	D016, F032, D130
Falta de TD	E192, H032, H053
Branques traqueals sinuoses	H158, B260
Altres (desorganització de les BVs)	F003, F029
Sense fenotip significant	F042, C011, E021, B011, D031, B165

Taula 1. Cribatge de EMS realitzat per detectar defectes en els axons motors usant FasII. D'aquesta col·lecció de mutants es va escollir el D130 per a la seva posterior caracterització.

Es va dissenyar un segon cribatge de la mateixa manera que l'anterior on també es van trobar que part dels mutants presentaven fenotip en el sistema traqueal (Taula 2).

Classificació del fenotip traqueal	Nombre de mutants
Similars al fenotip salvatge / Sense fenotip significant	17
Defectes en les branques dorsals	6
Absència del tronc dorsal	3
Defectes en la formació del lumen	7
Absència parcial de branques	10
Defectes en les branques ganglionars	33
Defectes de fusió	7
Defectes severes en la tràquea i morfològics en general	15
Total	98

Taula 2. Cribatge de EMS realitzat per detectar defectes en sistema nerviós. D'aquesta col·lecció es van analitzar els diferents mutants de fusió, i finalment es va escollir el GA833 per a la seva posterior caracterització.

Dels dos cribatges es van seleccionar els mutants que produïen mutacions en el cromosoma II. Del primer es van seleccionar alguns mutants per tal de fer-ne un anàlisi més extensiu, entre ells els que presentaven trencaments, defectes de fusió, absència del tronc dorsal i alguns amb defectes en la formació del lumen traqueal. Finalment, de tots els mutants seleccionats prèviament, es va escollir la mutació D130 i GA833 per analitzar-les amb més profunditat.

A fi d'esbrinar on estaven localitzades en el cromosoma les diverses mutacions dels gens obtinguts ens els cribratges, es va utilitzar el kit de deficiències del cromosoma II de *Bloomington Drosophila Stock Center (2008)*. Per tant, es va creuar cada un dels mutants amb la bateria de deficiències, molecularment definides, i en els creuaments que mostraven letalitat es va comprovar el fenotip traqueal embrionari per tal de descartar altres mutacions que afectessin aquest sistema.

1.2. La mutació GA833 presenta defectes de migració i fusió

La mutació GA833 juntament amb la GA582 presenten defectes de migració i fusió cel·lular (Figura 25). Les dues mutacions van resultar ser al·lels del mateix gen ja que en creuar-les entre si no complementen i mostren el mateix fenotip, així doncs es va decidir seguir treballant amb la caracterització de l'al·lel GA833.

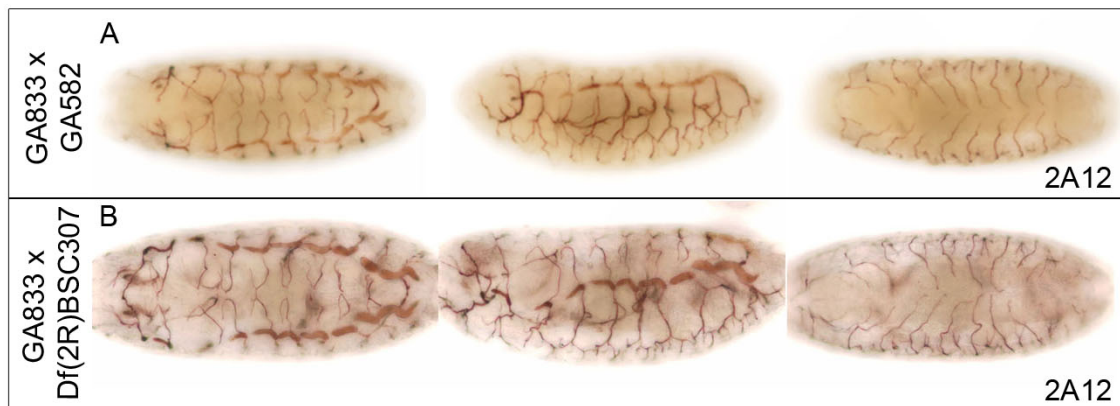


Figura 25. Fenotip del sistema traqueal embrionari dels mutants GA833/GA582 i GA833/Df(2R)BSC307, en visió dorsal, lateral i ventral (d'esquerra a dreta). (A) Embrió transheterozigot dels mutants GA833/GA582. (B) embrió GA833 / Df(2R)BSC307. Vegi's com els defectes de fusió de les cèl·lules, evidents sobretot en el TD i les cèl·lules difusió de les BD. El lumen dels embrió està marcat amb l'anticòs monoclonal 2A12.

Vegi's en la Figura 26, tan en la visió dorsal com lateral de l'embrió, com els diferents parasegments del TD no fusionen. En el detall ampliat de la visió lateral de l'embrió, es pot observar com també presenta el fenotip de fusió a nivell del TL, en comparació amb l'embrió wt. En el marcatge amb Trh, que marca les cèl·lules de la tràquea, es pot veure com no és només el lumen que no fusiona unint els parasegments adjacents de la tràquea, sinó que hi no hi ha una continuïtat cel·lular, fet que indica que es tracta d'un problema en cèl·lules de fusió o de migració cel·lular.

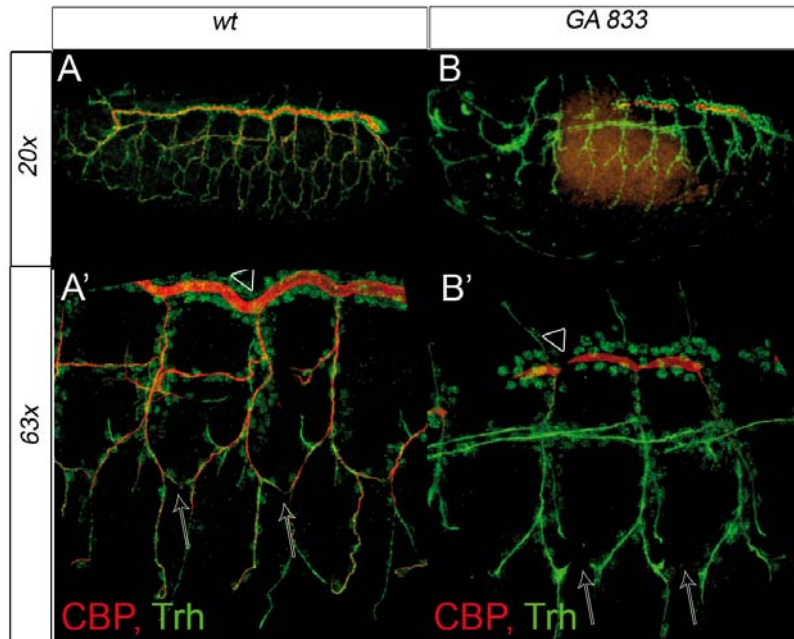


Figura 26. Fenotip de la mutació GA833. (A) Embrió wt i A' ampliació de l'embrió wt. (B) Embrió GA833 i B' ampliació de l'embrió GA833. Vegi's en el detall de la visió lateral com el lumen dels parasegments adjacents del TD no fusionen (punta de fletxa) i com els nuclis de les cèl·lules que formen el sistema traqueal no omplen els espais que queden buits entre els lúmens adjacents. S'observa també una falta de fusió en les branques laterals (fletxes). En tots els panells anterior és a l'esquerra.

La mutació GA833 va ser mapada utilitzant com s'ha esmentat prèviament el kit de deficiències del cromosoma II de *Bloomington Drosophila Stock Center (2008)* per un test de complementació.

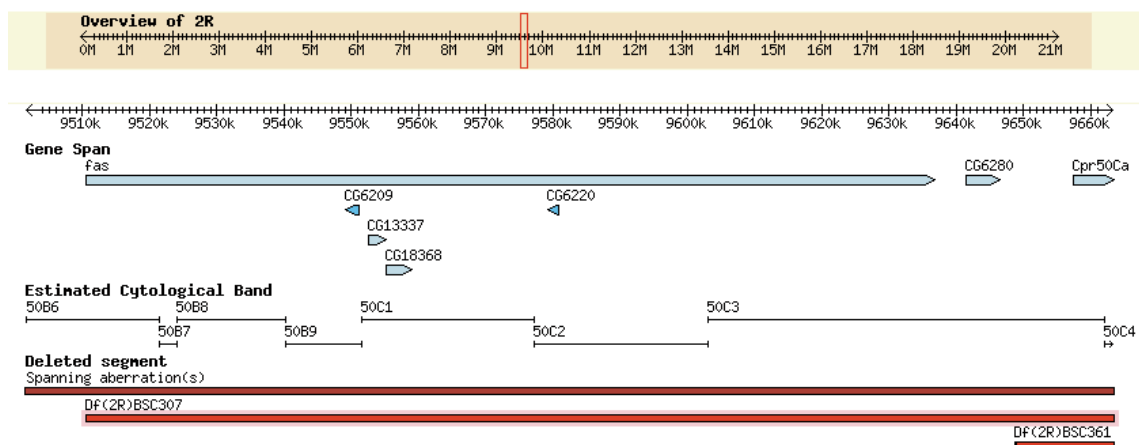


Figura 27. Mapa citològic de la regió del braç dret del cromosoma II que comprèn la mutació GA833. La deficiència amb la qual no complementa la mutació GA833, Df(2R)BSC307/CyO, conté 6 mutants: *fas*, CG6280, CG6209, CG6220, CG13337, CG18368.

A través d'un test de complementació es va veure que el mutant GA833 no complementava amb la deficiència Df(2R)BSC307/CyO, però aquesta està solapada per un extrem per la deficiència Df(2R)BSC361, amb la que el mutant GA833 sí que complementava. Així doncs es va poder acotar que la mutació estava localitzada en el braç dret del cromosoma II, 2R:9510513;9613158 i la localització en el mapa citològic és entre les posicions 50B6;50C3 (FlyBase Gene Report) (Figura 27).

La deficiència amb la qual no s'observa complementació avarca 6 possibles gens candidats a correspondre a la mutació GA833: *fas*, CG6280, CG6220, CG6209, CG13337 i CG18368. Gràcies a la informació addicional sobre nivells d'expressió d'aquests gens en diferents moments del desenvolupament que proporciona el modENCODE (The modENCODE Consortium, 2010), vam poder determinar que els candidats CG6220, CG6209, CG13337 i CG18368 no s'expressen en estadis embrionaris del desenvolupament de *Drosophila*, amb la qual cosa van ser descartats. Per altra banda, els gens *fas* i CG6280 sí que mostraven expressió en estadis embrionaris (Figura 28).

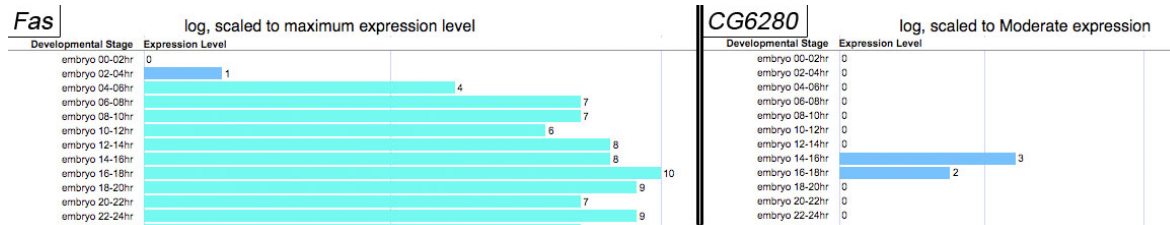


Figura 28. Esquema dels nivells d'expressió dels gens *fas* i CG6280 en diferents moments del desenvolupament embrionari segons modENCODE. Vegi's com el gen *fas* s'expressa, tot i que a nivells baixos, en bona part del desenvolupament embrionari, i el gen CG6280 s'expressa també a nivells baixos però més restringit entre els estadis més tardans del desenvolupament.

Així doncs es va procedir en la validació dels dos possibles candidats restants *fas* i CG6280, que sí que mostraven expressió en estadis embrionaris.

- *fas* (*faint sausage*), es troba citat a la base de dades de FlyBase amb la simbologia Dmel\fas (CG17716, FBgn0000633), i ha estat descrit per a produir defectes en la migració neuronal, en la segregació de progenitors neuronals, i en el guiatge axonal (Lekven et al., 1998).

A fi de comprovar si la mutació GA833 es troba en del gen *fas*, es van fer tests de complementació amb diferents mutants de *fas*¹, *fas*⁰⁵⁴⁸⁸ i *fas*^{EY03881} i cap de les complementacions realitzades va mostrar letalitat, és a dir, tots els creuaments van complementar entre si, concloent que el gen mutat en GA833 no és el gen *fas*.

- Del gen CG6280 no hi ha mutants disponibles, així que es va procedir en la construcció d'una sonda de RNA per tal de detectar si en el mutant embrionari de GA833 s'observa l'expressió de del gen CG6280 (veure l'apartat de materials i mètodes) (Figura 29).

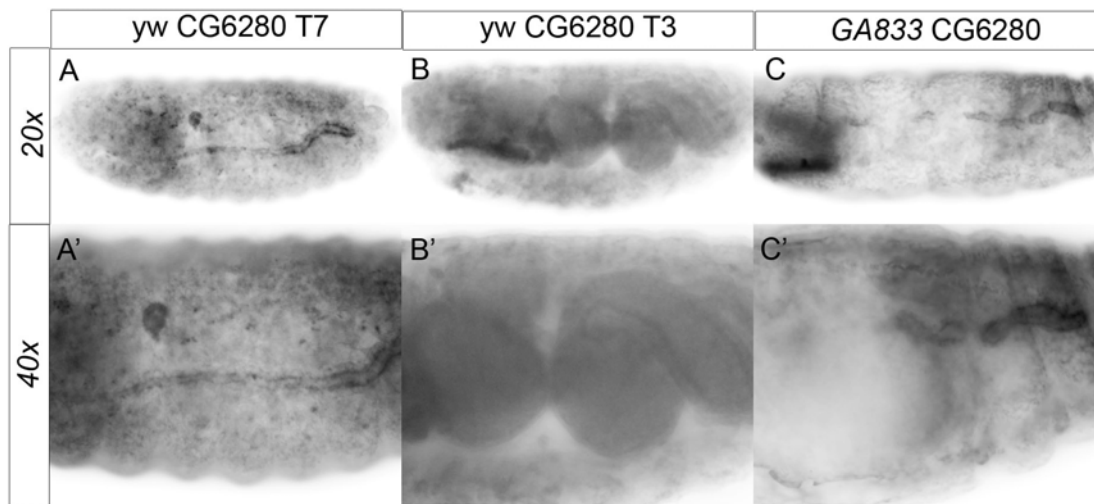


Figura 29. *In situ* amb la sonda del gen CG6280. (A) Embrió yw on es pot observar l'expressió del mRNA de CG6280 al TD. (B) Embrió yw control. (C) Embrió GA833 on es pot observar l'expressió del mRNA de CG6280 al TD. En tots els panells anterior és a l'esquerra.

Tal i com es pot apreciar en la Figura 29, el mRNA CG6280 s'expressa a nivell del TD de l'embrió wt de manera específica (Figura 29A i 29A'), ja que si comparem amb la *in situ* utilitzant la sonda T3 (*sense*) no s'observa cap mena d'expressió (Figura 29B i 29B'). Pel que fa referència a la *in situ* de CG6280 en la mutació GA833, es pot detectar també expressió del mRNA en el TD (Figura 29C i 29C'), tal i com passa en els embrions yw. Aquest fet no implica que la mutació GA833 no estigui present en el gen CG6280, ja que podria ser que es detectés el mRNA però la proteïna resultant fos aberrant o no funcional. Finalment es va procedir a la seqüenciació del gen, però només es va poder seqüenciar parcialment.

1.3. La mutació D130 afecta al gen *patched* (*ptc*)

La mutació D130 va ser mapada prèviament al laboratori (Mesquita, D. and Araújo, S. no publicat), utilitzant com s'ha esmentat prèviament el kit de deficiències del cromosoma II de *Bloomington Drosophila Stock Center* (2008), i va resultar ser un al·lel mutant del gen *ptc*. El gen *ptc* es troba citat a la base de dades de FlyBase amb la simbologia de Dmel\ptc (CG2411, FBgn0003892), i es tracta d'un gen codificant per la proteïna Ptc de *Drosophila melanogaster*. Es troba localitzat en el braç dret del cromosoma II, 2R:4,537,154..4,552,728 i la localització en el mapa citològic és 44D5-44E1 (FlyBase Gene Report) (Figura 31).

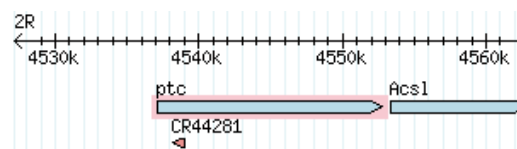


Figura 31. Mapa citològic de la regió del braç dret del cromosoma II que comprèn la mutació de *ptc*. Regió 2R:4,537,154..4,552,728 i localització en el mapa citològic és 44D5-44E1 (FlyBase Gene Report).

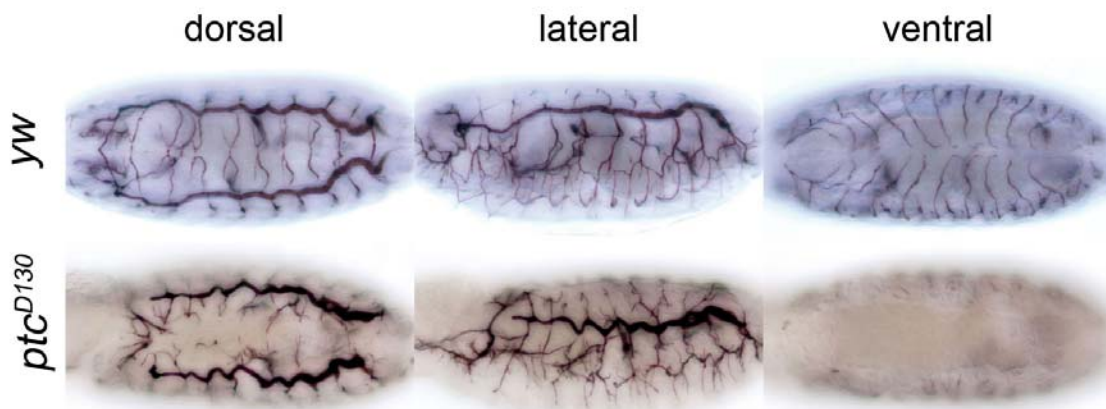


Figura 30. Fenotip del sistema traqueal en l'estadi 16 embrionari. Vegi's com en l'embrió *yw* les 20 BG penetren en el SNC, mentre que l'embrió mutant de *ptc^{D130}* les BG no s'estenen correctament i no entren al SNC. El lumen del sistema traqueal es troba marcat amb l'anticòs 2A12. Es pot apreciar també la sinuositat del TD en la visió lateral de l'embrió mutant de *ptc^{D130}* així com la manca de fusió per part de les BD en la visió dorsal.

El sistema respiratori del mutant de *ptc^{D130}* va ser analitzat mitjançant una tinció immunohistoquímica utilitzant l'anticòs 2A12, el qual reconeix elements del lumen traqueal de tal manera que permet l'observació dels tubs. Com a principal característica del fenotip traqueal de l'embrió mutant de *ptc^{D130}*, cal destacar la manca de migració de les branques ganglionars (Figura 30).

2. Els mutants embrionaris de *ptc*^{D130} presenten fenotip en els sistemes respiratori i nerviós

Patched (Ptc) és una proteïna transmembrana que actua com a receptor negatiu de la via de senyalització de Hh. Quan Ptc s'uneix al lligand de la via, Hh, el complex s'internalitza i es permet a Smo que es desplaci cap a la membrana plasmàtica i activi la via de senyalització de Hh. Quan no hi ha presència del lligand, Ptc s'uneix a Smo, reprimint així que es pugui produir l'activació de la via de Hh. En una situació on Ptc no hi és present, o bé no és funcional, la via romandrà constitutivament activada.

Tal i com s'ha vist breument en l'apartat 1.3 dels resultats, la principal característica del fenotip traqueal de l'embrió mutant de *ptc*^{D130}, és la manca de migració de les BG. En l'embrió salvatge (wt) es pot observar la presència de 20 BG que envaeixen el sistema nerviós central (SNC), mentre que en l'embrió mutant de *ptc*^{D130} les BG no arriben a penetrar-lo. A part d'aquesta característica, la mutació de *ptc*^{D130} presenta altres distintius, com per exemple a la part lateral, on en l'embrió wt es pot observar el TD recte i continu, mentre que en l'embrió mutant de *ptc*^{D130} el TD mostra una forma sinuosa i en alguns casos s'observen defectes en la fusió dels segments adjacents. En la part dorsal de l'embrió wt es pot observar com les BD d'una banda i altra de l'embrió fusionen a la línia mitjana dorsal, mentre que en l'embrió mutant de *ptc*^{D130} no només no es produeix la fusió d'aquestes branques, sinó que aquestes solen ser més curtes i sovint formen bifurcacions (Figura 32).

En la figura es comparen diferents estadis embrionaris entre embrions que contenen un BtlmoeRFP, el qual no presenta fenotip i com que s'expressa en totes les cèl·lules de la tràquea ens permet distingir la morfologia cel·lular, i embrions mutants de *ptc*^{D130};BtlmoeRFP, durant els quals té lloc el desenvolupament traqueal. En aquest cas s'ha utilitzat un marcatge anti-RFP, per tal de poder comparar la morfologia de les cèl·lules que formen l'arbre traqueal. Vegi's com des d'estadis molt primerencs del desenvolupament traqueal, estadis 12 i 13 (Figura A-A', B-B', E-E' i F-F'), ja es poden apreciar certs problemes de migració de les BG així com també del TL. En l'estadi 14 del desenvolupament traqueal embrionari en els embrions BtlmoeRFP es pot diferenciar clarament la migració de les BG, mentre que al mateix estadi en embrions mutants de

ptc^{D130};BtlmoeRFP, aquesta migració ja no es produeix correctament, quedant les branques estancades en el mateix nivell que el TLa. A mesura que s'avança en el desenvolupament (estadi 15 Figura D i H) i els embrions BtlmoeRFP mostren l'estereotipat arbre traqueal, mentre que en els embrions mutants *ptc^{D130}*;BtlmoeRFP s'observen evidents problemes de migració cel·lular.

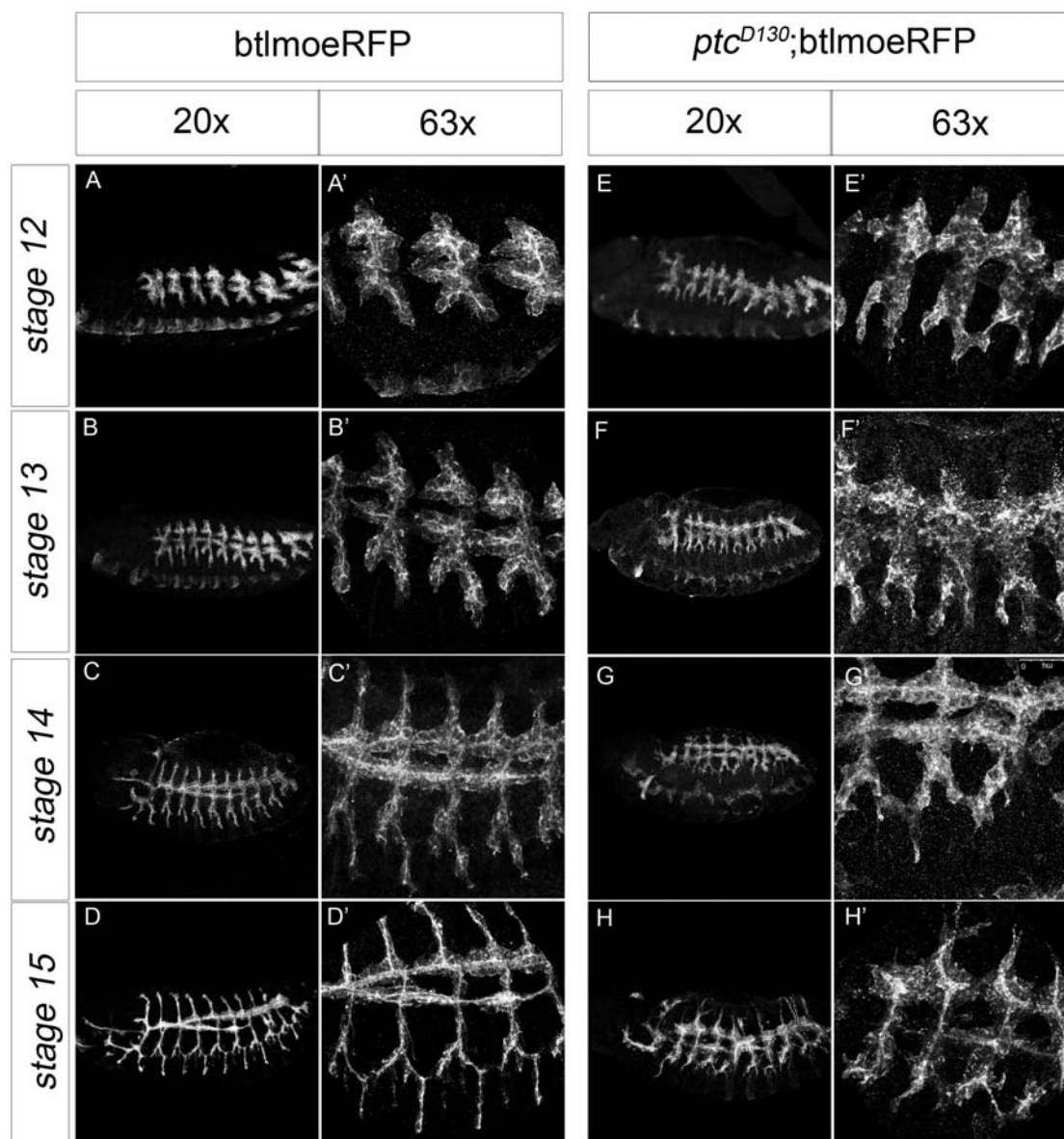


Figura 32. Fenotip del sistema traqueal d'embrions wt i *ptc^{D130}* en diferents estadis embrionaris. Vegi's com ja en estadis primerencs (A-A' i E-E') s'observa una migració desigual entre les dues branques que migren cap a la part ventral de l'embrió. Tots els embrions han estat marcats amb un anticòs anti-RFP.

Pel que fa referència al sistema nerviós, el mutant de *ptc^{D130}* ja havia estat descrit per mostrar defectes en el guiatge axonal en el CNV de *Drosophila* i per presentar menys neurones (Patel et al., 1989; Merianda et al., 2005) cosa que suggereix una possible implicació de la via de senyalització de Hh durant el desenvolupament del SNC. L'al·lel mutant de *ptc^{D130}* va ser analitzat utilitzant dos anticossos diferents: en primer lloc l'anticòs anti-FasciclinII (FasII) que detecta una molècula d'adhesió cel·lular la qual ens permet reconèixer, en embrions d'estadi 15 o més, tres filaments axonals principals. Si s'observen les tincions de FasII en l'embrió wt es poden distingir els tres feixos d'axons diferenciats que transcorren paral·lels a banda i banda de la línia ventral mitja de l'embrió. En els embrions mutants de *ptc^{D130}* la línia mitjana longitudinal no fascicula al llarg del cordó nerviós, i es troba creuant anormalment la línia mitjana i formant feixos amb els axons de la banda contra lateral de l'embrió. Els feixos creuen la línia mitjana ignorant les senyals repel·lents d'axons com són Slit a la línia mitjana i Robo en els cons en creixement (Figura 33).

L'altre marcatge emprat per l'anàlisi del SN és el l'anticòs BP102, el qual ens destaca un panorama axonal més general, mostrant un dibuix típic d'una escala a l'alçada de la línia mitjana i perfilant les commissures formades pels axons que creuen la línia ventral mitja. En el cas del mutant embrionari de *ptc^{D130}* s'observa com les commissures col·lapsen les unes amb les altres, i com es produeixen trencament a nivell dels connectors.

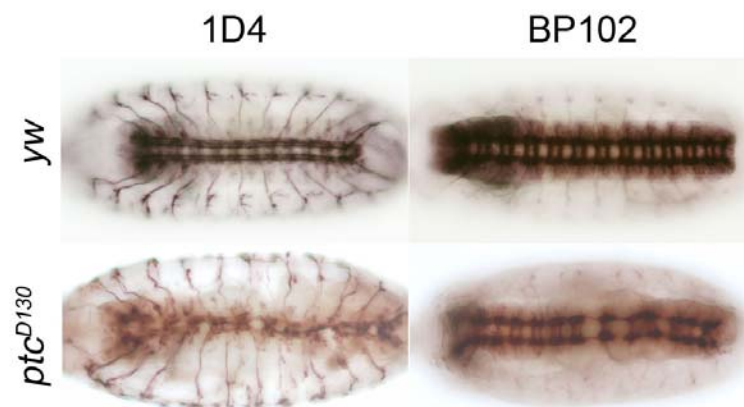


Figura 33. Fenotip del sistema nerviós en estadi 15-16 embrionari. Vegi's l'embrió salvatge i l'embrió mutant de *ptc^{D130}* marcat amb els anticossos anti-FasII (1D4) i BP102.

La caracterització i posterior anàlisi del fenotip del SN del mutant de *ptc^{D130}* així com altres elements de la mateixa via de senyalització de Hh, seran analitzats en el tercer gran bloc de resultats on tractarem amb detall el SN.

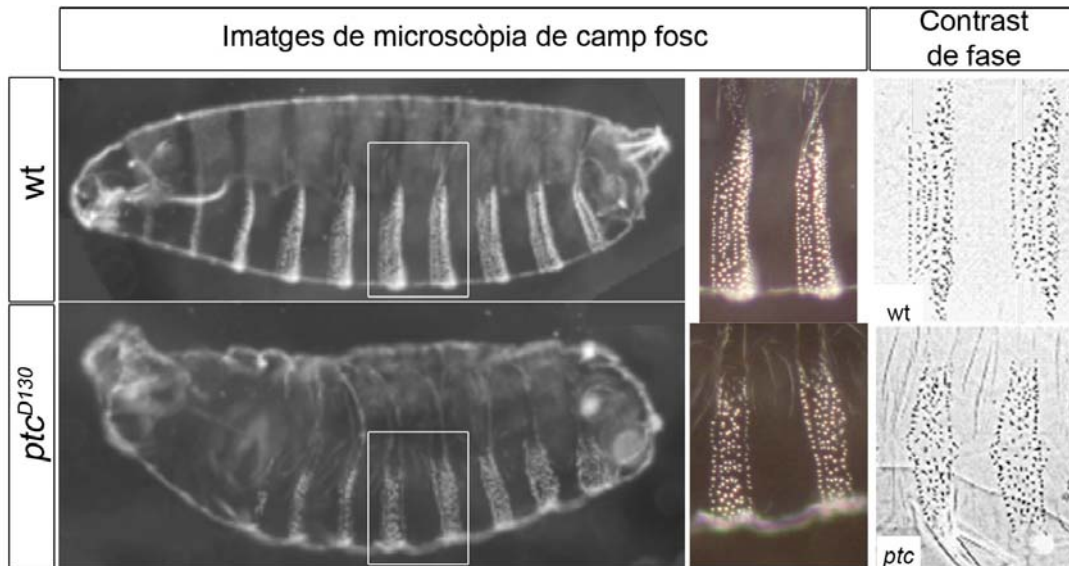


Figura 34. Fenotip de les cutícules de les larves 1 (L1) de wt i mutants de *ptc^{D130}*. Vegi's en les ampliacions de les cutícules, la duplicació del cinturó de denticles en el cas del mutant de *ptc^{D130}* en comparació amb la larva wt. Imatges de contrast de fase adaptades de (Bejsovec and Wieschaus, 1993).

A fi de caracteritzar millor el fenotip del mutant de l'al·lel *ptc^{D130}*, es va analitzar el patró que presenta la cutícula en estadi larvari. Cada segment de la larva de *Drosophila* mostra un patró organitzat d'estructures cuticulars, que reflecteixen la diversitat d'identitats cel·lulars de l'epidermis. Els embrions wt de *Drosophila* secreten un patró segmental i repetit d'estructures cuticulars que reflecteix un alt grau d'informació posicional dins de cada segment (Lohs-Schardin et al., 1979; Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). La superfície ventral de cada segment abdominal està cobert per un cinturó denticular i una zona lliure de cutícula. Un cinturó denticular consisteix en 6 files de denticles, cadascun amb una morfologia lleugerament diferent. A la Figura 34 es pot observar el patró dels denticles cuticulars en una larva (L1) wt i en una larva mutant per l'al·lel *ptc^{D130}*. Vegi's en les fotografies ampliades del fenotip denticular com, mentre que en la larva wt cadascuna de les 6 fileres que formen el cinturó denticular presenten una mida i formes específiques, en la larva mutant de *ptc^{D130}* el patró de denticles mostra una imatge especular, una duplicació de la part anterior de cada cinturó denticular, descrit prèviament (Bejsovec and Wieschaus, 1993).

2.1. L'al·lel mutant de *ptc*^{D130} presenta extensió fil·lopodis tot i no mostrar migració de les BG

Per tal de comprovar si l'absència de migració de les BG era deguda a una falta de migració de d'extensions filopodials, es va analitzar el comportament *in vivo* de les branques terminals en els embrions mutants de *ptc*. L'homòleg de FGF que codifica el gen *bnl* s'expressa a les cèl·lules adjacents a l'extrem de les branques que han de migrar, actuant com un quimioattractant per les cèl·lules de la tràquea. En absència de Bnl o del seu receptor Btl, no es produeix la migració de les cèl·lules traqueals (Sutherland et al., 1996). Les cèl·lules traqueals responen al senyal quimioattractant de Bnl amb la formació d'extensions dinàmiques de filipodis (Ribeiro et al., 2002).

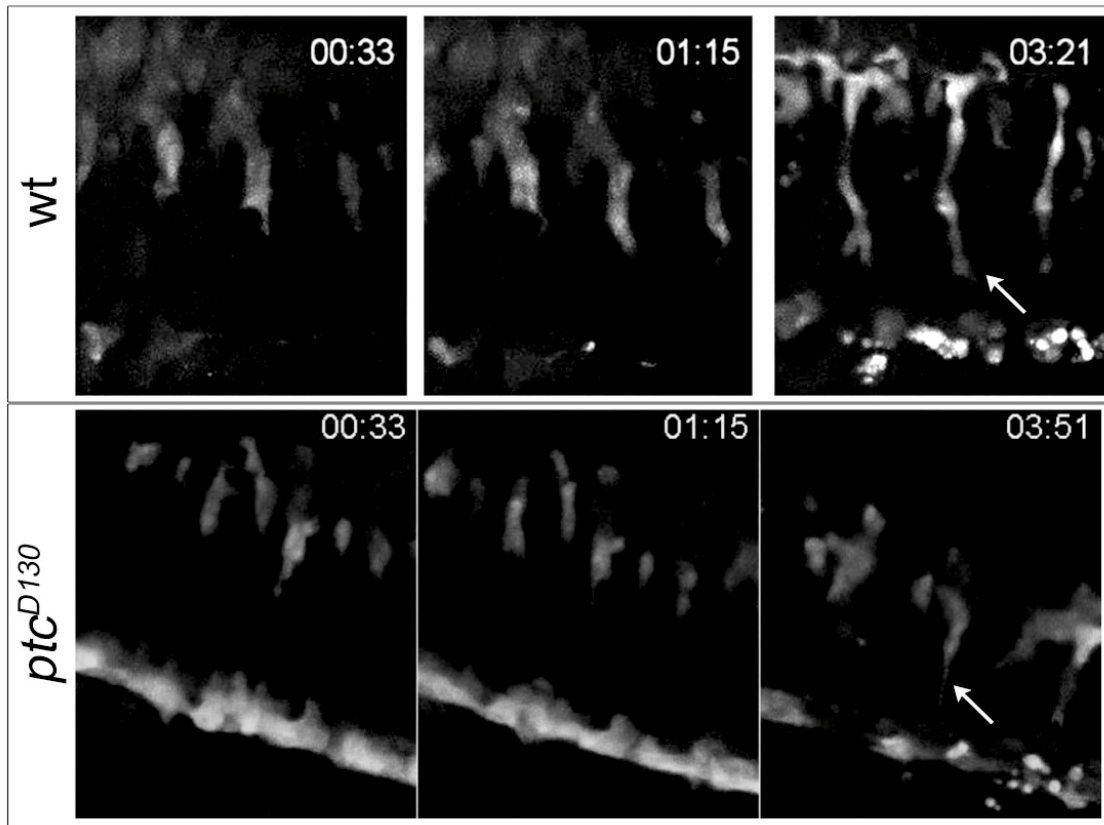


Figura 35. Imatges on es mostren tres captures en lapses de temps diferents dels anàlisis *in vivo* d'embrions wt i dels mutants embrionaris de *ptc*. Vegi's com en els embrions wt, al final de l'embriogènesi (minut 3:21), les GBs han assolit el SNC. En els embrions mutants de *ptc*, les BGs, tot i no arribar fins al SNC, s'observen la formació d'extensions filopodials de la cèl·lula terminal (minut 3:51).

A mesura que les BG migren cap al SNC, en els embrions wt es poden observar prominent extensions cel·lulars de la cèl·lula terminal de les BGs. En els mutants de *ptc*, a pesar dels clars problemes durant la migració de les branques descrits anteriorment, també es van poder detectar extensions dinàmiques en les cèl·lules terminals de les BG (Figura 35). Fet que significa que si aquestes branques no migren correctament no és per la falta d'extensions filopodials.

2.2. L'al·lel mutant de *ptc*^{D130} presenta una mutació puntual

Per tal de determinar la naturalesa de la mutació de l'al·lel mutant embrionari de *ptc*^{D130}, es van seqüenciar aquest l'al·lel en dues ocasions independents i separades en el temps. El resultat de la seqüenciació va ser una mutació puntual a la posició 395, que correspon al primer *loop* extracel·lular de la proteïna. Aquesta mutació puntual es tracta d'una transició que provoca un canvi d'aminoàcid de Glutamina (CAG) a un codó STOP (TAG), provocant així un trencament de la proteïna i eliminant tota possible funció.

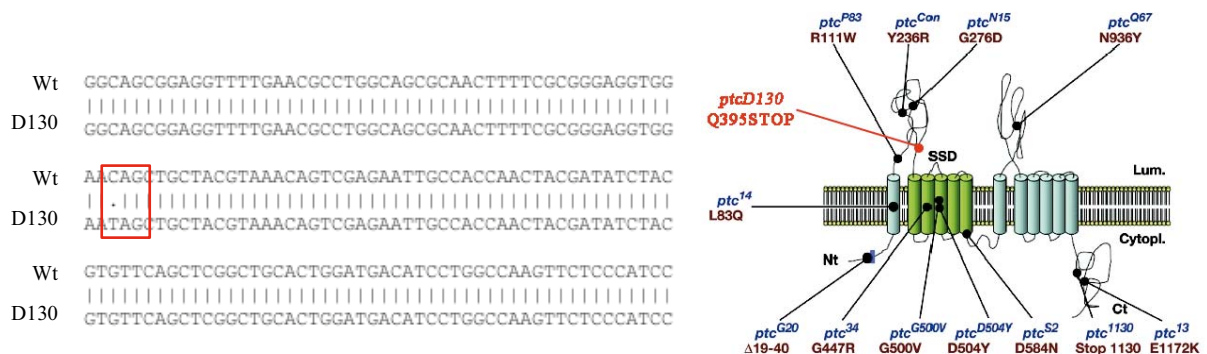


Figura 36. (A) Fragment de la seqüenciació del gen *ptc*. Vegi's la mutació puntual del gen de *ptc* assenyalada amb un requadre on no hi ha homologia entre les dues seqüències. **(B) Esquema de la proteïna de Ptc** on es troben situades algunes de les diferents mutacions al·lèliques de *ptc* descrites a la literatura. Vegi's en vermell la nova mutació de l'al·lel de *ptc*^{D130} que s'està descrivint en aquest manuscrit (Esquema de la proteïna de Ptc adaptat de (L. Quijada, 2006)).

Tal i com es pot veure a la Figura 36, la mutació resultant *ptc*^{D130} dona lloc a una proteïna truncada, la qual no és funcional ja que no permet la unió amb el lligant Hh i per tant la via es manté activa constitutivament. Tot i això, utilitzant un anticòs anti-Patched, es pot detectar la proteïna en els embrions mutants, ja que aquest anticòs reconeix el primer fragment de Ptc, justament el que es manté tot i la mutació puntual en els mutants de *ptc*^{D130}. Vegi's en la figura un esquema de l'estructura de la proteïna

Ptc, la qual recordem que es tracta d'una proteïna transmembrana, en la que es veu destacat el domini *sterol-sensing* en verd, i en vermell la posició de la mutació puntual del nou al·lel de *ptc*^{D130} que estem descrivint.

2.3. Patched s'expressa en la part anterior de cada parasegment de l'embrió coincidint amb cèl·lules traqueals.

A fi de conèixer la localització de la proteïna Ptc, es van analitzar els diferents estadis embrionaris emprant diferents mètodes. D'una banda es va utilitzar l'anticòs de Ptc, el qual mostra un marcatge en un patró de punts, ja que reconeix la proteïna un cop aquesta ha estat internalitzada dins les vesícules (Torroja et al., 2004). D'altra banda, i degut a que sovint en estadis més avançats del desenvolupament es fa difícil seguir el marcatge de l'anticòs, es va utilitzar un "enhancer trap" de Ptc (Ptc-LacZ), el qual ens mostra l'expressió d'aquesta proteïna d'una manera nuclear. Cal tenir en compte, que l'expressió del *enhancer trap* pot presentar una part artefactual, ja que perdura més temps i pot tenir una degradació més tardana. Tot i això s'ha verificat la correcta utilització del Ptc-lacZ amb un marcatge immunohistoquímic d'embrions Ptc-lacZ amb anticossos anti- β gal i amb l'anticòs anti-Ptc per observar que tot i perdurar més en el temps, ambdues tincions coexisteixen en els estadis del desenvolupament traqueal de l'11 al 16.

En els estadis primerencs del desenvolupament de l'embrió, s'observa com en la placode Ptc s'expressa a la part anterior de cada segment (Glazer and Shilo, 2001) (**Figura 37**). En la figura A es poden veure les cèl·lules traqueals d'un embrió wt marcades amb *btlGFP* (verd) i la proteïna endògena de Ptc (vermell). Cal remarcar que Ptc té una vida mitja curta i està en constant reciclatge dins de vesícules (Torroja et al., 2004), i és per aquest motiu que amb l'anticòs de Ptc el veiem puntejat, ja que el que realment estem detectant és la proteïna dins les vesícules. Així doncs, en la Figura 37A es pot observar com Ptc s'expressa seguint un patró de bandes a l'embrió, i que aquestes creuen la placode. En la Figura 37B veiem els nuclis de les cèl·lules de la tràquea en blau (*Trh*), i es pot observar la proteïna de Ptc endògena de l'embrió en vermell, així com també totes les cèl·lules que expressen Ptc, ja que en aquest cas hem utilitzat com a *driver* un PtcGAL4 amb una proteïna de membrana UASsrcGFP, de tal manera que visualitzem en verd l'expressió de Ptc. Tot i així, aquesta tinció pot tenir una part

d'artefactual, de la mateixa manera que l'*enhancer trap*, degut a que la GFP perdura en el temps. Mirant en detall una placode (Figura 37B') es pot veure com efectivament Ptc es troba dins les cèl·lules de la tràquea, i alhora es pot acotar que es troba preferentment a la part més apical de la placode.

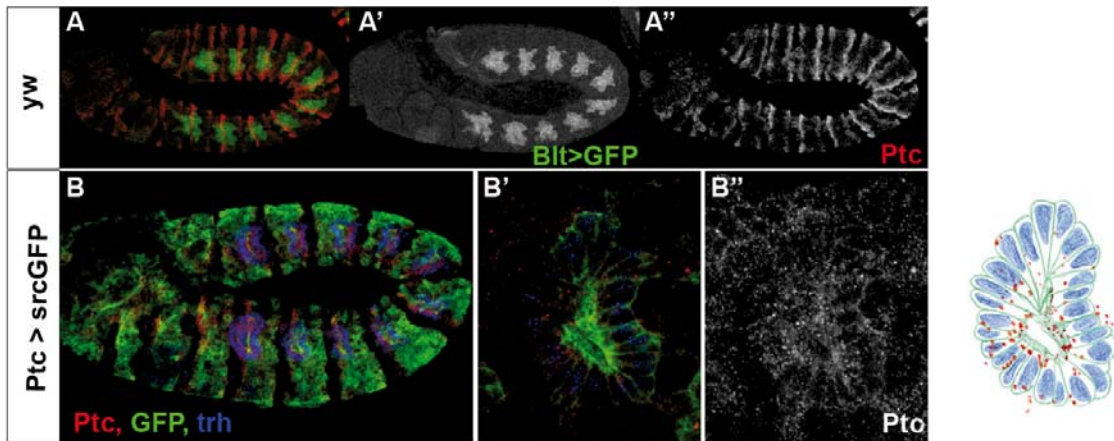


Figura 37. (A) Embrió yw marcat amb Btl>GFP i l'anticòs anti-Ptc. Vegi's com la proteïna de Ptc es pot detectar dins les cèl·lules que formen el sistema traqueal, les quals es visualitzen amb el marcatge del Btl>GFP. **(B) Embrió Ptc>srcGFP.** Es poden visualitzar alhora l'expressió de la proteïna endògena de Ptc amb l'anticòs anti-Ptc, i el domini d'expressió de la mateixa dirigint l'expressió de la proteïna GFP en les cèl·lules que expressen Ptc utilitzant un PtcGAL4. Vegi's en el detall d'una de les placodes (B' i B'') com la proteïna endògena de Ptc s'expressa a la part més apical de la placode.

Per veure l'expressió de Ptc més avançada en el desenvolupament, s'ha utilitzat també l'*enhancer trap* de Ptc (Ptc-LacZ), ja que ens permetrà una visualització nuclear de l'expressió proteica, la qual cosa dona una visió molt més clara que no pas la tinció puntejada de l'anticòs anti-Ptc. En la Figura 38 es pot veure que tant en l'estadi 12 com en el 13, l'expressió de Ptc és present a les cèl·lules de les tràquea, però també és important destacar l'expressió de Ptc en les cèl·lules que rodegen les cèl·lules de la tràquea. Noti's en les projeccions amb una sola secció que les cèl·lules que expressen Trh també expressen Ptc. En estadis més tardans, del 14 en endavant, l'expressió de Ptc es restringeix en una simple filera de cèl·lules i l'expressió dins les cèl·lules de la tràquea no és sempre tan evident, però sí que ho és l'expressió en algunes de les cèl·lules que envolten la tràquea (fletxes de la Figura 38). Vegi's que en tots els estadis de la Figura 38, s'observen les cèl·lules que expressen Ptc però que no formen part de l'arbre traqueal, i aquestes troben localitzades entre les BGs i BVs anterior i la seva expressió es manté durant tot el desenvolupament.

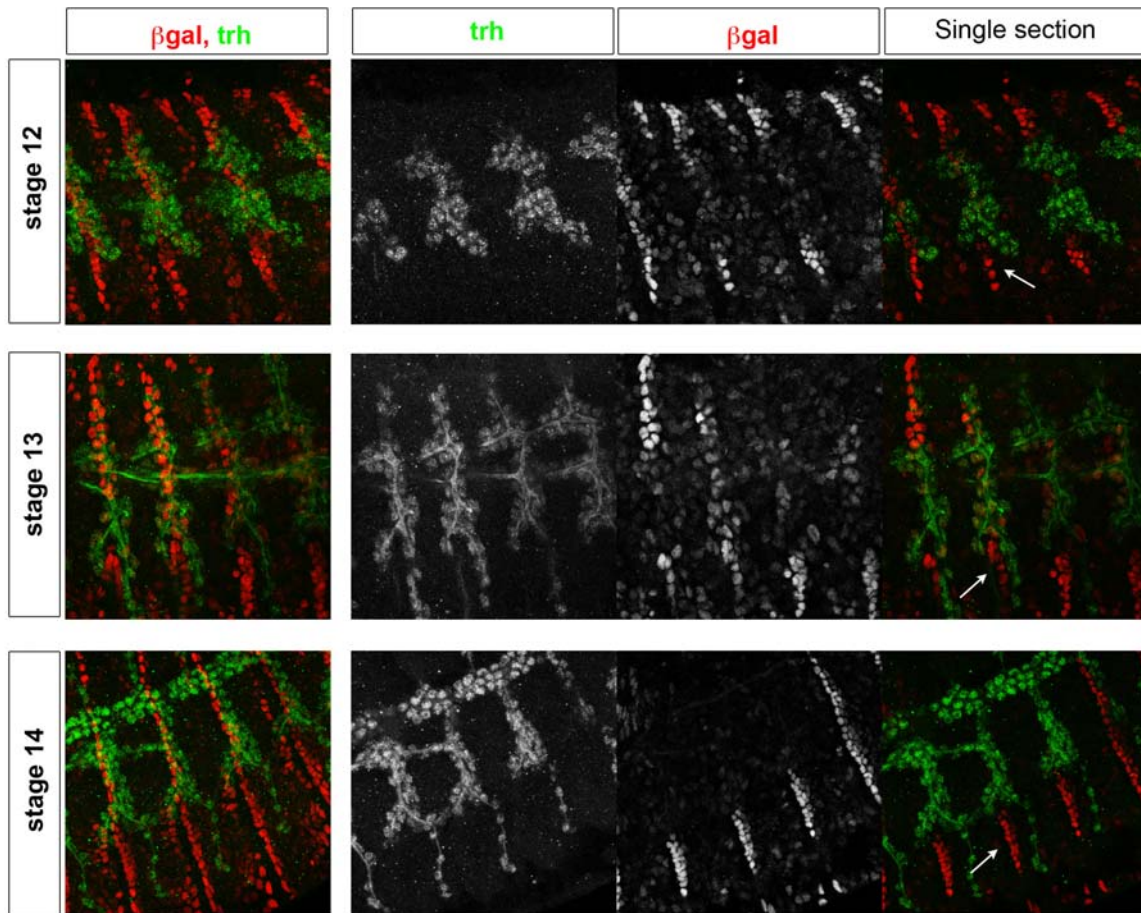


Figura 38. El sistema traqueal s'ha marcat amb la proteïna Trh, que s'expressa en els nuclis de les cèl·lules de la tràquea, i el domini d'expressió de Ptc es pot detectar amb el marcatge del β gal. (A) Embrió Ptc-lacZ d'estadi embrionari 12. Vegi's com la proteïna de Ptc es pot detectar dins les cèl·lules que formen el sistema traqueal, així com també en les cèl·lules que envolten el placode. (B) Embrió Ptc-lacZ d'estadi embrionari 13. Es pot observar la colocalització dels dos marcatges, Ptc i β gal, tant dins com fora de les cèl·lules de la tràquea. (C) Embrió Ptc-lacZ d'estadi embrionari 14. A partir d'aquest estadi l'expressió de Ptc es redueix dins de les cèl·lules traqueals però segueix sent present a les cèl·lules del voltant.

2.4. Altres al·lels mutants de *ptc*

A la literatura s'han descrit altres al·lels mutants del gen *ptc*, els quals presenten diferents característiques. Es van analitzar els fenotip d'aquests altres al·lels coneguts mutants de *ptc*, per tal de comparar el fenotip de les mutacions i els seus efectes (Taula 3) (Figura 39).

- **Ptc^{IIW}**: al·lel nul de *ptc* que manté la via de senyalització de Hh constitutivament activa (Chen et al., 1998).

- **Ptc^{S2}**: al·lel mutant de *ptc* que presenta una mutació puntual en la posició D582N i com que no pot reprimir Smo manté la via de senyalització de Hh activa (Martín et al., 2001).
- **Ptc¹⁴**: al·lel mutant de *ptc* que presenta un canvi de Leu-Gln (L83Q) (Torroja et al., 2004). Aquest al·lel de Ptc s'uneix d'una manera ineficient al lligand, no internalitza, però és capaç d'activar la via de senyalització de Hh.
- **Ptc^{D130}**: al·lel mutant de *ptc* que presenta una mutació puntual a la posició Q395STOP. Dóna lloc a una proteïna no funcional, incapaç d'unir-se al lligand ni de reprimir Smo, de tal manera que manté la via de senyalització de Hh constitutivament activa.

	Ptc ^{IIW}	Ptc ^{S2}	Ptc ¹⁴	Ptc ^{D130}
Unió a Hh	X	√	√	X
Internalització	X	√	X	X
Repressió de Smo	X	X	√	X

Taula 3. Diferents al·lels mutants del gen *ptc* descrits amb les seves diferents característiques pel que fa referència a la unió a Hh, la internalització i la repressió de Smo.

Tot i les diferents característiques dels diferents al·lels descrits de *ptc*, tots ells presenten el mateix fenotip en el qual les BGs no són capaces d'entrar en el SNC (**Figura 39**). El punt en comú entre aquests mutants de *ptc*, menys el de *ptc¹⁴*, que serà objecte d'anàlisi en l'apartat de la discussió, és el fet de no poder reprimir Smo, i per tant en tots ells la via de senyalització de Hh es manté constitutivament activa. Aquest podria ser doncs el motiu pel qual observem fenotip en el ST.

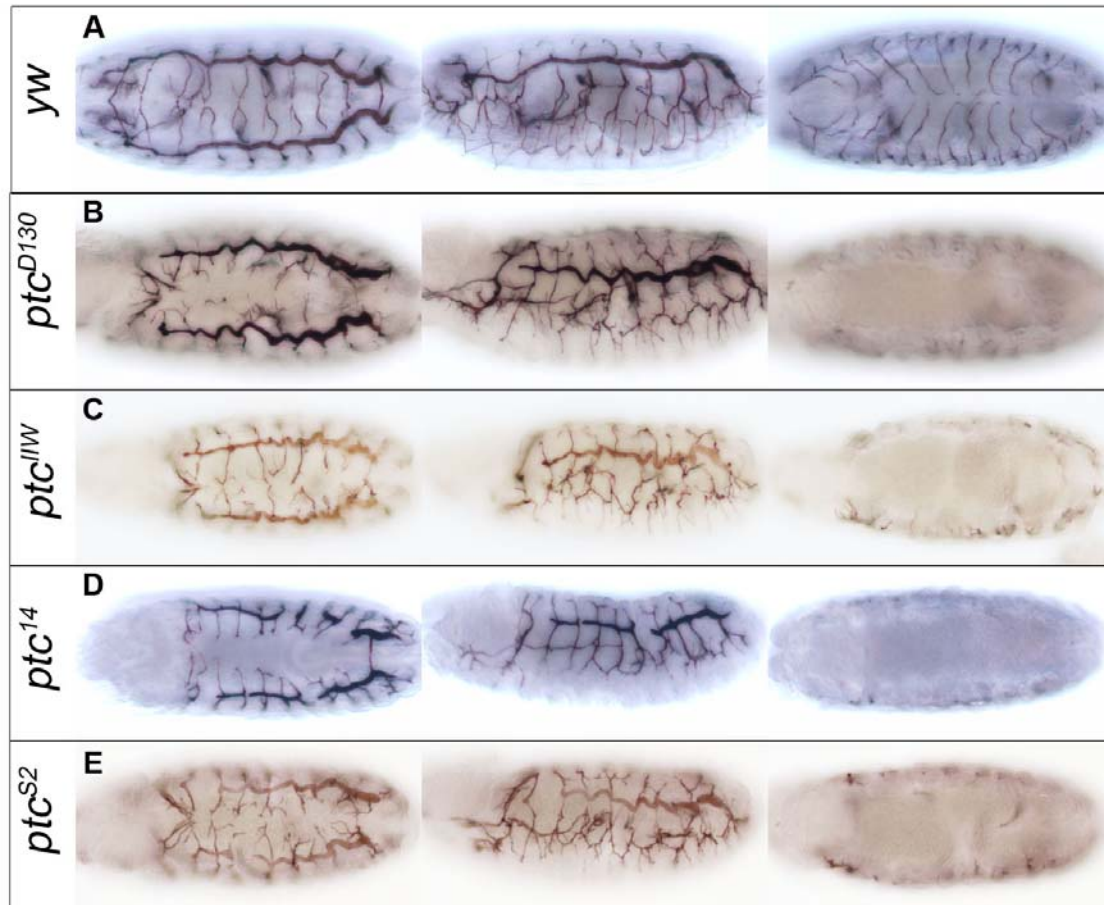


Figura 39. Fenotips que mostren el sistema traqueal de diferents al·lels de *ptc*. (A) *Yw*; (B) *ptc^{D130}*; (C) *ptc^{IIW}*; (D) *ptc¹⁴*; (E) *ptc^{S2}*. Vegi's la manca d'extensió de les BGs en tots els embrions dels al·lels de *ptc* tot i les diferents característiques que presenten entre ells. El punt en comú entre ells, menys en el cas de *ptc¹⁴*, és que presenten la via de senyalització de Hh constitutivament activa. Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 16 i estan marcats amb l'anticòs 2A12 per tal de visualitzar el lumen traqueal. La primera columna mostra la visió dorsal, la segona la lateral i la tercera la visió ventral.

Si s'analitzen els transheterozigots dels diferents al·lels de *ptc* s'observa el mateix fenotip en totes les combinacions, menys en el cas de *ptc¹⁴/ptc^{S2}*. Vegi's en la figura un exemple d'una les combinacions de transheterozigots d'al·lels de *ptc* descrits anteriorment. En la figura A es pot veure com el transheterozigots de *ptc^{S2}/ptc^{D130}* mostren el fenotip característic de falta de migració de les BGs dels mutants embrionaris de *ptc*, mentre que la combinació *ptc^{S2}/ptc¹⁴* presenta un fenotip molt menys sever, on algunes de les BGs sí que són capaces de creuar la barrera del SNC. En les glàndules salivars s'ha descrit que la coexpressió de *ptc^{S2}* i *ptc¹⁴* recupera la distribució subcel·lular normal de la proteïna Ptc¹⁴ (Torroja et al., 2004). En el cas de la tràquea,

s'observa també una recuperació parcial del fenotip on algunes de les BGs sí que poden entrar en el SNC, una mitjana d'11 de cada 20 BG per embrió (n=17).

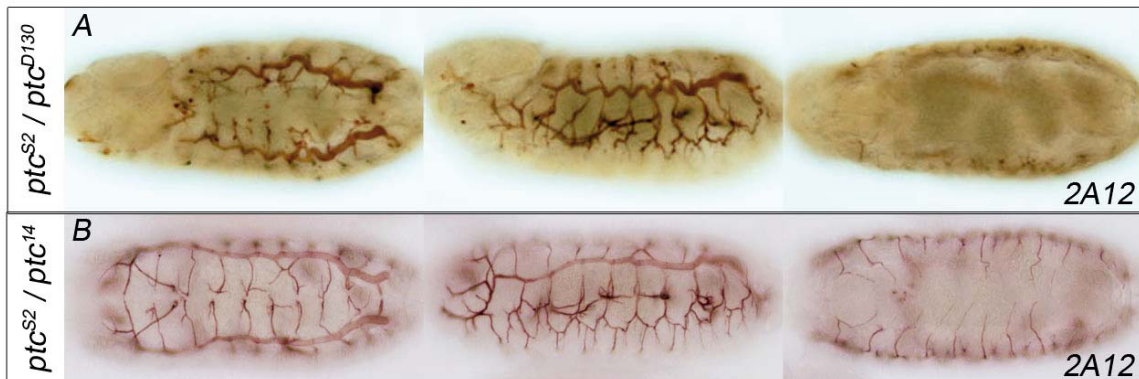


Figura 40. Fenotip del sistema traqueal dels embrions transheterozigots de ptc^{S2}/ptc^{D130} i ptc^{14}/ptc^{S2} . (A) Fenotip traqueal del transheterozigot de ptc^{S2}/ptc^{D130} . (B) Fenotip traqueal del transheterozigot de ptc^{14}/ptc^{S2} . Vegi's com en la part ventral es produeix un rescat parcial del fenotip on una mitjana d'11 de cada 20 BG són capaces de penetrar al SNC (n=17). Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 16.

2.5. Proteïna mutant de *ptc*

Com ja s'ha comentat anteriorment, la mutació de ptc^{D130} dona lloc a una proteïna truncada, la qual no és funcional ja que no permet la unió amb el lligant de la via de senyalització de Hh i per tant aquesta es manté activa constitutivament. Tot i això, utilitzant un anticòs anti-Patched, es pot detectar la proteïna endògena en els embrions mutants, ja que aquest anticòs reconeix el primer fragment de Ptc abans del primer loop extracel·lular, que és justament el que es manté tot i la mutació puntual en els mutants de ptc^{D130} . En la **Figura 41** es pot visualitzar com la proteïna de Ptc en l'embrió yw (**Figura 41A**) es detecta de manera puntejada, ja que com s'ha dit anteriorment, aquesta proteïna té una vida mitja molt curta i normalment es detecta un cop ha estat internalitzada dins les vesícules d'endocitosi. En els embrions mutants de ptc^{D130} (**Figura 41B**) es detecta la proteïna amb l'anticòs anti-Ptc, que queda retinguda a la membrana sense poder internalitzar. Cal destacar que a part de localitzar-se a la membrana, la proteïna de Ptc^{D130} manté la via de senyalització de Hh activa constitutivament, i és per això que veiem el patró d'expressió d'aquesta modificat, ja que Ptc és també un target de la seva pròpia via de senyalització. A la **Figura 41C** s'observa la proteïna del mutant de ptc^{14} , el qual ha estat descrit prèviament per no

internalitzar, i per tant es pot trobar a la membrana. Finalment, en l'embrió mutant de *ptc^{llw}* (Figura 41D) el qual és un mutant nul, no es pot detectar la proteïna de Ptc per aquest mateix motiu, i serveix, en aquest cas, com a control negatiu del marcatge.

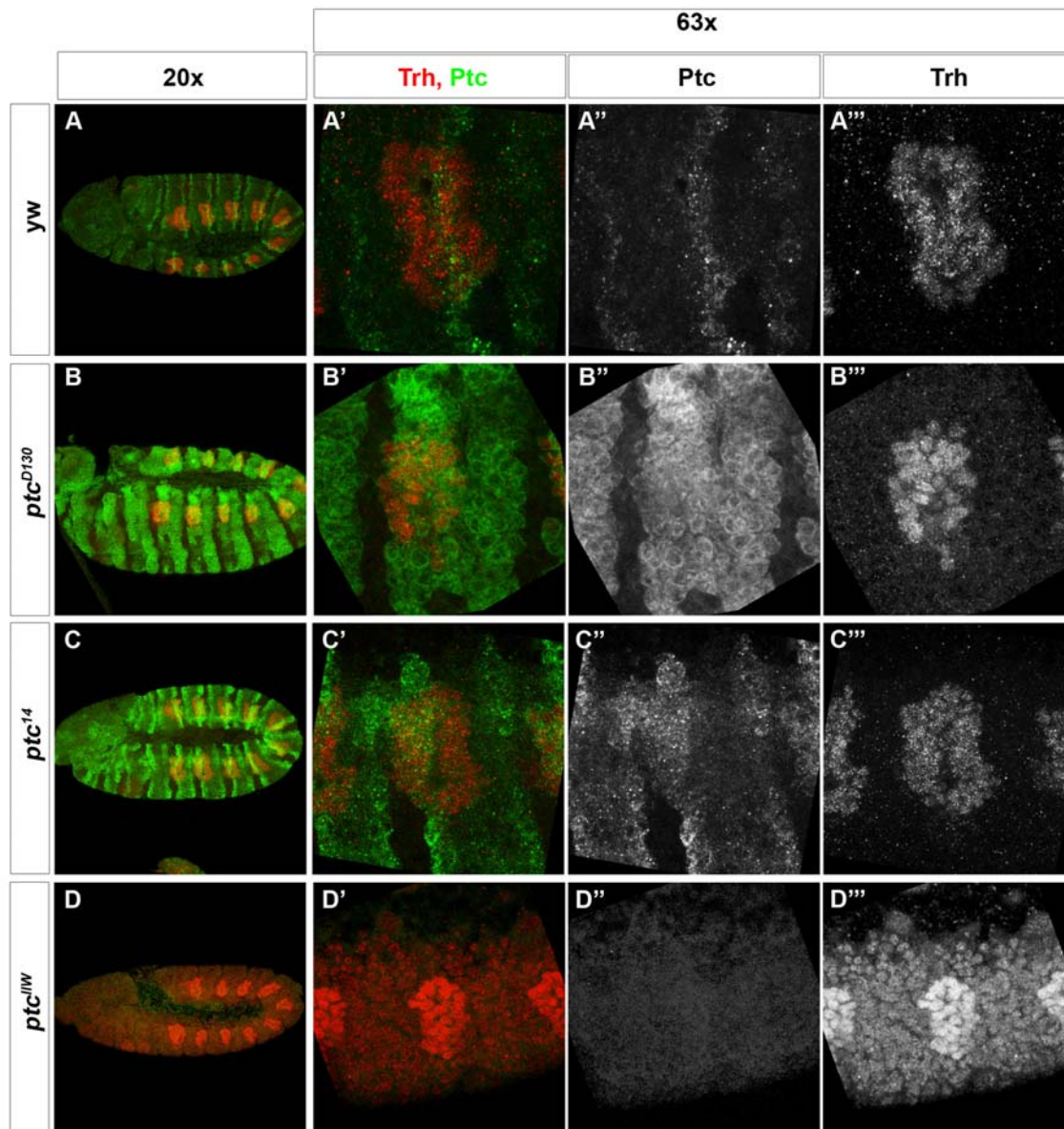


Figura 41. Patró d'expressió de la proteïna de Ptc en diferents genotips. (A) Embrió yw on es pot visualitzar la proteïna de Ptc de manera puntejada, ja que es detecta dins de vesícules. (B) Embrió mutant de *ptc^{D130}* on es detecta la proteïna localitzada a la membrana cel·lular. Vegi's el patró d'expressió modificat de la proteïna, ja que en aquest mutant la via de senyalització de Hh està activa constitutivament. (C) Embrió mutant de *ptc¹⁴*, on es pot visualitzar la proteïna a la membrana cel·lular, localització que ja havia estat descrita per no poder ser internalitzada, i on es pot observar una localització de la proteïna similar a la del mutant *ptc^{D130}*. (D) Embrió mutant de *ptc^{llw}*, mutant nul, on no es detecta la proteïna i serveix com a control negatiu del marcatge. Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 10/11 i estan marcats amb Trh per tal de visualitzar les cèl·lules de la tràquea i amb l'anticòs anti-Ptc.

2.6. Fenotips traqueals de Smo i Hh

Una vegada conegut el fenotip embrionari dels diferents mutants de *ptc*, es va analitzar el fenotip d'altres components de la via de senyalització de Hh: Hh i Smo. Tant en els mutants de *hh* com en els mutants de *smo* la via de senyalització es manté inactiva, mentre que en els de *ptc*, la via de senyalització de Hh està activada constitutivament.

Els mutants embrionaris de *hh* han estat descrits per mostrar defectes en la determinació del número de cèl·lules comprometent d'aquesta manera la mida de la placode. També s'ha observat que un petit nombre de cèl·lules no invagina correctament i queden retingudes a l'ectoderm, mentre la població de cèl·lules traqueals que sí que migren ho fan d'una manera desorganitzada (Glazer and Shilo, 2001).

Es van analitzar tres al·lels mutants nuls de *hh*: el *hh²*, el *hh²¹* i el *hh^{Ac}* (Figura 42). En els tres casos el fenotip és reproduïble al que havia estat parcialment descrit anteriorment però sense parar atenció a la part ventral: el fenotip és penetrant en tots els embrions, les BD i les BV no es formen i les cèl·lules que formen el TD migren parcialment, especialment en els segments més posteriors. Tanmateix, la part ventral mostra presència de BG, tot i que aquestes no migrin seguint els patrons establerts, són capaces d'estendre i envair la CNV.

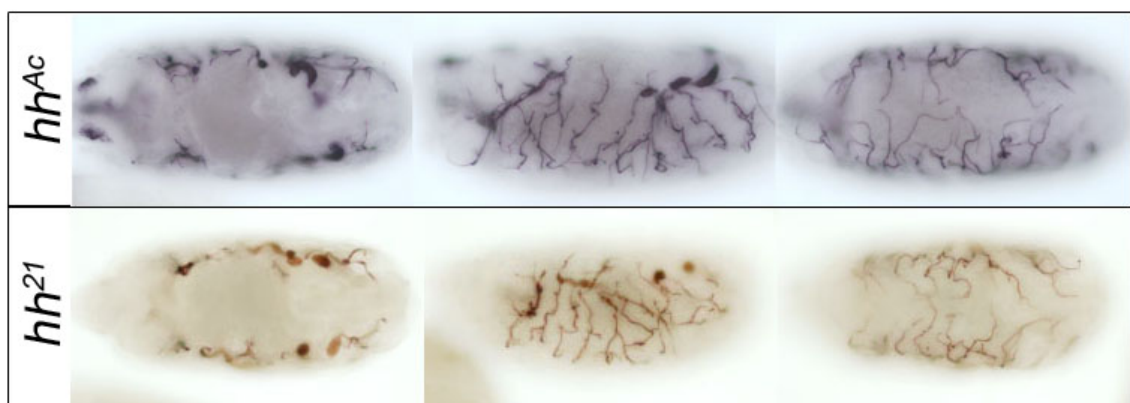


Figura 42. Fenotip traqueal d'embrions mutants de *hh^{Ac}* i *hh²¹*. Vegi's que, tot i el fort fenotip que presenten els embrions, destaca la presència de BGs tot i els defectes en el guiatge cel·lular. Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 16 i estan marcats amb l'anticòs 2A12 per tal de visualitzar el lumen traqueal.

Es va analitzar també el fenotip dels mutants homozigots pel gen nul de *smo*^{D16} i dels transheterozigots de *smo*^{D16} amb la deficiència Df(2L)BSC454 del mateix gen (Figura 43). En ambdós casos es troben a faltar algunes de les BG, però les que són presents migren correctament i envaeixen el SNC. Aquest fenotip no es veu tan afectat com en el cas dels mutants de *hh*, molt probablement degut a que en el cas de *smo* hi ha una contribució materna (Alcedo et al., 1996), mentre que en els mutants de *ptc* i *hh* aquesta contribució de l'efecte matern no té lloc. Tot i això s'observen algunes fusions ectòpiques de les BDs, i en algun cas també falta de BD.

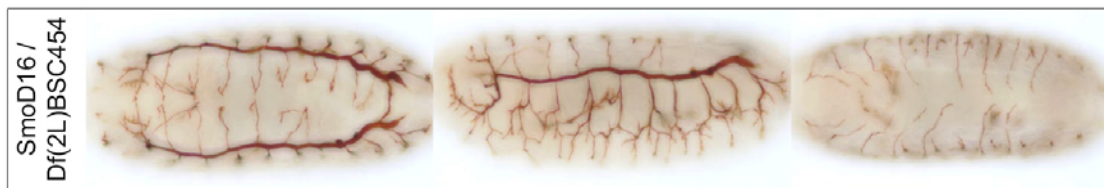


Figura 43. Fenotip traqueal d'embrions mutants de *smo*^{D16}/Df(2L)BSC454. Vegi's com tot i faltar algunes BGs, les presents són capaces de penetrar en el SNC. El fenotip d'aquest mutant no és molt acusat gràcies a contribució materna de *smo*. Els embrions de la figura són d'estadi embrionari 16, estan marcats amb l'anticòs 2A12.

2.7. Autonomia de Ptc en el sistema traqueal.

Després d'haver confirmat que Ptc s'expressa en alguns estadis embrionaris a les cèl·lules de la tràquea (sobretot en estadis joves fins al 14), es va voler determinar si el fenotip que presenten els embrions mutants de *ptc* era degut a un efecte autònom, tenint lloc des de dins les cèl·lules del sistema traqueal, o no autònom, i que afecta el desenvolupament des de fora de les cèl·lules de la tràquea.

Així doncs, per tal de determinar l'autonomia de la via de Hh en el marc del sistema traqueal es van utilitzar dues construccions que ens permeten activar o reprimir la via de senyalització de Hh.

- La construcció **Ptc**^{Δloop2} (Briscoe et al., 2001) reprimeix la via constitutivament ja que li manca el segon *loop* extracel·lular i per tant no pot unir-se a Hh, el qual queda lliure per unir-se a Smo i impedir així la transcripció.

- La construcció **Hh-Ptc** (Casali and Struhl, 2004) la qual activa la via senyalització de Hh, es comporta com una forma de Ptc constitutivament lligada a Hh, de tal manera que el conjunt estarà internalitzant constantment i deixant lliure a Smo per col·locar-se a la membrana plasmàtica i activar la via. La proteïna Hh-Ptc es compon per l'extrem N-terminal de Hh (aminoàcids 1-256) unit via una "haemagglutinin" (HA) al domini transmembrana del receptor Sevenless (Sev), unit al mateix temps a l'extrem N-terminal de la proteïna sencera de Ptc. Cal remarcar que en l'al·lel mutant de *ptc*^{D130}, descrit anteriorment també es manté la via de senyalització de Hh constitutivament activa.

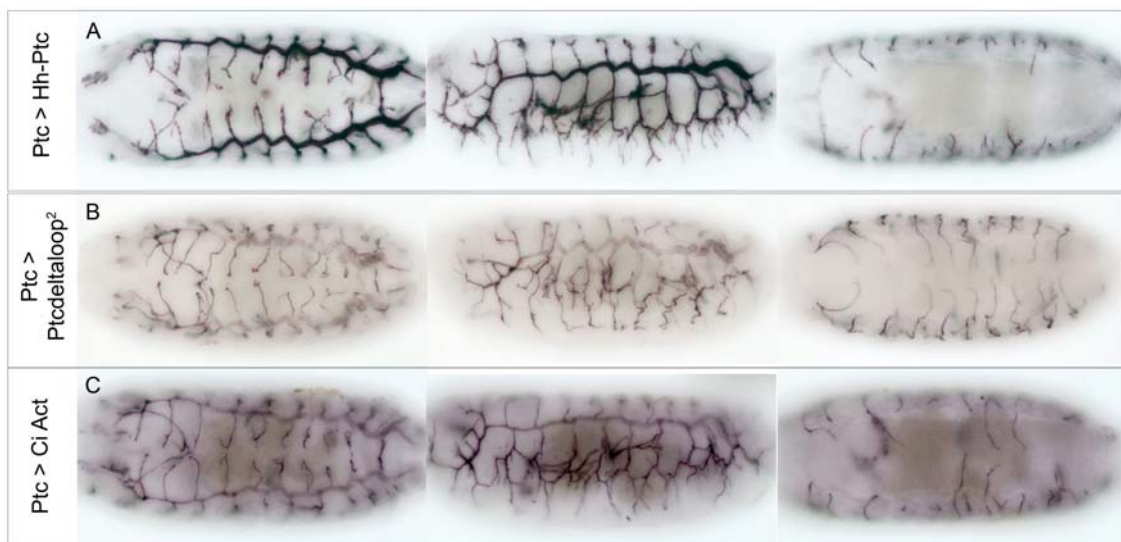


Figura 44. Fenotip traqueal de les sobreexpressions de les diferents construccions de Ptc utilitzant PtcG4 com a *driver*. (A) Embrió *Ptc > Hh-Ptc*, vegi's com sobreexpressant la via de Hh constitutivament en el domini l'expressió de Ptc s'aconsegueix reproduir el fenotip de falta de migració de les BG. (B) Embrió *Ptc > Ptc^{Δloop2}*, en el cas de reprimir la via en les cèl·lules que expressen Ptc no s'observa cap fenotip pel que fa la migració de les BG. (C) Embrió *Ptc > Ci^{Act}* on es veu afectada la migració de les BG ja que s'està sobreexpressant la via de senyalització de Hh tal com passa en el cas de *Ptc > Hh-Ptc*, tot i que aquest cas el fenotip que s'observa és més fort. Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 16 i estan marcats amb l'anticòs 2A12 per tal de visualitzar el lumen traqueal.

Es van sobreexpressar les construccions esmentades utilitzant PtcGAL4 com a *driver* per tal de comprovar el seu funcionament. D'aquesta manera es va poder observar que si es sobreexpressa la construcció Hh-Ptc (la que activa la via de Hh constitutivament) a les cèl·lules que expressen Ptc, es veuen defectes en la migració de les BG de l'embrió, en canvi, si es sobreexpressa l'altre construcció *Ptc^{Δloop2}* (la que

reprimeix la via) no s'observa cap fenotip en les BGs en particular i en l'embrió en general (Figura 44).

Cubitus interruptus (Ci) és una de les dianes de la via de senyalització de Hh. Es va sobreexpressar també una forma de Ci activada i un dominant negatiu. Quan es sobreexpressa la forma activada de Ci utilitzant el PtcGAL4 s'observa com algunes BGs no són capaces d'envair el SN, reproduint parcialment el fenotip del mutant de *ptc*, on la via de senyalització de Hh es troba constitutivament activada. Mentre que si es sobreexpressa el dominant negatiu de Ci no s'observa cap fenotip.

Així doncs es pot veure com per reproduir el fenotip de falta de migració de les BG és necessari tenir la via de Hh activa com a mínim en el domini de les cèl·lules que expressen Ptc, segons els resultats obtinguts al sobreexpressar les formes de Hh-Ptc i Ci^{Act} . Tot i que amb les dues formes esmentades s'obté una fenocòpia del mutant de *ptc*, es va decidir procedir els anàlisis amb la construcció Hh-Ptc, ja que mostra un resultat més fort i clar alhora de reproduir el fenotip.

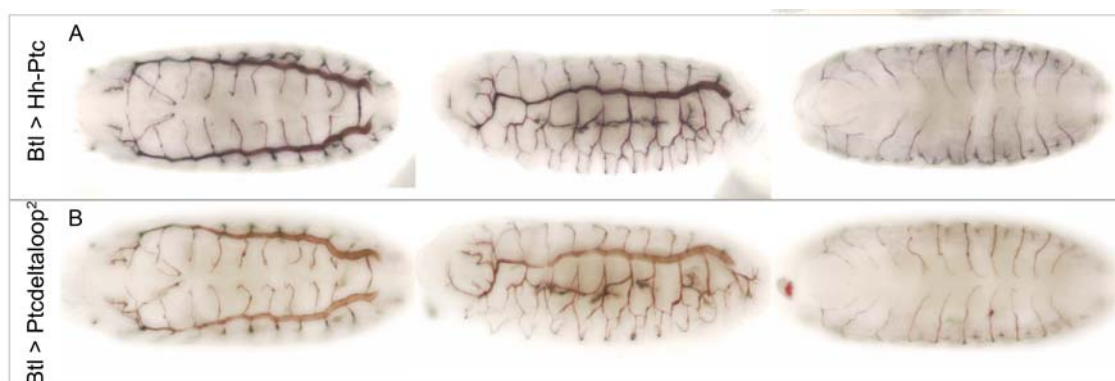


Figura 45. Fenotip traqueal de les sobreexpressions de les diferents construccions de Ptc utilitzant BtlG4 com a driver. (A) Embrió $Ptc > Hh-Ptc$, vegi's com sobreexpressant la via de Hh constitutivament en el domini l'expressió de Ptc s'aconsegueix reproduir el fenotip de falta de migració de les BGs. (B) Embrió $Ptc > Ptc^{\Delta loop 2}$, en el cas de reprimir la via en les cèl·lules que expressen Ptc no s'observa cap fenotip pel que fa la migració de les BGs. Tots els embrions del panell són d'estadi embrionari 16 i estan marcats amb l'anticòs 2A12.

Quan es sobreexpressen les mateixes construccions ($Ptc^{\Delta loop 2}$, Hh-Ptc i Ci^{Act}) a les cèl·lules de la tràquea, ja sigui utilitzant el *btl*GAL4 (Figura 45) o el *trh*GAL4 com a driver, no observem cap fenotip pel que fa a la migració de les BG. S'ha utilitzat també

com a *driver* *inscGAL4* per tal de dirigir la sobreexpressió a les cèl·lules de la línia mitjana del SN, ja que recordem que en aquest sistema també observem fenotip en els embrions mutants de *ptc*, però en aquest cas tampoc s'observa un fenotip destacable.

Aquests resultats suggereixen que cal tenir la via de senyalització de Hh constitutivament activa per tal de detectar fenotip en el sistema traqueal, però no en les cèl·lules del ST ni del SN, indicant així un efecte **no-autònom** pel que fa a aquests sistemes.

2.8. Identitat de les BG

Observant el fenotip dels embrions mutants de *ptc* es veu com les BG no migren correctament, cosa que es va fer que es qüestionés si aquestes branques tenien la identitat de BG, perquè si no fos així podia ser que no estiguessin estenent correctament perquè no estessin definides per *fer-ho*. Per tal de comprovar la identitat d'aquestes branques es va utilitzar l'*enhancer trap* Complex-2, descrit i aïllat per expressar-se precisament en les BG (Samakovlis et al., 1996a).

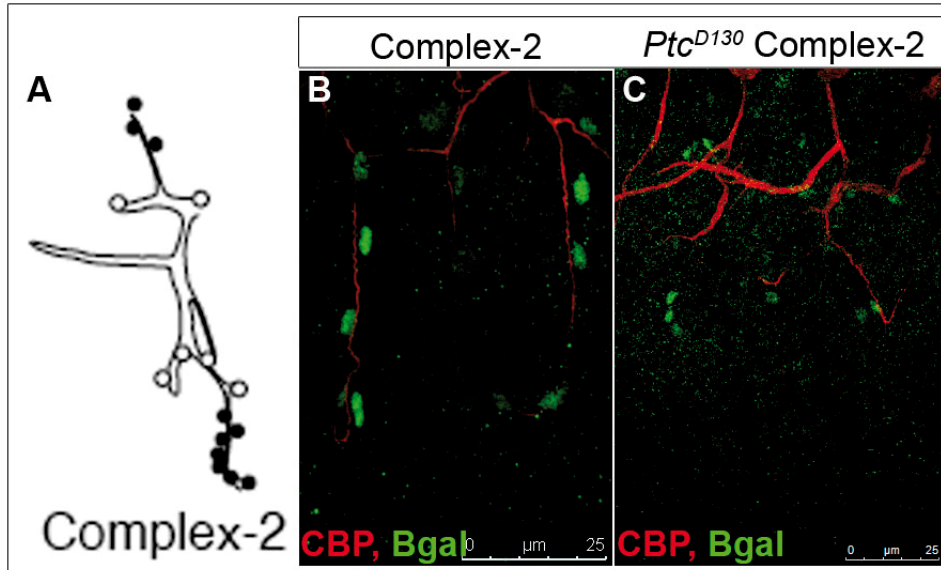


Figura 46. Figura. Embrions on es visualitza l'expressió del factor de transcripció Complex-2 que dóna identitat a les BG. (A) Esquema/dibuix on es mostra l'expressió del Complex-2 a les cèl·lules de la BG, en negre, en un embrió wt. (B) Embrió Complex-2-LacZ on es detecta l'expressió de la proteïna localitzada a les cèl·lules de les BG. (C) Embrió doble mutant de *ptc*^{D130} Complex-2, on es detecta la proteïna que dóna identitat de les BG tot i la seva manca d'extensió.

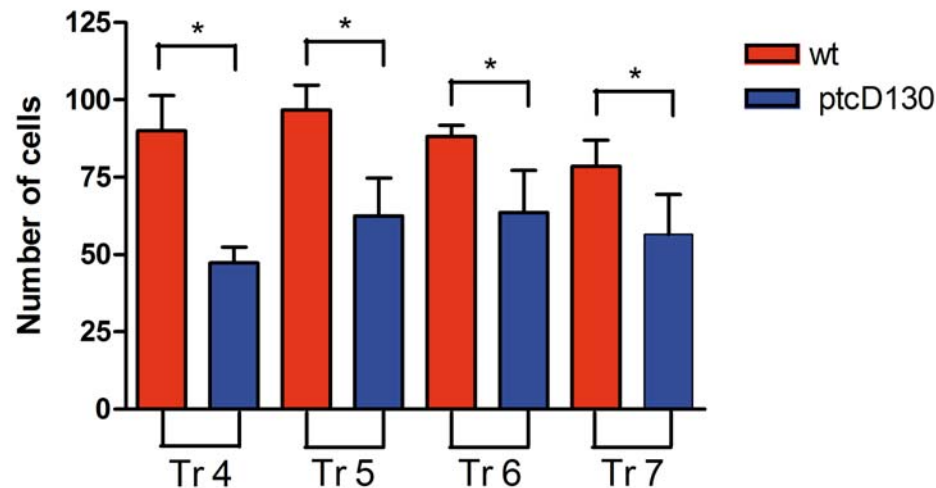
Com es pot veure en la **Figura 46**, el Complex-2-LacZ s'expressa en les cèl·lules que formen la BG (vegi's els nuclis de les cèl·lules que formen la BG marcats en verd revelant l'expressió del β gal). Es va voler comprovar si en els embrions mutants de *ptc* també es detectava l'expressió de complex-2, i per aquest motiu es va fer un recombinant *ptc^{D130} Complex2*. En aquests embrions es va poder veure com els mutants de *ptc* sí que mostren l'expressió del Complex-2, indicant així que les branques que no són capaces d'entrar al SNC són vertaderament BGs, encara que no portin a terme la correcta migració.

2.9. El sistema traqueal dels mutants embrionaris de *ptc* presenta menys cèl·lules que els embrions salvatges.

Havent analitzat prèviament el fenotip dels mutants de *ptc*, sembla evident que el sistema traqueal dels mutants embrionaris de *ptc* presenta menys cèl·lules en comparació amb els embrions salvatges, així que es va voler comptabilitzar, i si era així, esbrinar si podia ser aquest el motiu pel qual les BG no migraven, perquè de fet el problema recauria en la falta de cèl·lules més que no pas en la migració. (Vegi's l'apartat de materials i mètodes per veure els paràmetres que es van establir per procedir amb el comptatge cel·lular).

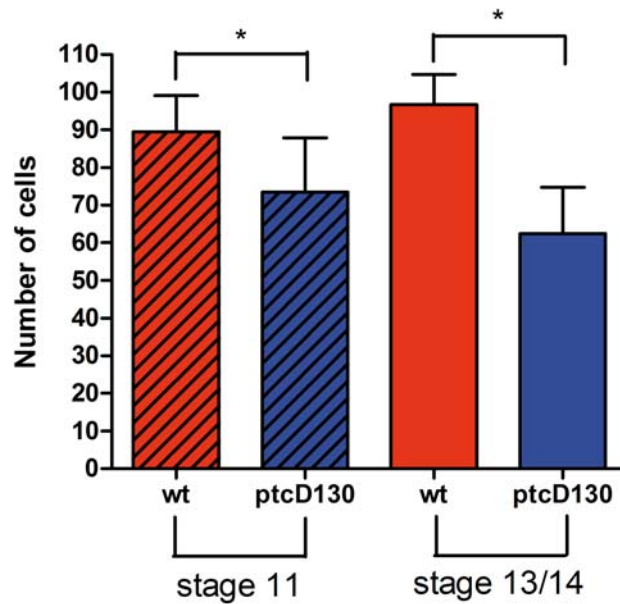
Primerament es van comptar les cèl·lules que contenien diferents segments traqueals, concretament del Tr4 al Tr7, i es va comparar les diferències entre el nombre de cèl·lules dels mateixos segments en estadis del 13 al 14.

Tal com es pot observar en el **Gràfic 1**, els embrions wt preenten un major nombre de cèl·lules en tots els segments al mutant de *ptc^{D130}*, però vista la variabilitat que s'obtenia de cada segment individualment, es va decidir analitzar únicament el cinquè segment traqueal (Tr5), que per altra banda, és el que havia estat descrit abans per tenir aproximadament unes 80 cèl·lules (Samakovlis et al., 1996a).



Gràfic 1. Gràfic on es representa la diferència en nombre de cèl·lules entre els segments traqueals Tr4, Tr5, Tr6 i Tr7. Els segments Tr4 dels embrions wt mostren una mitjana de 90 cèl·lules (n=6). Els segments Tr4 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 47 cèl·lules (n=12). Els segments Tr5 dels embrions wt mostren una mitjana de 97 cèl·lules (n=11). Els segments Tr5 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 63 cèl·lules (n=19). Els segments Tr6 dels embrions wt mostren una mitjana de 88 cèl·lules (n=11). Els segments Tr6 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 64 cèl·lules (n=18). Els segments Tr7 dels embrions wt mostren una mitjana de 78 cèl·lules (n=9). Els segments Tr7 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 57 cèl·lules (n=17). P-valor < 0,01.

Seguidament es va voler comparar el nombre de cèl·lules en diferents estadis. Així doncs, es van comptabilitzar les cèl·lules d'embrions d'estadi 11 amb les cèl·lules d'embrions d'estadis 13 i 14 del cinquè segment traqueal Tr5. Com es pot observar en el **Gràfic 2**, no s'observen diferències significatives entre els diferents estadis del mateix genotip, però sí entre els mateixos estadis i els embrions wt versus els embrions de mutants de *ptc^{D130}*. És per aquest motiu que es va procedir a fer el comptatge en estadis d'estadis 13 i 14, ja que les cèl·lules es troben més separades entre si i són més fàcilment diferenciables per l'aplicació de l'IMARIS que s'utilitza per tal de realitzar un comptatge més reproducible i alhora fiable (veure l'apartat 14 de materials i mètodes).



Gràfic 2. Gràfic on es representa la diferència en nombre de cèl·lules del segment traqueal Tr5 i en diferents estadis del desenvolupament. Els segments Tr5 dels embrions wt en estadi 11 mostren una mitjana de 90 cèl·lules (n=16). Els segments Tr5 del mutant de *ptc^{D130}* en estadi 11 mostren una mitjana de 73 cèl·lules (n=8). Els segments Tr5 dels embrions wt en estadi 13/14 mostren una mitjana de 97 cèl·lules (n=11). Els segments Tr5 del mutant de *ptc^{D130}* en estadi 13/14 mostren una mitjana de 63 cèl·lules (n=19). P-valor < 0,01.

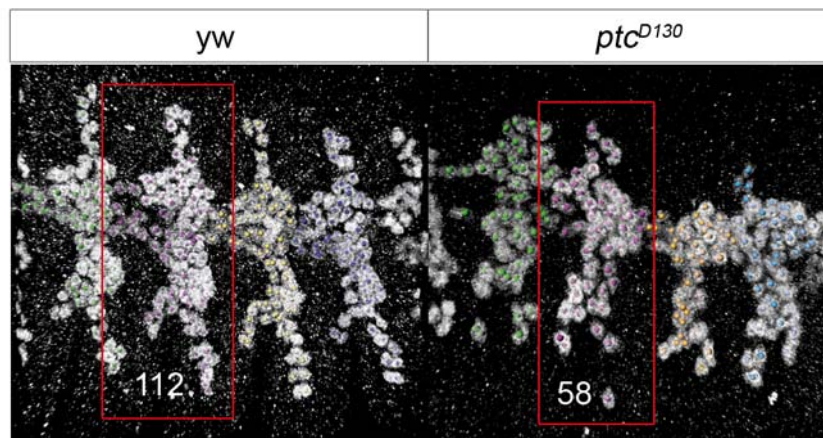


Figura 47. Imatges on es destaca el segment Tr5 d'embrions *yw* i mutants de *ptc^{D130}* amb el posterior anàlisi amb IMARIS. Els embrions *yw* mostren una mitjana de 97 cèl·lules (n=11) i els *ptc^{D130}* en mostren una de 63 cèl·lules (n=19). En els embrions de les imatges es mostra un cas en concret de valors de nombres de cèl·lules que no corresponen amb els valors de la mitjana. Els embrions estan marcats amb Trh per visualitzar els nuclis de les cèl·lules de l'arbre traqueal. Vegi's a l'interior dels nuclis uns punts de colors que senyalitzen el nucli per tal de procedir al seu posterior comptatge.

Així doncs, i seguint els paràmetres descrits anteriorment es pot concloure que, agafant com a referència el cinquè segment traqueal Tr5, els embrions mutants de *ptc*^{D130} tenen aproximadament una mitjana de 63 cèl·lules mentre que els embrions salvatges en tenen una mitjana de 97, indicant que els embrions mutants de *ptc*^{D130} tenen un 35% menys de cèl·lules formant el sistema traqueal (Figura 47).

A fi de comprovar si aquesta diferència en el nombre de cèl·lules entre el sistema traqueal d'embrions wt i mutants de *ptc*^{D130} era deguda a mort cel·lular, es va comprovar si en els embrions mutants de *ptc*^{D130} s'hi produïa apoptosi. Per comprovar-ho es van utilitzar tres mètodes diferents:

1. Detecció de caspases, proteïnes efectores del procés de l'apoptosi, utilitzant anticossos (Kuranaga, 2011).
2. Sobreexpressió de la proteïna p35 en un fons mutant de *ptc*. La proteïna p35 no es troba a la mosca, i actua impedit l'apoptosi mitjançant l'activació de la caspasa (Hay et al., 1994).
3. Es va utilitzar la deficiència H99 del cromosoma III que conté la deleció de la regió 74C1--75C2, la qual elimina el programa de mort cel·lular durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila*, ja que aquesta regió codifica per tres gens pro apoptòtics: el gen *reaper* (*rpr*), el *head involution defective* (*hid*) i el *grim*, els quals són necessaris i suficients per induir l'apoptosi (Kolahgar et al., 2011) (Figura 48).

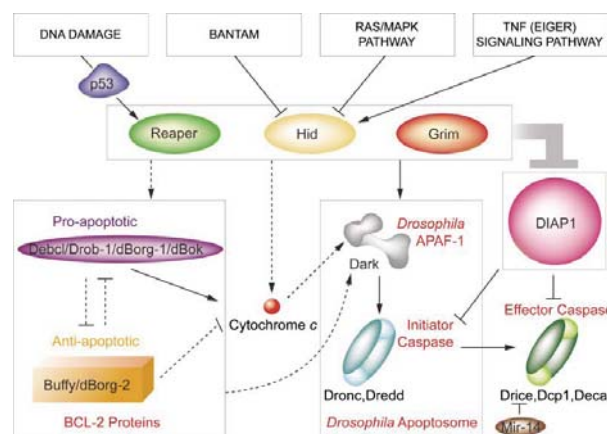


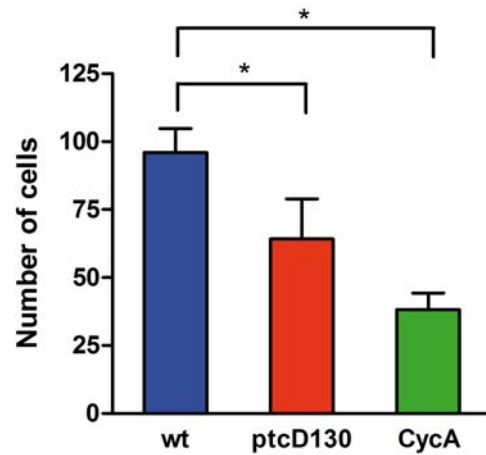
Figura 48. Apoptosi en *Drosophila*. En l'esquema es mostren les múltiples vies de senyalització que regulen l'expressió i l'activació de tres proteïnes pro-apoptòtiques Reaper, Hid i Grim (RHG), implicades en la regulació de la mort cel·lular en *Drosophila* (Watanabe et al., 1990; Danial and Korsmeyer, 2004).

La tinció immunohistoquímica amb anti-caspasa es va fer paral·lelament amb embrions mutants de *ptc* i embrions mutants de *crb* (Kuranaga, 2011), en els que s'ha descrit una activitat apoptòtica i que, per tant, serveixen com a control positiu per a la tinció de caspases i als embrions mutants de *ptc*. Es va poder confirmar el correcte funcionament de l'anticòs amb la tinció dels embrions de *crb*, i es va poder descartar la presència d'apoptosi en els mutants de *ptc*, ja que no es va poder detectar el marcatge de la caspasa dins les cèl·lules del sistema traqueal.

En els altres dos casos, el de sobreexpressió de la proteïna p35 i de la deficiència H99 en un fons mutant de *ptc*, no es va poder observar cap rescat del fenotip: ni extensió de les BGs, ni un augment en el nombre de cèl·lules que formen el sistema traqueal, descartant així l'apoptosi com a possible responsable del fet de tenir menys cèl·lules formant el ST.

Així doncs, i per comprovar si la falta d'extensió de les BGs era degut al fet de que el ST dels mutants de *ptc* presentaven menys cèl·lules, tot i aquest fet no fos degut a l'apoptosi, es van analitzar altres mutants descrits a la literatura per tenir menys cèl·lules, com en el cas dels mutants de *CycA*, els quals aturen el cicle cel·lular abans de l'última onada de divisió cel·lular, i presentant així la meitat de cèl·lules en l'embrió, i per extensió també en l'arbre traqueal (Beitel and Krasnow, 2000).

Fent els comptatges del número de cèl·lules del ST, seguint el mateix procediment descrit pels embrions salvatges i els embrions mutants de *ptc^{D130}*, s'observa que els embrions mutants de *CycA* tenen inclús menys cèl·lules que formen el ST que els mutants de *ptc^{D130}*. Posteriorment al comptatge, es van fer tincions dels embrions, amb l'anticòs monoclonal 2A12, per tal de comparar la capacitat d'extensió de les BGs, ja que s'havia descrit que la falta de la meitat de les cèl·lules no afectava ni al diàmetre ni la llargària dels tubs (Beitel and Krasnow, 2000), i es va poder concloure que els mutants de *CycA* estenen les BGs perfectament tot i tenir menys cèl·lules que formen el sistema traqueal (Gràfic 3) i (Figura 49).



Gràfic 3. Gràfic on es representa la diferència en nombre de cèl·lules del segment traqueal Tr5 en embrions d'estadis 13/14. Els segments Tr5 dels embrions wt mostren una mitjana de 97 cèl·lules (n=11). Els segments Tr5 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 63 cèl·lules (n=19). Els segments Tr5 dels embrions de *CycA* mostren una mitjana de 38 cèl·lules (n=8).

Així doncs, es pot concloure que la manca d'extensió de les BGs en els mutants de *ptc^{D130}* no és deguda a tenir menys cèl·lules formant el ST, ja que s'ha demostrat que en mutants de *CycA* que presenten inclús menys cèl·lules que no pas el mutant de *ptc^{D130}*, les BGs no només estenen sinó que a més envaeixen el SNC.

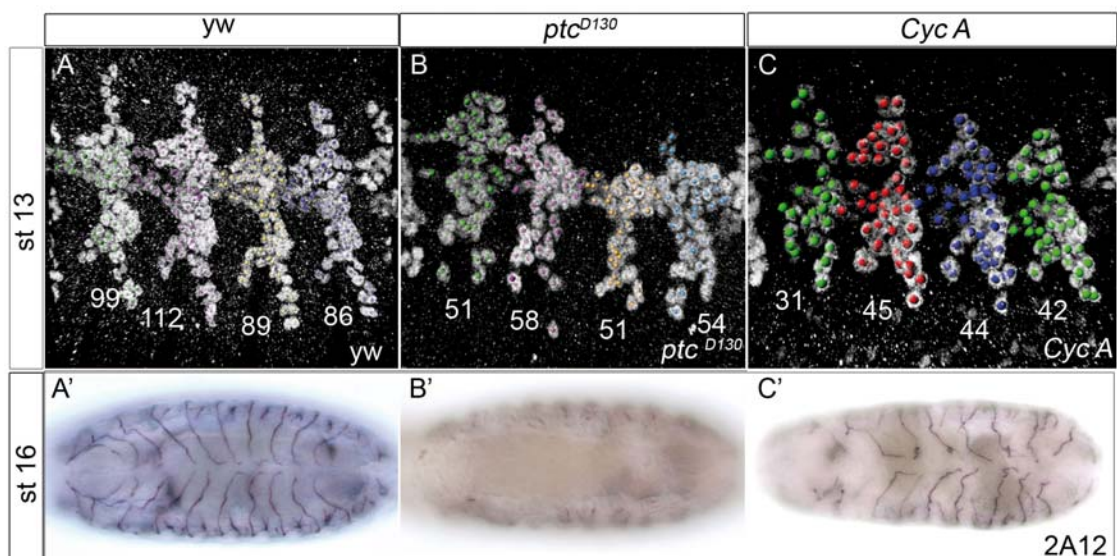


Figura 49. Imatges dels segments traqueals d'embrions yw, mutants de *ptc^{D130}* i mutants de *CycA* i fenotip de les BGs del ST. (A) Els segments Tr5 dels embrions wt mostren una mitjana de 97 cèl·lules (n=11). (B) Els segments Tr5 del mutant de *ptc^{D130}* mostren una mitjana de 63 cèl·lules (n=19). (C) Els segments Tr5 dels embrions de *CycA* mostren una mitjana de 38 cèl·lules (n=8). En els panells inferiors es mostren els fenotips de les BGs: (A') en els embrions yw les BGs estenen fins a envair el SNC; (B') en els embrions mutants de *ptc^{D130}* les BGs no arriben a innervar el SNC; i (C') en els embrions mutants de *CycA* les BG estenen fins assolir el SNC tot i presentar menys cèl·lules que els mutants de *ptc^{D130}*.

2.10. Expressió diferencial de DSRF entre embrions salvatges i mutants de *ptc*^{D130}

Un altre tret diferencial dels mutants embrionaris de *ptc*^{D130} és el fet que el factor de transcripció DSRF, el que determina les cèl·lules terminals del TS, s'expressa d'una manera diferent que en embrions wt. Vegi's en la figura com l'estadi 13 del desenvolupament embrionari, en els embrions mutants de *ptc*^{D130} ja es detecta l'expressió del DSRF, mentre que encara no es detecta en els embrions wt (Figura 50).

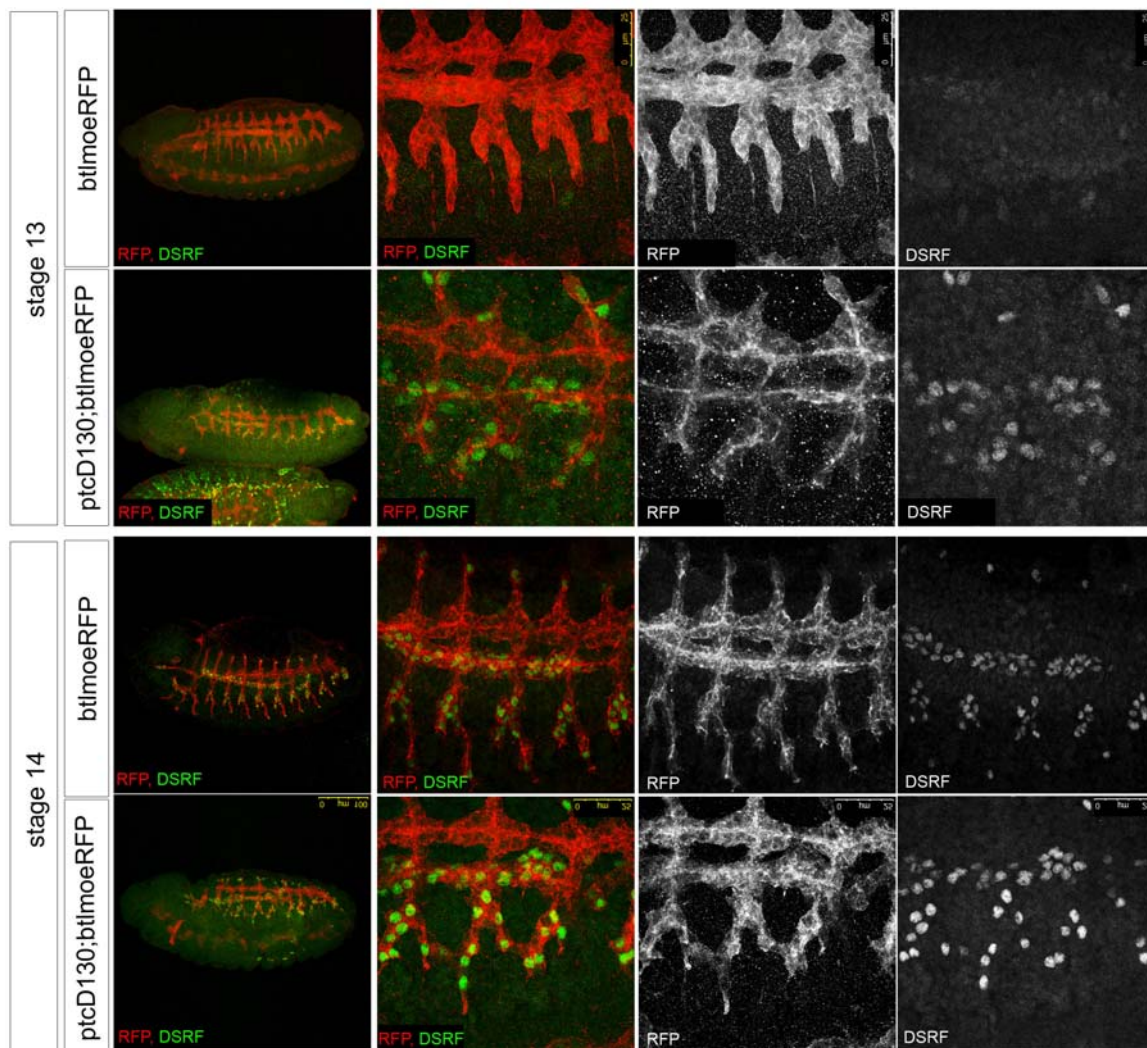


Figura 50. Diferents nivells d'expressió del factor de transcripció DSRF en embrions wt i mutants de *ptc*^{D130}. Vegi's l'expressió de DSRF en l'estadi 13 embrionari dels embrions mutants de *ptc*^{D130}, en comparació amb els wt no es detecta. Compari's l'expressió de DSRF en l'estadi embrionari 14, on és detectable tant en els embrions wt com en els embrions mutants de *ptc*^{D130}.

El fet que en embrions mutants de *ptc*^{D130} es detectin diferents nivells d'expressió de DSRF suggereix que en aquests embrions podria haver-hi una expressió diferent de Bnl, ja que és l'element que trobem *upstream* de la via de DSRF, i és el que determina la migració i el guiatge de les cèl·lules de la tràquea i la diferenciació de les cèl·lules terminals, sent aquestes les que captaran més Bnl. D'altra banda s'ha descrit també que DSRF podria trobar-se *downstream* de la via de senyalització de Hh (Nussbaumer et al., 2000).

2.11. La sobreexpressió de Hh al cordó nerviós ventral també evita la migració de les BG

En els mutants de *ptc*^{D130} es manté la via de senyalització de Hh constitutivament activa, ja que en aquests el receptor Ptc no és funcional. Per altra banda, es mantenen uns alts nivells de Hh al medi ja que aquest no pot ser internalitzat perquè com ja s'ha dit el receptor Ptc de la via no hi és present (Chen and Struhl, 1996; Torroja et al., 2004). Així doncs es va plantejar si la manca d'extensió de les BGs era degut a tenir uns nivells massa alts de Hh. Per tal de respondre a aquesta pregunta es va sobreexpressar Hh a la VNC de l'embrió utilitzant el *inscGAL4* com a *driver*.

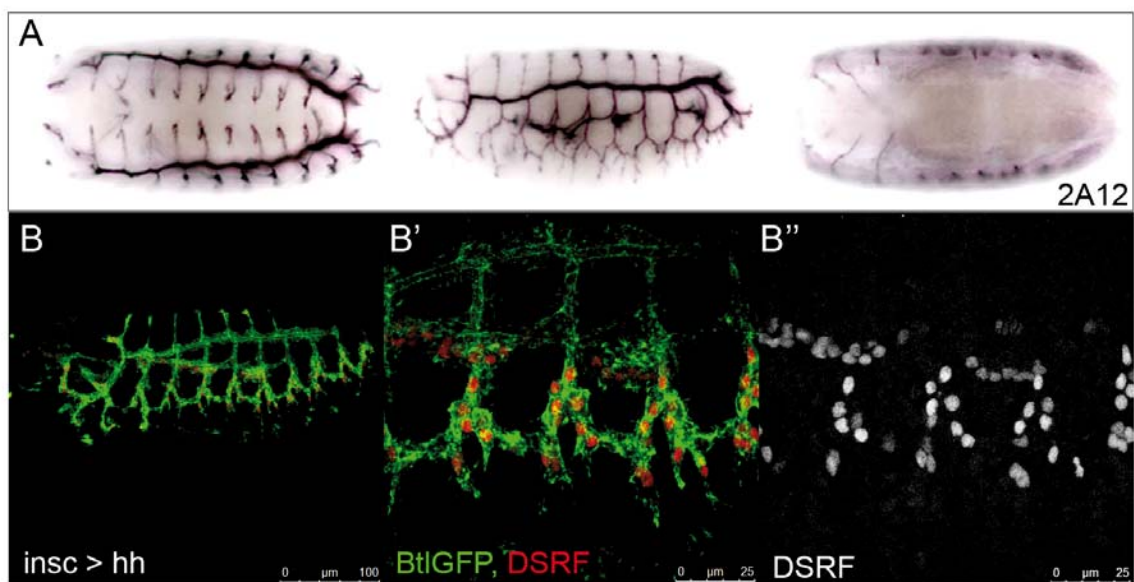


Figura 51. Fenotip que mostra el TD de *Drosophila* al sobreexpressar Hh al CNV mitjançant el *driver inscGAL4*. (A) Embrions *Insc>Hh* d'estadi embrionari 15 on s'observa la manca de migració de les BGs. El lumen traqueal està marcat amb l'anticòs 2A12. (B) Tinció immunohistoquímica d'un embrió *Insc>Hh* on a part de mostrar una afectació en l'extensió de les BGs, es detecta la presència de cèl·lules positives per DSRF.

El resultat va ser clar: quan es sobreexpressa Hh les BG no poden migrar, així que es va fer l'experiment a la inversa, es va treure una i posteriorment les dues còpies de *hh* en un fons mutant de *ptc^{D130}*, ja que si el problema estava en tenir massa Hh al medi, si se'n treu s'hauria de produir el rescata del fenotip de migració de les BGs (Figura 51). En cap dels dos casos, amb una còpia o dues menys de *hh* en un fons mutant de *ptc*, no es recupera l'extensió de les BGs. Aquests resultats mostren que la manca d'extensió de les BGs no és deguda a que hi hagi massa Hh al medi, ja que no es pot rescatar el fenotip si es treu Hh. I el fet que el doble mutant de *ptc;hh*, el qual manté la via de senyalització de Hh constitutivament activa, tampoc mostri el rescat de les BGs, ens confirma la hipòtesi que es necessita tenir la via de Hh constitutivament activada per tal de prevenir la migració de les BG. És un cas d'epístasi, en que si el receptor no és funcional, s'observa el mateix fenotip amb o sense presència de lligand.

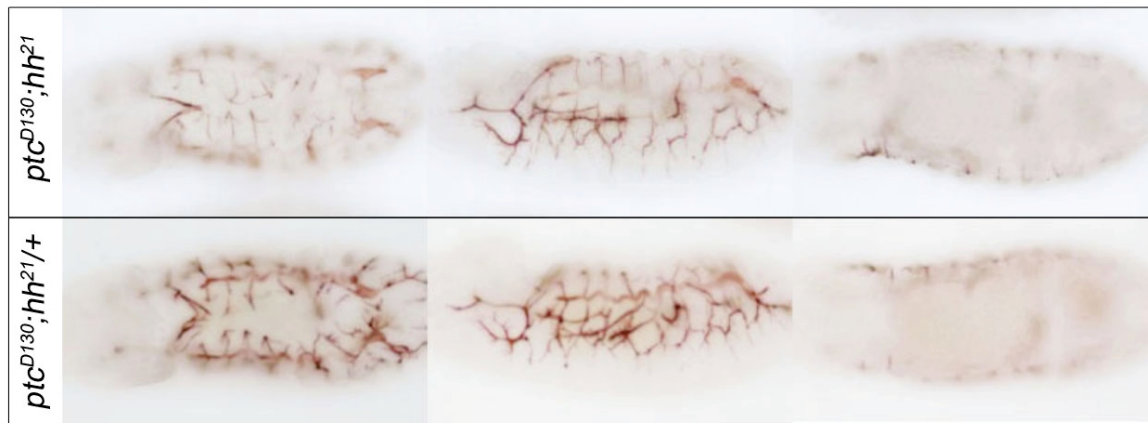


Figura 52. Fenotips traqueals d'embrions dobles mutants de *ptc^{D130};hh²¹* i mutants de *ptc^{D130};hh²¹/+*. Vegi's com en els dos genotips, el fenotip de falta d'extensió de les BGs és el mateix que en el mutant de *ptc^{D130}*, fet que reafirma que cal tenir la via de Hh constitutivament activa per tal de prevenir la migració de les BGs, i no és un problema de tenir un excés de lligand.

La següent pregunta que es va formular va ser si aquestes branques no migraven pel simple fet d'estar "predefinides" com a branques terminals. És a dir, el fet que les cèl·lules de la tràquea expressin el DSRF abans d'hora que en els embrions wt, sigui un impediment per a la migració de les BG. A fi de respondre aquesta pregunta es van analitzar els mutants per DSRF, també anomenat *pruned^l* (Guillemin et al., 1996), els qual contenen un *enhancer trap* que permet seguir on s'expressaria la proteïna si hi fos present gràcies al marcatge amb l'anticòs anti-βgal. Aquests mutants han estat descrits

per afectar la progressió de la branca terminal, però no l'establiment de la cèl·lula terminal (Gervais and Casanova, 2011).

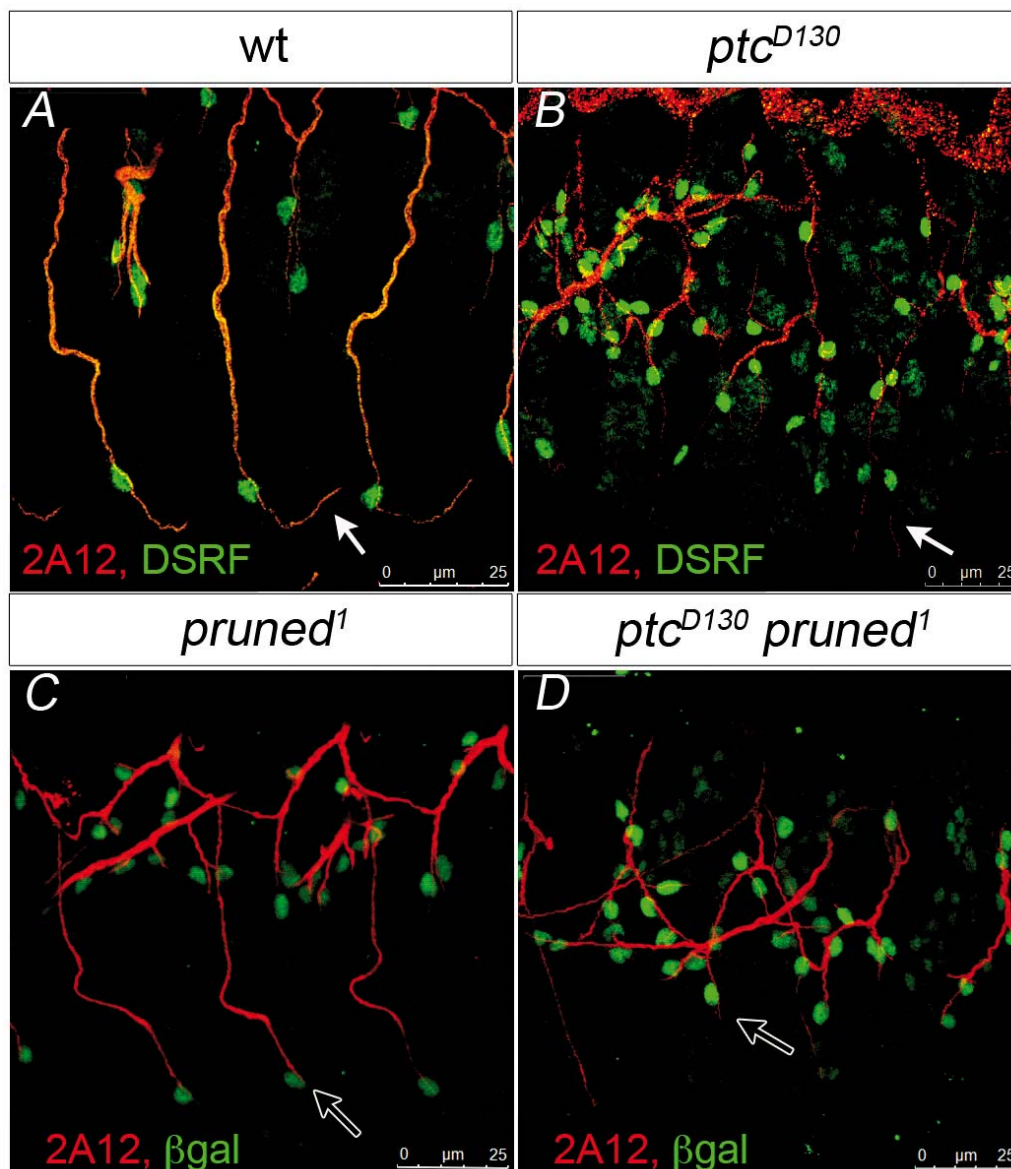


Figura 53. Detall de les BGs del sistema traqueal. (A) Embrió wt on s'observa l'expressió del DSRF a la cèl·lula terminal amb l'extensió del lumen intracel·lular (fletxa blanca). Vegi's com les BGs estenen fins a arribar al SNC. (B) Embrió mutant de ptc^{D130} on s'observa l'expressió del DSRF i com totes elles estenen el lumen intracel·lular (fletxa blanca). (C) Embrió $pruned1$ -LacZ en el que s'observa l'extensió de les BGs fins al SNC, tot i la manca l'extensió del lumen intracel·lular (fletxa negra). (D) Embrió recombinant ptc^{D130} $pruned1$ -LacZ en el que no hi ha extensió de les BGs fins a arribar el SNC ni es produeix l'elongació del lumen intracel·lular (fletxa negra).

Observant la Figura 53A es pot veure com en els embrions wt les BGs migren correctament fins assolir el CNV, formant correctament el lumen terminal, girant posteriorment i expressant el factor de transcripció DSRF a cada cèl·lula terminal de cada BG. En la Figura 53B es veu de nou el fenotip del mutant de ptc^{D130} on es poden observar que les BGs no estenen fins al CNV, però malgrat això es produeix l'extensió del lumen terminal. Recordem que aquests mutants s'han descrit anteriorment per presentar l'expressió del DSRF més aviat en el desenvolupament (estadi 13) en comparació amb els embrions wt. En la Figura 53C s'observa com els embrions de *pruned1-LacZ* són capaços d'estendre les BG correctament però no formen l'extensió del lumen terminal intracel·lular correctament. I en la Figura 53D s'observen els embrions recombinants de ptc^{D130} *pruned1-LacZ* que tot i que les BGs no expressen DSRF (es pot observar com les cèl·lules terminals tampoc formen correctament l'extensió del lumen terminal intracel·lular), mostren el mateix fenotip que els mutants de ptc^{D130} , en els que no té lloc la invasió del CNV per part de les BGs.

Així doncs es pot concloure que el fet que el factor DSRF s'expressi abans en els embrions mutants de ptc^{D130} no és el motiu per la manca de migració de les BG.

2.12. Bnl és el responsable de la manca d'extensió de les BGs

Bnl és la molècula encarregada de guiar les ramificacions de les branques primàries i posteriorment terminals del sistema traqueal. Alts nivells o nivells més baixos de Bnl en estadis primerencs del desenvolupament, comprometen la migració de les branques traqueals (Sutherland et al., 1996). Es va voler comprovar si els nivells d'expressió de Bnl eren iguals en embrions wt, en embrions mutants de *ptc* i en embrions on s'havia sobreexpressat Hh al CNV, on recordem que en els dos darrers casos es veia compromesa la migració de les BGs. Així doncs es va fer una hibridació *in situ* amb una sonda de Bnl per comprovar si diferents nivells d'expressió de Bnl poden alterar el patró de migració de les BGs i conseqüentment l'expressió de DSRF, que és el que s'observa en el mutant embrionari de ptc^{D130} (Figura 54).

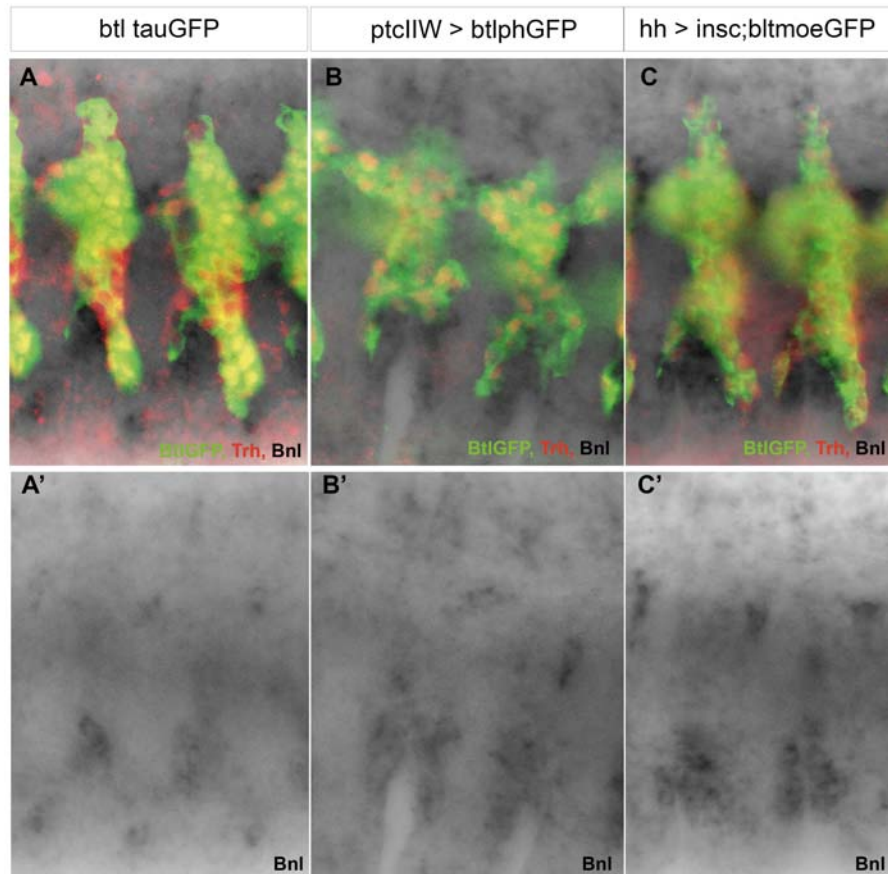


Figura 54. Hibridació *in situ* de Bnl en embrions de diferents genotips en estadi 13 embrionari. (A) Embrió BtlGFP en el que s'observen els nivells normals d'expressió de Bnl i de migració de les BGs. (B) Embrió mutant de *ptc^{IIW}* on les BGs no migren correctament. Vegi's els nivells d'expressió més elevats de Bnl en comparació amb l'embrió BtlGFP. (C) Embrió *Insc>Hh* on trobem els nivells d'expressió més elevats de Bnl en comparació amb l'embrió BtlGFP i la migració de les BGs no té lloc correctament.

Els resultats de la hibridació *in situ* mostren una expressió diferencial dels nivells de Bnl en comparació amb embrions wt. D'aquesta manera es va poder afirmar que, tant en els embrions mutants de *ptc* com en els embrions on es va sobreexpressar Hh al CNV, es detecten uns nivells més alts de Bnl en cèl·lules que es troben entre la branca ganglionar i la branca del tronc lateral anterior. És important tenir present que en els dos casos que es troben nivells de Bnl més alts coincideixen amb els que s'ha observat un fenotip de manca d'extensió de les BGs.

Es va voler veure doncs, si les cèl·lules que expressaven Bnl eren les mateixes que expressaven Ptc. Per això es va fer la hibridació *in situ* de Bnl en embrions PtcLacZ, a fi de poder seguir les dues expressions.

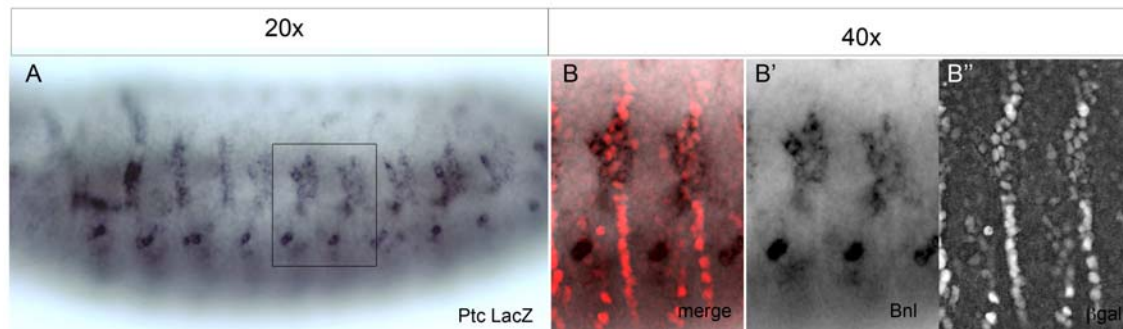


Figura 55. Hibridació *in situ* de Bnl en embrions Ptc-LacZ d'estadi 13 embrionari. (A) Embrió Ptc-LacZ en el que s'observen els nivells normals d'expressió de Bnl (B) Detall del mateix embrió on s'observen les expressions de Ptc i de Bnl alhora, revelant així, que són cèl·lules que expressen al mateix temps Ptc i Bnl.

Amb el resultat de la *in situ* i la tinció immunohistoquímica es pot concloure que efectivament Ptc s'expressa en cèl·lules que expressen Bnl. D'aquesta manera doncs, es comença a plantejar el fet que cal tenir la via de senyalització de Hh constitutivament activada en les cèl·lules productores de Bnl per tal de prevenir l'extensió de les BGs.

2.13. Cal tenir la via de Hh activada en les cèl·lules productores de Bnl per tal de prevenir la migració de les BGs

Els resultats dels que es partia, amb els quals s'obté un fenotip de falta de migració de les BGs, era quan es sobreexpressava Hh utilitzant el *ptcGAL4* i l'*inscGAL4* com a *driver*. Com a control positiu per aquest experiment es va sobreexpressar la forma de Hh-Ptc que manté la via de Hh constitutivament activada per tal de reproduir el fenotip. El resultat va ser que només es prevenia la migració de les BGs utilitzant *ptcGAL4* però no *inscGAL4*, la qual cosa indica que per evitar la migració de les BGs s'ha de tenir la via de senyalització de Hh activa en algunes cèl·lules que no són les del sistema nerviós, és a dir, que no estan sota el domini de *insc*. Tot i això, en expressar Hh amb *inscGAL4*, s'obté el fenotip de falta de migració, ja que Hh difon i perquè es sobreexpressa Hh en altes quantitats en una zona àmplia propera a font.

La conclusió és, doncs, que es necessita tenir la via de Hh activada en les cèl·lules productores de Bnl per tal de prevenir la migració de les BGs. Es van buscar altres *drivers*, que s'expressin propers al patró de *ptcGAL4*, amb els que poder

sobreexpressar Hh i veure els possibles efectes en la migració de les BGs. Es van utilitzar els *drivers* *twiGAL4*, *mef2GAL4* i *mesodermGAL4*, ja que si es sobreexpressa Bnl en aquests dominis d'expressió de la musculatura s'observen més cèl·lules terminals el les BGs entre d'altres (Zhan et al., 2010b).

Quan es va sobreexpressar Hh, Bnl o la construcció Hh-Ptc utilitzant el *driver* *PtcGAL4* es va poder reproduir el fenotip de falta de migració de les BGs en les tres situacions. Quan la sobreexpressió es va realitzar utilitzant el *driver* *inscGAL4*, s'observava el fenotip de falta d'extensió de les BGs només quan se sobreexpressen Hh i Bnl, però no quan s'activa la via de senyalització (Hh-Ptc). En el cas de la utilització del *driver* *twiGAL4* i el mesodermalGAL4, en la sobreexpressió de Hh o Bnl s'observava el fenotip de manca de migració de les BGs, però no quan s'activava la via, fet que indica que les cèl·lules que expressaven Ptc i Bnl no estan en el domini de *twiGAL4* ni en el de mesodermalGAL4 (Figura).

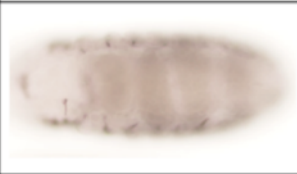







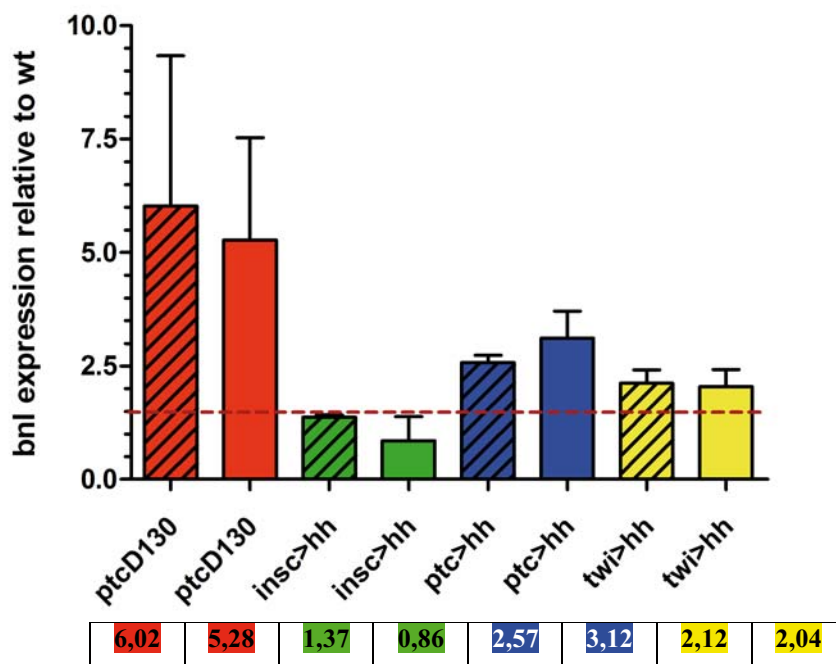
	UAS Hh	UAS Bnl	UAS Hh-Ptc
Ptc GAL4			
Insc GAL4			
Twì GAL4			No phenotype

Figura 56. Quadre amb els diferents resultats de les sobreexpressions. Vegi's com utilitzant el *driver* *PtcGAL4*, ja sigui sobreexpressant Hh, Bnl o la construcció Hh-Ptc, totes elles mostren el fenotip de manca de migració de les BGs. Quan s'ha utilitzat el *driver* *inscGAL4*, s'observa fenotip quan se sobreexpressa Hh i Bnl, però no quan s'activa la via de senyalització (Hh-Ptc). En la sobreexpressió de Hh utilitzant el *twiGAL4* s'observa fenotip de manca de migració de les BGs, però no quan es sobreexpressa Bnl o quan s'activa la via de senyalització. Les sobreexpressions fetes amb l'UAS Hh i l'UAS Hh-Ptc s'han fet a 29°C, les expressions amb l'UAS Bnl es va fer a 18°C, menys la de Twi>Bnl que es va fer a 25°C per incrementar el fenotip.

2.14. Bnl es troba expressat en nivells més alts en mutants de *ptc* i en mutants on s'ha sobreexpressat la via de senyalització de Hh

En la *in situ* de Bnl es va poder observar que hi havia nivells més alts d'expressió de Bnl en embrions mutants de *ptc* i en embrions on s'havia sobreexpressat la via de senyalització de Hh al CNV mitjançant el *inscGAL4* com a *driver*.

A fi de quantificar numèricament els resultats obtinguts que es mostren a la Figura 56, es va dur a terme una RT-PCR. Es va decidir utilitzar diferents *drivers*, dels quals ja s'havia comprovat el seu fenotip de falta de migració de les BG quan es sobreexpressava Hh, per tal de comparar com variaven els paràmetres en sobreexpressar Hh en diferents llocs de l'embrió i en diferents moments del desenvolupament.



Gràfic 4. Gràfic on es representen els nivells d'expressió de *bnl* relatius al wt obtinguts amb la RT-PCR. Les columnes ratllades i llises mostren resultats independents obtinguts en dies diferents. El valor del control positiu (*insc<bnl*) que no s'ha representat en el gràfic és de 16,745 i 12,422 en els dos experiments respectivament. I la línia vermella puntejada indica el valor crític establert que s'ha de superar per tal que els valors de la sobreexpressió siguin significatius. P-valors < 0,01.

Es van utilitzar els següent genotips a fi de mesurar els nivells d'expressió de *bnl*:

- **yw** (wt): es va utilitzar com a nivell de referència d'expressió de Bnl.
- ***ptc*^{D130}**: s'esperava trobar nivells més alts de Bnl en concordança amb els resultats de la *in situ* i el fenotip de falta de migració de les BG, així com el patró d'expressió de cèl·lules terminals positives per DSRF.
- **Insc > Bnl**: control positiu de la sobreexpressió de Bnl (Araújo and Casanova, 2011).
- **Insc > Hh**: va ser utilitzant aquest *driver* on es va poder per primera vegada la falta d'extensió de les BG quan es duia a terme la sobreexpressió de Hh, així com el canvi en el patró d'expressió de DSRF i els nivells d'expressió més elevats de *bnl* amb la *in situ*.
- **Ptc > Hh**, els embrions també mostren manca de d'extensió de les BG.
- **Tw1 > Hh**, a fi de comprovar si sobreexpressant la via de Hh en altres cèl·lules mesodèrmiques (musculars) es detecten nivells més alts de *bnl*.

Tots els resultats de la RT-PCR (Gràfic 4) són en comparació amb els nivells d'expressió de Bnl en embrions wt, i els embrions dels quals es va extreure el RNA (vegi's l'apartat de materials i mètodes) van ser seleccionats a partir de l'estadi 13-14, que és quan s'observava el fenotip de falta de migració de les BG. L'eix de les X del gràfic mostra la línia d'expressió de Bnl dels embrions wt per tal de poder comparar els resultats amb els diferents drivers. S'ha de tenir en compte també que l'extracció del RNA es va fer de l'embrió sencer, amb la qual cosa, segons el patró d'expressió de cada driver utilitzat, el valor dels nivells de la RT-PCR es poden veure disminuïts tot i el fenotip conegut de falta de migració dels embrions amb la sobreexpressió.

Analitzant les dades obtingudes amb la RT-PCR, i comparant els valors del control positiu de la sobreexpressió de Bnl utilitzant *inscGAL4*, es pot concloure que en els embrions mutants de *ptc*^{D130} existeix més expressió de Bnl, provocant així un impediment a les BGs per migrar normalment fins al SNC. Pel que fa la sobreexpressió de Hh amb els diferents drivers utilitzats s'observa que en tots ells Bnl està més expressat que no pas en els embrions wt.

Cal esmentar que la sobreexpressió de Hh utilitzant els *drivers* *ptcGAL4*, i *twiGAL4*, mostren nivells més elevats de Bnl en comparació de quan s'utilitza el *driver* *inscGAL4*, tot i observar-se falta de migració de les BG en tots els casos. Aquest fet és degut a que el domini d'expressió de *inscGAL4* està molt restringit al CNV, de tal manera que quan es mesuren nivells totals en el global de l'embrió, els valors més elevats de Bnl, que podem detectar usant *inscGAL4* amb la *in situ*, aquí es veuen diluïts, fet que no passa quan s'utilitzen altres *drivers* com ara *ptcGAL4* i *twiGAL4*, els quals presenten un domini d'expressió molt més ampli i afecten més cèl·lules positives per Ptc no que no pas els altres *drivers*.

2.15. L'augment dels nivells de Bnl en embrions heterozigots de *ptc* permet el rescat parcial de la migració de les BGs

Tots els resultats descrits fins ara semblen indicar que el motiu pel qual les BGs del mutant embrionari de *ptc^{D130}* no estenen correctament és el fet d'expressar massa Bnl en les cèl·lules que envolten la tràquea. Els embrions heterozigots de *bnl* (*bnl/+*) presenten una haploinsuficiència que fa que presentin un fenotip en el qual no totes les BGs penetren al SNC (Figura 57).

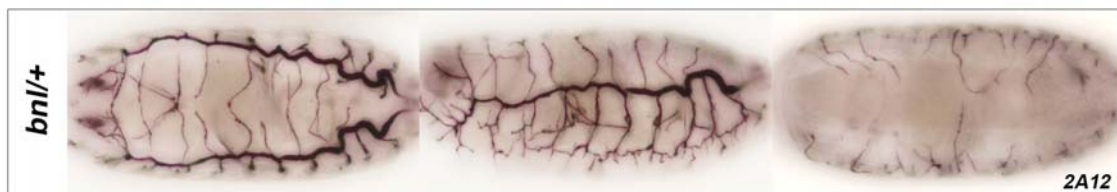
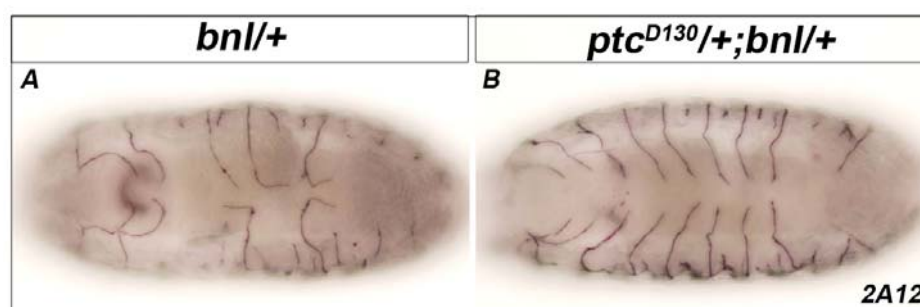
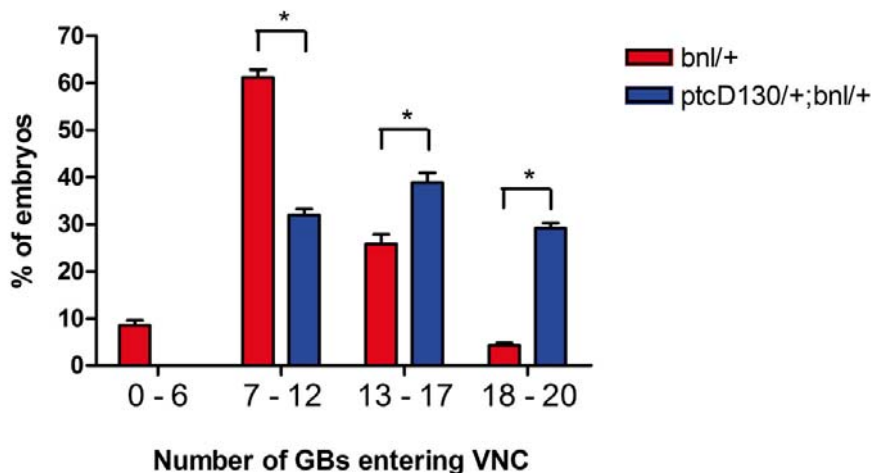


Figura 57. Fenotip traqueal dels embrions *bnl/+*. Vegi's com la haploinsuficiència dels embrions heterozigots de *bnl/+* fa que presentin menys BGs que arriben al CNV.

A fi d'augmentar els nivells de Bnl, es va treure una còpia *ptc^{D130}* per tal d'observar si es veia afectat el fenotip de migració de les BGs, i es podia rescatar la haploinsuficiència dels embrions heterozigots de *bnl*.



Gràfic 5. Gràfic on es representa el percentatge d'embrions depenen del nombre de BG que presentin capaces d'innervar el SNC. Els embrions s'han agrupat en categories segons si s'observa l'extensió de 0 a 6 BG, de 7 a 12, de 13 a 17 i de 18 a 20 BG. *bnl/+* (n=116), *ptc^{D130/+};bnl/+* (n=49). La tendència del gràfic indica que un augment dels nivells de Bnl en embrions heterozigots de *ptc*, permet un rescat parcial de la migració de les BGs. P-valors < 0,01.

En el Gràfic 5 es representen els percentatges d'embrions segons el nombre de BGs capaces de penetrar en el SNC, de tal manera que s'han agrupat els fenotips en que s'observa l'extensió de 0 a 6 BGs, de 7 a 12, de 13 a 17 i de 18 a 20 BGs. Es pot observar que en els embrions *ptc^{D130/+};bnl/+* es produeix un rescat parcial del fenotip, ja que hi ha un percentatge més alt d'embrions amb BGs capaces d'entrar en el SNC. El grup majoritari d'embrions *bnl/+* presenten de 7 a 12 BGs, mentre que el majoritari dels embrions *ptc^{D130/+};bnl/+* en mostren de 13 a 17. En l'últim grup, on s'hi troben representats els embrions que presenten de 18 a 20 BGs arribant al SNC, es troben també els embrions heterozigots de *ptc*.

En global, s'observa una tendència de recuperació de migració de les BGs en els embrions de *ptc^{D130/+};bnl/+*, suggerint que un augment dels nivells de Bnl en els embrions heterozigots de *ptc*, permet un rescat parcial de la migració de les BGs.

2.16. Esquema del model

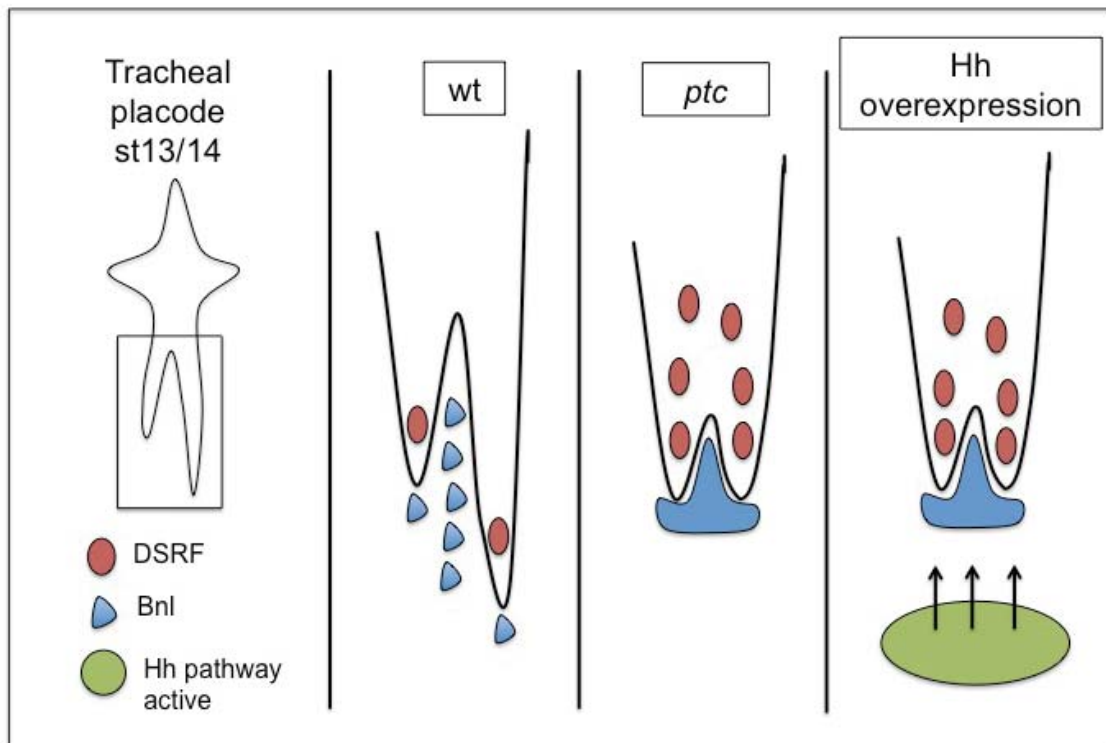


Figura 58. Model on s'esquematitza la contribució de la via de senyalització de Hh pel que fa a la migració de les BG del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. Cal tenir la via de senyalització de Hh activa en les cèl·lules productores de Bnl per tal de prevenir la migració de les BG en el sistema traqueal.

El model que es proposa després de l'anàlisi i descripció de tots els resultats obtinguts és el que es mostra en l'esquema de la Figura 58. En embrions wt, la migració de les BG té lloc gràcies a l'expressió de Bnl en unes cèl·lules concretes de l'ectoderm. En mutants embrionaris de *ptc*, on la via de senyalització de Hh es troba activada constitutivament, l'expressió de Bnl es veu modificada afectant així la migració i l'expressió del DSRF, que es detecta en l'estadi 13 del desenvolupament mentre que en embrions wt no es pot detectar fins a l'estadi 14. En embrions on s'ha produït la sobreexpressió ectòpica de la via de senyalització de Hh activada s'ha pogut reproduir el fenotip de falta de migració de les BGs del mutant de *ptc*, demostrant així que, l'activació de la via de Hh en les cèl·lules productores de Bnl compromet la correcta extensió de les BGs.

3. El morfogen Hedgehog actua com a quimioatracient en els axons de la línia mitjana de *Drosophila melanogaster*

Els axons en desenvolupament tant en vertebrats com en invertebrats, són guiats cap als seus destins per senyals de guiatge atractants i repel·lents. En els embrions de *Drosophila melanogaster*, la línia mitjana dirigeix els axons des d'una banda a l'altra del sistema nerviós establint gradients moleculars. Tal i com passa en la placa del terra dels vertebrats, s'han identificat varis tipus de molècules altament conservades com a senyals de guiatge, ja sigui com a atractants o repel·lents. Aquest repertori s'ha estès en incloure els morfògens, els quals també són capaços de guiar els axons durant el desenvolupament del sistema nerviós.

3.1. Els mutants de Hh mostren un fenotip de guiatge axonal a la línia mitjana de l'embrió.

Per tal d'analitzar la contribució de Hh i Ptc en el guiatge axonal de la línia mitjana, es va examinar el desenvolupament neuronal dels seus mutants. A més, es va utilitzar un mutant de *hh* sensible a la temperatura (*hh^{ts}*) que va permetre desvincular el fenotip observat de possibles efectes d'aquest morfogen durant la neurogènesi i per tant es va poder estudiar el seu efecte durant estadis tardans de guiatge axonal (Figura 59).

A fi d'observar el SN dels mutants es van utilitzar dos marcatges diferenciats: l'anticòs monoclonal BP102 per marcar les commissures del CNV i els axons longitudinals (Figura 59A). I l'anticòs monoclonal anti-FasciclinII (FasII) per analitzar si hi havia axons longitudinals específics que creuaven la línia mitjana utilitzant (Figura 59E). En els estadis embrionaris de 15 en endavant, l'anticòs anti-Fas II identifica tres feixos principals d'axons, els quals són visibles formant tres línies o feixos paral·lels que en embrions salvatges en cap cas creuen la línia mitjana del SNC: les línies són la mitja (FasII-m o 1^a), l'intermitja (FasII-i o 2^a) i la lateral (FasII-l o 3^a).

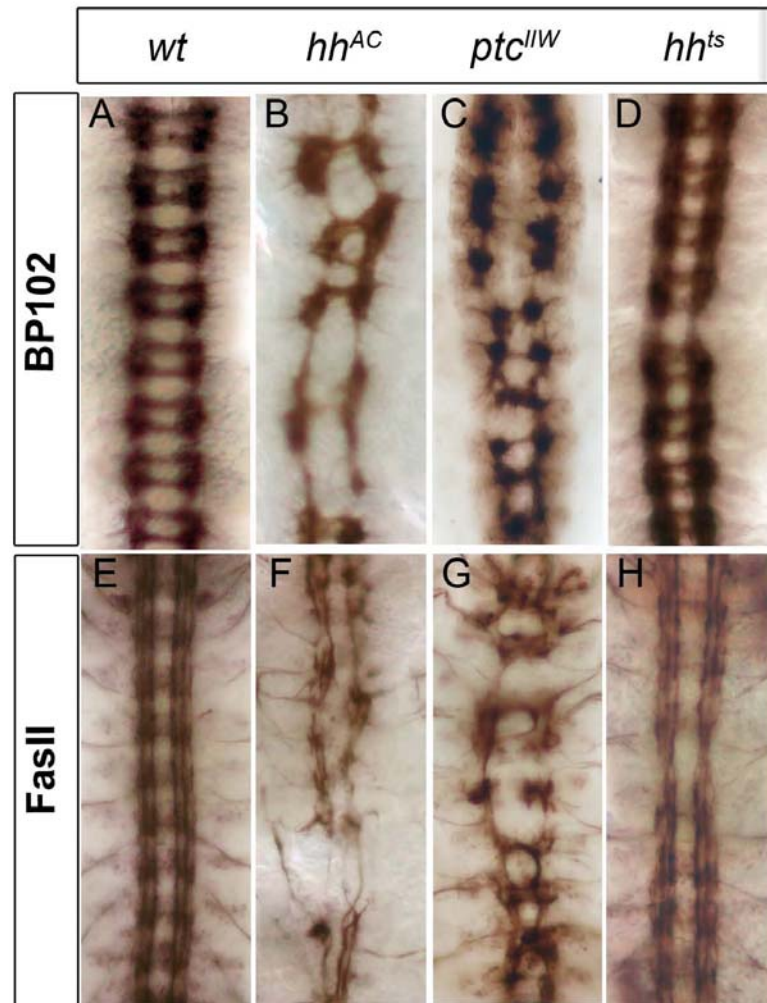


Figura 59. Defectes en el guiatge axonal en el CNV dels mutants embrionaris de *hh* i *ptc*. Embrions marcats amb BP102 (A-D) i anti-FasII per detectar els feixos axonals positius per FasII (E-H). A, embrió wt on es poden observar les comissures anteriors i posteriors i els connectors longitudinals. B i F, embrió mutant de *hh*, on les dues comissures i els connectors longitudinals han col·lapsat. C i G, embrió mutant de *ptc*, on les comissures es troben col·lapsades les unes amb les altres i es poden observar trencaments en els connectors; el feix del mig, en els casos que es forma, col·lapsa a l'alçada de la línia mitjana, els altres dos feixos són indistingibles. D i H, embrions mutants sensibles a la temperatura de *hh*, on s'ha modificat la temperatura als estadis 12-13 de l'embriogènesi, on es mostren defectes en els connectors longitudinals. En tots els embrions, la part anterior és a dalt.

Tal com s'havia descrit anteriorment en altres al·lels, *ptc* presenta importants defectes en el guiatge axonal, mostrant un fenotip "trencat": els axons no creixen entre els segments del CNV, i s'observen unes comissures més estretes i creuaments a la línia mitjana dels feixos d'axons longitudinals aberrants (Figura 59C). En els casos on es formen els connectors longitudinals positius per FasII, no és possible distingir la formació dels tres feixos de fibres longitudinals positius per FasII (Figura 59G). Molts

d'aquests aspectes s'havien atribuït a una mis-especificació i a una falta de neurones per una manca d'activitat de *Ptc* en el neuroectoderm (Patel et al., 1989; Merianda et al., 2005). Tanmateix, part d'aquests fenotips podrien ser deguts a defectes de guiatge addicionals.

Els embrions mutants de *hh*, tot i presentar defectes més severes que no pas els de *ptc*, mostren menys disruptions axonals al SNC. Commissures i connectors es troben desorganitzats i fins i tot fusionats en varis segments, i les fibres longitudinals són més primes. A més, falten algunes de les commissures i els feixos axonals positius per FasII rarament creuen la línia mitjana (Figura 59B i F). Hh s'ha descrit per actuar com a regulador de l'expressió de molts gens a la línia mitjana. Concretament, Hh reprimeix la glia mitja anterior (GMA), activa l'expressió gènica de la glia mitja posterior (GMP) i defineix el destí neuronal a la part posterior de cada segment (Jacobs, 2000; Watson et al., 2011). En mutants de *hh*, moltes cèl·lules de la línia mitjana moren, i les que sobreviuen no estan diferenciades (Bossing and Brand, 2006). Tanmateix, de la mateixa manera que en mutants de *ptc*, defectes que presenten els mutants de *hh* al SNC es poden atribuir també a alteracions de quimioattractants i/o quimiorepellents i no només a canvis de destí cel·lular.

Donada la pleiotropia d'aquests mutants, i els importants efectes de Hh durant el desenvolupament embrionari i en concret durant el desenvolupament neuronal primerenc, es va inactivar aquest morfogen en estadis avançats del desenvolupament (Vegi's l'apartat de materials i mètodes) utilitzant un al·lel sensible a la temperatura. Es va inactivar *hh* després que tingués lloc la neurogènesi i només es van poder detectar alguns defectes poc importants en el SNC embrionari (Figura 59D, H): un discret eixamplament dels connectors, un apropament de les commissures, (Figura 59D) i efectes de guiatge en els feixos laterals (Figura 59H). Aquests resultats suggereixen una implicació de Hh durant els estadis on té lloc el guiatge. Tanmateix, degut a la seva dèbil acció, és molt probable la contribució d'altres agents en el guiatge dels axons que formen les commissures, amb els quals Hh podria actuar conjuntament. A més, els fenotips embrionaris tardans van en concordança amb els resultats previs que mostren que, quan es produeix un rescat dels mutants de *ptc* pels seus defectes primerencs en la neurogènesi, continuen mostrant fenotips de guiatge axonal (Merianda et al., 2005). Aquesta observació implica una influència de Hh i *Ptc* no només durant la neurogènesi,

sinó també durant els estadis de guiatge. Així doncs, aquests resultats suggereixen que el morfogen Hh i el seu receptor Ptc, podrien estar implicats en el guiatge axonal de *Drosophila melanogaster*.

3.2. Hh s'expressa en un subconjunt de cèl·lules de la glia de la línia mitjana.

Hh és una proteïna secretada segmentalment. Durant l'embriogènesi, la seva expressió en cèl·lules de l'epidermis es restringeix al compartiment posterior de cada segment. A més, *hh* també s'expressa a la línia mitjana del SNC. (Tabata et al., 1992; Bossing and Brand, 2006; Watson et al., 2011). A fi de definir quines cèl·lules del SNC expressen *hh* a estadis més tardans del desenvolupament embrionari, es va analitzar la seva expressió en els estadis 13 i 16 a través del reporter *hh-lacZ* (Figura 60).

Es va detectar l'expressió de *hh* tant en la línia mitjana com en les commissures i en les fibres connectores del SNC en els dos estadis observats (Figura 60A-F). A l'estadi embrionari 16, *hh* s'expressa a les cèl·lules situades a la banda posterior de la commissura posterior, i en les cèl·lules que envolten els connectors individuals, així com, de manera destacable, es detecta l'expressió de *hh* en algunes cèl·lules de la línia mitjana (fletxes de la Figura 60A-D). Els nuclis de la majoria de les cèl·lules de la glia del SNC es poden visualitzar utilitzant un anticòs contra el marcador de la proteïna de la glia Reversed polarity (Repo) (Bossing and Brand, 2006). Amb aquest marcatge es pot observar com algunes de les cèl·lules que expressen *hh* a la línia mitjana de l'embrió són cèl·lules de la glia, ja que és possible veure colocalització de la *lacZ*, expressada en el domini d'expressió de *hh*, i de la proteïna Repo (Figura 60D' puntes de fletxa). No obstant això, *hh* no s'expressa en la glia de la línia mitjana, tal com s'ha pogut comprovar per anàlisis de colocalització de Hh amb les proteïnes Sim o Wrapper. Tanmateix, atès que Hh és una proteïna que és secretada, l'expressió a les cèl·lules de la línia mitjana i a les que l'envolten, és suficient per justificar la presència d'aquest morfogen a la línia mitjana de *Drosophila melanogaster*.

En estadis primerencs del desenvolupament, quan les molècules de guiatge tenen una major importància pel que fa a la formació dels feixos axonals pioners, es detecten cèl·lules que expressen *hh* al SNC, les que envolten el primer feix de guiatge axonal i les neurones pioneres (Figura 60E, F).

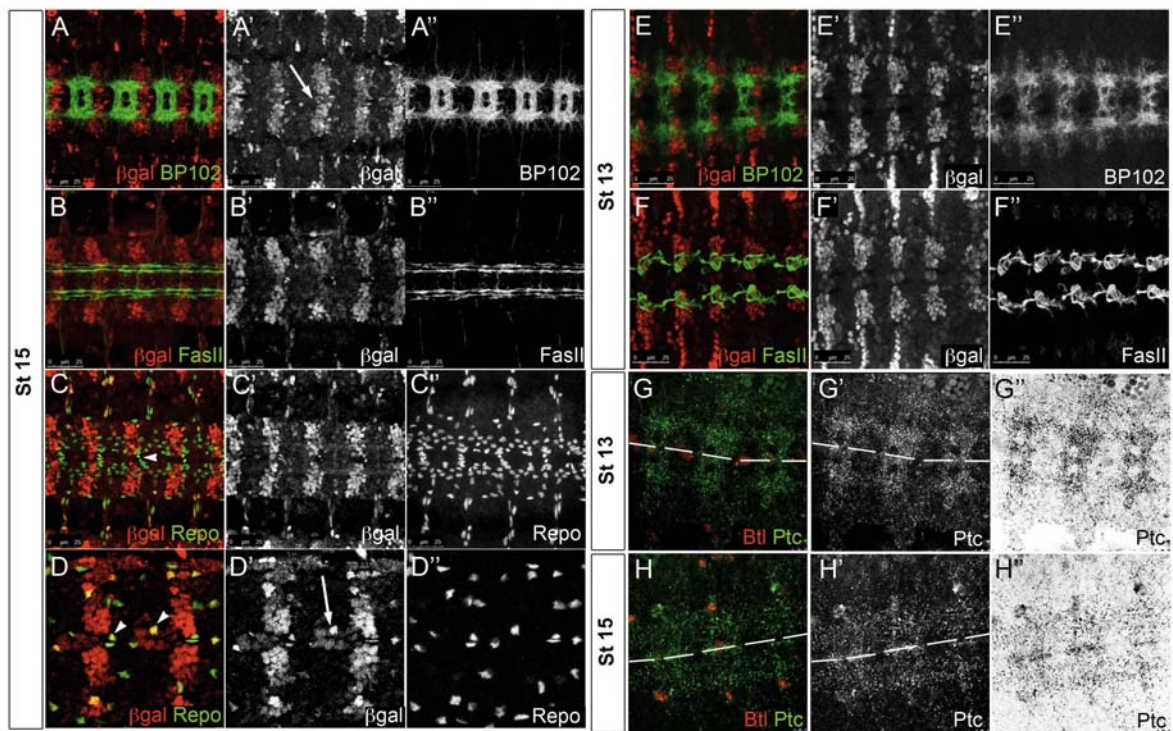


Figura 60. Hh s'expressa en un subconjunt de cèl·lules de la glia de la línia mitjana i Ptc es detecta en els axons. Embrions Hh-LacZ (A-F) i embrions wt (G i H) d'estadi embrionari 13 (E, F i G) i estadi 15 (A-D i H). A i E, embrions marcats amb BP102 i anti-β-galactosidasa (βgal) com a *reporter* per Hh, mostrant les cèl·lules positives per a Hh a la línia mitjana del SNC (fletxa) i les cèl·lules positives per a Hh envoltant els axons. B i F, embrions marcats amb anti-FasII i anti-βgal, mostrant les cèl·lules positives per a Hh envoltant els feixos positius per FasII. C i D, embrions marcats amb anti-Repo i anti-βgal, mostrant que algunes cèl·lules positives per a Hh són també cèl·lules de la glia (fletxa i punta de fletxa); D, detall del panell C, un augment 2x del zoom digital de C mostrant un nombre diferent de seccions en Z utilitzades per la projecció (20 en C i 7 en D, totes les seccions són de 0,5 μm). G i H, embrions que expressen un “reporter” nuclear per totes les cèl·lules que expressen *breathless*, per visualitzar millor la posició de la línia mitjana, marcatge amb l'anticòs anti-Patched i mostrant la presència d'aquest receptor en tots els axons del SNC; comparant amb els marcatges amb BP102 en els panells E i A, respectivament; la línia puntejada indica la situació de la línia mitjana. Esperant senyals dèbils i per tal d'evitar artefactes de la immunohistoquímica, no es van utilitzar altres anticossos contra altres proteïnes del sistema nerviós. G'' i H'' són inversions en blanc i negre de G' i H' per permetre una millor visualització. En tots els embrions, la part anterior és a l'esquerra.

Ptc és el receptor de la via canònica de Hh, i la seva expressió serveix com a indicador que la cèl·lula respon a la via de senyalització de Hh (Watson et al., 2011). D'aquesta manera, si Hh s'expressa al SNC i té un paper en el guiatge axonal, Ptc hauria de ser present en els axons per tal de transmetre el senyal del quimioatracent o quimiorrepel·lent de manera intracel·lular. L'expressió de Ptc s'ha observat en diverses cèl·lules del SNC (Hooper and Scott, 1989; Watson et al., 2011), però aquí interessa especialment verificar l'expressió de Ptc en els axons, utilitzant l'anticòs monoclonal contra el primer domini extracel·lular de la proteïna Ptc que, en condicions normals, es detecta majoritàriament en vesícules endocítiques primerenques (Torroja et al., 2004). Com que s'esperaven nivells de senyal baixos i per evitar artefactes derivats de la immunohistoquímica, no es van utilitzar altres anticòsos contra altres proteïnes del sistema nerviós. En el seu lloc es va utilitzar uns embrions "BltGAL4UASredstinger", en que es poden detectar totes les cèl·lules positives per Btl a través d'un marcador nuclear, el qual marca la línia mitjana del SNC i les cèl·lules de la tràquea. Així doncs es va poder detectar la proteïna de Ptc en els axons del SNC tant en estadis primerencs com tardans del desenvolupament (Figura 2 G-H). En conjunt, aquests resultats confirmen la presència d'ambdós Hh i Ptc en el SNC durant els estadis embrionaris on es produeix guiatge axonal.

3.3. El morfogen Hh actua com un atraient pels axons del SNC

A causa de la pleiotropia dels dos mutants de *hh* i *ptc*, inevitable encara que s'utilitzin mutacions sensibles a la temperatura, experiments de mis-expressió proporcionen un anàlisi més directe de l'habilitat de *hh* com a influència del guiatge axonal. Estudis previs han demostrat que la sobreexpressió de *hh* en el SNC utilitzant *drivers* generals com ara *scabrous* (*sca*) o *embryonic lethal abnormal vision* (*elav*) provoquen defectes axonals significatius (Bossing and Brand, 2006). Per tant, es va utilitzar el *single-mindedGAL4* (*simGAL4*) per tal d'expressar *hh* només a les cèl·lules de la línia mitjana del SNC des d'estadis primerencs (Nambu et al., 1990) i es van verificar els defectes de guiatge utilitzant l'anticòs BP102 i l'anti-FasII (Figura 61A-D). Aquests experiments demostren que la sobreexpressió de *hh* causa creuaments a la línia mitjana de les fibres de FasII (Figura 61B-D). Més concretament, el feix del mig positiu per FasII, que normalment no creua la línia mitjana, mostra una mitjana de 4 a 7 creuaments per embrió (n=40) en comparació amb el wt on no se n'observa cap (n=28);

els feixos intermedis i laterals no mostren creuaments significatius entre ells (Figura 61D, E). Quan es marquen tots els axons usant l'anticòs BP102 (Figura 61A, B) o un anticòs anti-HRP (Figura 62B, D), es poden detectar també els creuaments de la mitja observant-se un excés d'axons comissurals i una disminució en l'espessor dels connectors longitudinals. Tanmateix, aquests fenotips són molt dèbils i moltes vegades fins i tot indetectables (50%, n=30), suggerint que l'efecte de tenir un excés de Hh a la línia mitjana és més específic en els axons de la FasII-m.

En molts mutants que tenen afectada la diferenciació cel·lular i/o el nombre de cèl·lules de la línia mitjana, com ara en els de *tramtrack (ttk)*, *pointed (pnt)* o *single-minded (sim)*, o en situacions on es produeix mort cel·lular massiva al SNC (Hidalgo et al., 1995; Hidalgo and Brand, 1997), els axons positius tan per FasII com per BP102 col·lapsen a la línia mitjana. Per tant, aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió de Hh a la línia mitjana causa creuaments específics en el subconjunt d'axons i no un col·lapse a la línia mitjana del CNV degut a canvis de destí cel·lular o nombre de cèl·lules. A més a més, el fenotip de sobreexpressió és clarament detectable en els axons positius per FasII-m i quasi indetectable quan s'utilitzen marcadors generals com BP102 i HRP. Això suggereix que els fenotips observats són més específics en els feixos que expressen FasII-m.

A fi de confirmar aquests resultats, es va sobreexpressar *hh* utilitzant *enGAL4*, el qual s'expressa segmentalment en cèl·lules del CNV i en algunes cèl·lules de la línia mitjana (Nambu et al., 1990; Bossing and Brand, 2006). Es van detectar d'1 a 4 creuaments a la línia mitjana per embrió (n=10), confirmant que l'excés de Hh a la línia mitjana indueix creuaments ectòpics (Figura 61F i G, fletxa).

Per tal d'entendre millor com l'excés de Hh a la línia mitjana afecta la formació del patró axonal, es va utilitzar un marcador cel·lular individual que revela les projeccions contralaterals. En embrions wt, el marcador *SemaIIbtmmyc* (Rajagopalan et al., 2000) s'expressa únicament en una neurona per hemineuròmer; aquesta neurona projecta el seu axó a través de la línia mitjana i després segueix un camí específic dins els connectors longitudinals, des del feix del mig al de la FasII-i (Figura 3F) (Spitzweck et al., 2010). Quan s'expressa *hh* a la línia mitjana, l'especificació i el posicionament de les neurones *SemaIIb* no es veu afectat, així com tampoc el conjunt de les trajectòries

axonals. Tanmateix, es produeix un canvi en la posició dels axons que expressen *SemaIIb* a l'altura de la línia mitjana del SNC, malgrat que la posició de les neurones *SemaIIb* no es vegi afectada (Figura 61F i G, fletxes). Encara que les projeccions axonals mantenen la llargada normal, s'aprecien algunes irregularitats en alguns segments (Figura 61G, asterisc), tot i que mai s'observen creuaments en els axons positius per *SemaIIb*. Aquests resultats suggereixen que *Hh* és el responsable dels creuaments ectòpics només en els feixos connectors que estenen a prop de la línia mitjana.

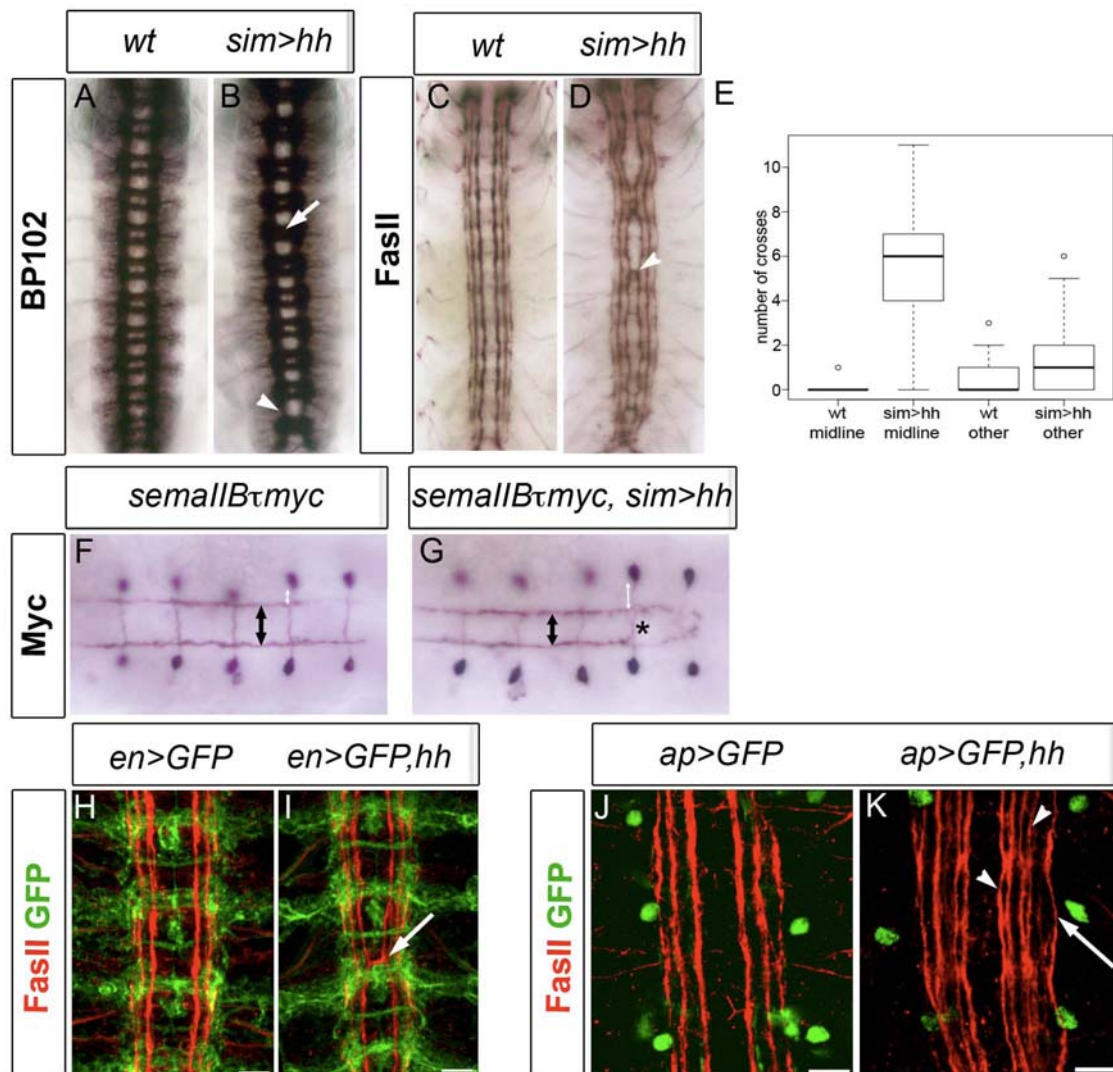


Figura 61. La sobreexpressió de Hh atrau els axons a la línia mitjana. Els embrions estan marcats amb BP102 per visualitzar els axons del SNC (A i B) i anti-FasII per veure els feixos axonals positius per FasII (C i D). B i D mostren la línia mitjana en l'estadi embrionari 16 on *hh* s'expressa en totes les cèl·lules positives per Sim. La fletxa en el panell B indica els creuaments a la línia mitjana i la punta de fletxa indica els punts més estrets dels connectors longitudinals, com a resultat dels defectes en el guiatge a la línia mitjana. La punta de fletxa en el panell D indica un creuament representatiu i característic de la

línia mitjana d'embrions quan hi ha un excés de Hh a la línia mitjana. Box plot que s'ha utilitzat per representar les dades de quantificació dels creuaments en les fibres de FasII. Les caixes mostren el rang dels interquartils, la línia superior de les caixes representen el valor màxim i la línia inferior representa el mínim. Les línies negres mostren les mitjanes i les petites barres al final de les línies puntejades mostren els valors més alts i més baixos. Els cercles petits indiquen els "normal outliers". F i G són embrions que contenen el "reporter" SemaIIb^{trmyc} i estan marcats amb anti-Myc per visualitzar els axons positius per SemaIIb; les fletxes negres indiquen la distància entre feixos axonals i les fletxes blanques la distància entre cossos cel·lulars neuronals i els connectors longitudinals formats pel mateix axó; l'asterisc indica febles problemes de guiatge en les commissures sobre l'expressió de Hh a la línia mitjana. H i I són projeccions confocals de la línia mitjana d'embrions que expressen GFP en totes les cèl·lules que expressen *engrailed* i estan marcats amb GFP i Fas-II. I, mostra la sobreexpressió de Hh en les mateixes cèl·lules positives per *engrailed*; la fletxa mostra un creuament característic a la línia mitjana d'aquests embrions. J i K són projeccions confocals de la línia mitjana d'embrions que expressen GFP en totes les interneurons i les seves projeccions que expressen *apterous* i estan marcats amb GFP i Fas-II. K, mostra la sobreexpressió de Hh en les mateixes cèl·lules positives per *apterous*; la fletxa i la punta de fletxa indiquen els fenotips de guiatge en la línia mitjana produïts en les fibres FasII d'aquests embrions. La part anterior és a dalt en tots els panells excepte en els F i G on és a l'esquerra.

Si el morfogen Hh és un senyal d'atracció per la migració axonal, la seva mis-expression fora la línia mitjana del SNC hauria d'atraure els axons cap als nous llocs d'expressió. Per tal d'analitzar-ho, es va mis-expressar *hh* en neurones que expressen *apterous* (*ap*), utilitzant un apGAL4. Existeixen tres interneurons que expressen *ap* per cada segment abdominal, localitzat fora el feix lateral positiu per FasII (Lundgren et al., 1995) (Figura 61J). En expressar *hh* en aquestes neurones s'observa un encorbament del feix lateral d'axons cap a la font de Hh. Contrastant amb els axons del feix del mig, quan *hh* s'expressa a la línia mitjana, no s'ha pogut detectar altres situacions de guiatge erroni, únicament intents febles dels feixos positius per FasII-l cap a la font del quimioattractant (Figura 61K). A més, és possible detectar algunes desfasciculacions dins els feixos positius per FasII (Figura 61K, puntes de fletxa). Aquestes observacions suggereixen que els axons deuen necessitar altres factors per tal d'interpretar la senyal quimioattractant de Hh i que aquests factors extres deuen estar presents en alts nivells a la línia mitjana que envolta la perifèria del SNC. En conjunt, aquestes mis/sobreexpressions indiquen que Hh té un paper com a atractant pels axons del SNC de la *D. melanogaster*.

3.4. L'activitat del quimioattractant Hh no sembla ser deguda a la pèrdua de cèl·lules a la línia mitjana o a canvis de destí cel·lular

Encara que aquests resultats recolzen un paper de Hh com a inductor de creuaments a la línia mitjana, no aclareixen com aquest morfogen dur a terme el seu efecte. En comptes d'actuar com una molècula de guiatge provocant el subseqüent creixement del con, Hh podria estar refent el patró de les cèl·lules de la línia mitjana i induint fenotips similars. Per exemple, si les cèl·lules de la glia de la línia mitjana moren o no es desenvolupen, s'observen els axons del SNC creuant incorrectament la línia mitjana, presumiblement com a conseqüència de l'absència d'aquestes cèl·lules i dels seus factors de secreció (Klamt et al., 1991). A fi de comprovar la integritat de les cèl·lules de la línia mitjana en el context de la sobreexpressió de *hh*, es van tenyir aquests embrions amb un anticòs contra la proteïna Wrapper, la qual marca específicament les cèl·lules de glia de la línia mitjana (Noordermeer et al., 1998). Mentre que l'ordre precís de les cèl·lules de la glia de la línia mitjana es veu una mica alterat en els embrions mutants i els nivells de Wrapper semblen ser més alts en algunes cèl·lules i més baixos en altres, en tots els casos es troben les cèl·lules que expressen Wrapper a la línia mitjana del SNC (Figura 62B). D'aquesta manera els creuaments extrems dels axons a la línia mitjana en embrions amb excés de Hh no es poden atribuir a l'absència de cèl·lules de la glia. No obstant això, no es pot excloure la possibilitat que els defectes en el posicionament de les cèl·lules de la glia poden contribuir en alguns aspectes d'aquest fenotip, per exemple, a febles defectes de separació de les commissures anterior i posterior en alguns segments (Figura 62B i Figura 62B). En concordança amb els resultats obtinguts en aquest estudi, s'ha demostrat prèviament que l'expressió de *hh* en cèl·lules positives per Sim disminueix els nivells d'expressió de la proteïna Wrapper (Watson et al., 2011). Tanmateix, els mutants embrionaris de *wrapper* mostren fenotips molt dèbils de guiatge a la línia mitjana (Noordermeer et al., 1998). Així doncs, el fenotip fort i consistent de creuaments axonals en embrions Sim>Hh que s'ha caracteritzat en aquest estudi, no es pot atribuir als canvis de nivells de Wrapper en les cèl·lules de la línia mitjana. A fi d'obtenir una visió general del nombre de cèl·lules de la glia i del seu posicionament a la línia mitjana, es van analitzar el nombre i les posicions de les cèl·lules positives per Repo en embrions que expressen Hh en la glia de la línia mitjana. En conjunt, no es van poder detectar defectes ni en el nombre de cèl·lules de la glia ni en la seva posició (Figura 62C i D).

Una altra possibilitat per la qual es poden generar aquests fenotips, podria ser la interferència amb la diferenciació cel·lular que té lloc a la línia mitjana. Hh és essencial per induir i mantenir l'expressió tardana d'*en* a la línia mitjana. Els defectes axonals més importants es detecten en l'expressió de Hh utilitzant un *driver panneural* primerenc, i aquests fenotips de destí cel·lular causats pel Hh ectòpic són deguts a la subseqüent inducció d'*en* en aquest teixit (Bossing and Brand, 2006). Per tal de descartar si els mateixos defectes de destí cel·lular poden ser els responsables dels fenotips observats de guiatge axonal quan s'expressa Hh en cèl·lules positives per Sim, es va sobreexpressar *en* a la línia mitjana utilitzant el mateix *driver*. En induir alts nivells d'*En* a la línia mitjana es van poder detectar defectes de guiatge en un 90% dels embrions observats (n=20). Aquest ventall de fenotips de guiatge en axons FasII-m (Figura 62E, puntes de fletxa), de creuaments menors a la línia mitjana (Figura 62E, fletxa; des d'1 a 3 per embrió en un 85%), i alguns col·lapses a la línia mitjana (Figura 62E, asterisc; en un 15%), així com a interrupcions més severes al CNV com ara obertures a la línia mitjana, són deguts sobretot a la pèrdua cel·lular (45%). A més a més, quan s'observen tots els axons, es pot detectar l'absència d'algunes comissures. Malgrat aquests defectes, *sim>en* no fenocopia *sim>hh*, cosa que indica que els fenotips observats quan es sobreexpressa Hh a la línia mitjana no són deguts a la inducció de problemes de diferenciació per part d'*En*. En conjunt, aquests resultats indiquen que els fenotips obtinguts sobre l'expressió de Hh a la línia mitjana, no es deuen a la pèrdua de cèl·lules de la línia mitjana o a canvis d'identitat cel·lular.

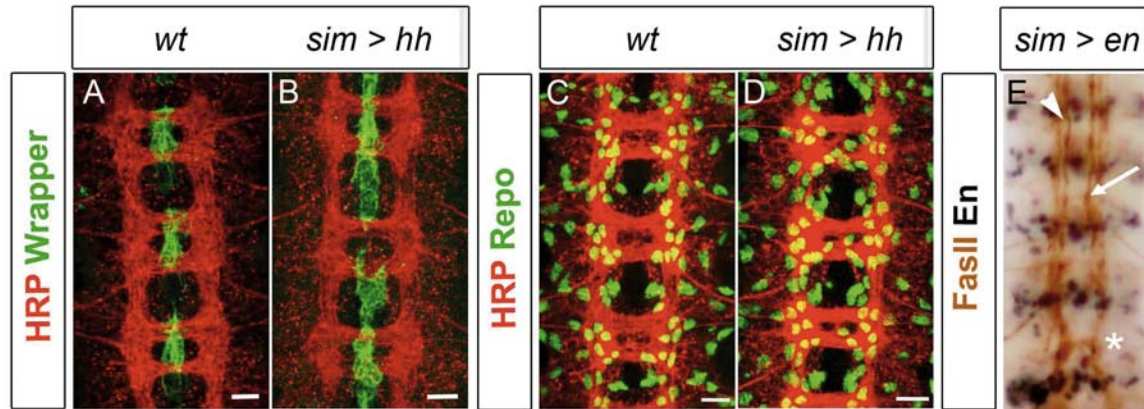


Figura 62. La sobreexpressió de Hh a la línia mitjana no produeix canvis destacables de diferenciació. Els embrions d'estadi embrionari 16 marcats amb HRP per tal de visualitzar els axons i anti-Wrapper per tal de marcat les cèl·lules de la glia de la línia mitjana (A i B) o anti-Repo a fi de visualitzar totes les cèl·lules de la glia, excepte les de la línia mitjana (C i D). B i D mostren la línia mitjana d'embrions en estadi embrionari 16 on *hh* s'ha expressat en totes les cèl·lules positives per Sim a la línia mitjana. El nombre de seccions en Z en C i D és el mateix per tal de mostrar millor el nombre i les posicions de les cèl·lules de la glia. E, mostra la sobreexpressió d'*engrailed* en cèl·lules positives per Sim; la fletxa mostra els creuaments a la línia mitjana, les puntes de fletxa el feble desviament del feix FasII-m cap a la línia mitjana, i l'asterisc el col·lapse dels feixos axonals a la línia mitjana. La part anterior és a dalt en tots els panells.

3.5. Patched és el receptor pel senyal de Hh provinent de la línia mitjana

Ptc és una proteïna transmembrana que conté dos grans loops o bucles extracel·lulars implicats en la unió de Hh. Per tal de comprovar si l'augment de creuaments a la línia mitjana, quan es tenen nivells elevats de Hh, depèn de Ptc, receptor de la via de Hh, es va utilitzar la construcció de Hh-Ptc es comporta d'una forma autònoma, lligant constitutivament a Hh (Casali and Struhl, 2004). Quan es sobreexpressa en el domini d'expressió de Ptc, utilitzant un PtcGAL4 com a *driver*, s'indueixen defectes similars als de la falta del receptor Ptc, com ara l'activació de la via de senyalització de Hh. A fi de comprovar quan i on els creuaments de la línia mitjana depenen de la unió de Hh amb Ptc, es va expressar la construcció Hh-Ptc a diferents estadis i/o en diferents cèl·lules del sistema nerviós en desenvolupament (Figura 63). Quan Hh-Ptc s'expressa en tots els neuroblasts i en la seva progènia des dels estadis embrionaris 10/11 utilitzant scaGAL4 com a *driver* (Klaes et al., 1994), s'observa un fort fenotip neuronal en aproximadament un 40% dels embrions (n=34). En aquests embrions, les neurones estenen poques projeccions i el SNC es troba

altament desorganitzat. També es van poder identificar fenotips similars a *ptc* (30%) o lleugerament més suaus (30%, tal i com es representa a la Figura 63B). Aquests fenotips són probablement deguts a defectes en la diferenciació neuronal i en l'extensió axonal sobre l'activació de la via de senyalització de Hh en el neuroectoderm des d'estadis primerencs.

Es va procedir a expressar Hh-Ptc només en neurones a partir de l'estadi 12 fins al final de l'embriogènesi, utilitzant un *elavGAL4* com a *driver* (Robinow and White, 1988). En aquesta mis-expressió, es van poder detectar creuaments a la línia mitjana i problemes generals en els tres feixos positius per FasII (Figura 63C).

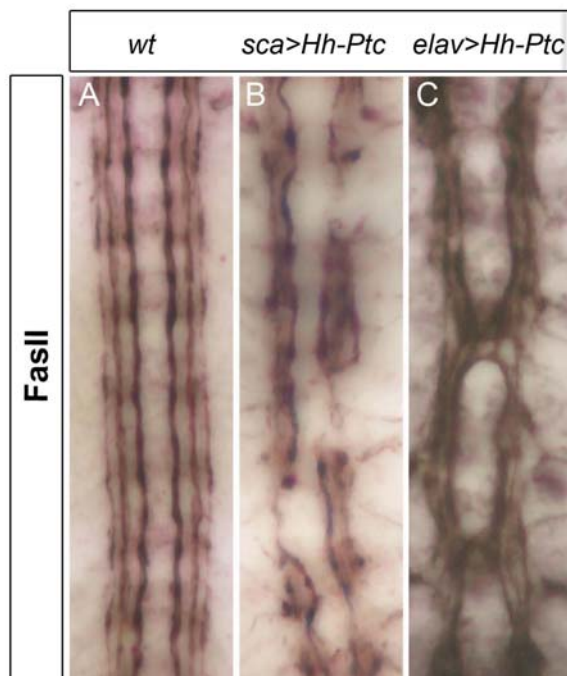


Figura 63. El quimioatracient Hh és mediat per Ptc. Els embrions d'estadi embrionari 16 marcats amb anti-FasII (A-C). A, wt; B, sobreexpressió de Hh-Ptc en tots els neuroblasts des de els estadis embrionaris 10/11; C, sobreexpressió de Hh-Ptc en totes les neurones post-mitòtiques. La part anterior és a dalt en tots els panells.

Aquests fenotips probablement siguin el resultat dels efectes directes del guiatge axonal i no són causats per efectes indirectes de canvis en el destí cel·lular ja que s'han induït per una mis-expressió de Hh-Ptc en neurones post-mitòtiques. En vista d'aquests resultats es proposa que la unió de Hh a Ptc a la membrana axonal fa aquests axons més propensos a creuar la línia mitjana. Tot i això no es pot descartar la possibilitat que aquests fenotips siguin deguts a un excés en l'activació de la via de senyalització de Hh en les neurones de voltant. Per tal d'aclarir aquest punt, es va activar la resposta *downstream* de la via de senyalització de Hh expressant CiAct (Hepker et al., 1997) i utilitzant el mateix *elavGAL4 driver* sota les mateixes condicions. Quan la via de

senyalització de Hh està activa en les neurones post-mitòtiques, no es pot detectar cap fenotip axonal, confirmant que es la unió de Hh a Ptc en els axons el responsable pels fenotips de guiatge axonals observats.

3.6. Esquema del model

Després de l'anàlisi de tots els resultats analitzats per tal de considerar la contribució del morfogen Hh en el guiatge dels axons a la línia mitjana embrionària de *Drosophila melanogaster*, es proposa un model (Figura 64) en el que s'integra la funció de Hh a la línia mitjana, amb la dels altres quimioattractants i quimiorrepelents més destacables pel que fa al guiatge a la línia mitjana en *Drosophila melanogaster*. Robo-Slit i Derailed-Wnt5 actuen com a repel·lents del creixement dels cons comissurals, les Netrines són atretes per Frazzled, i juntament amb aquests, els axons són atrets cap a la línia mitjana per Hedgehog, via el seu receptor Patched.

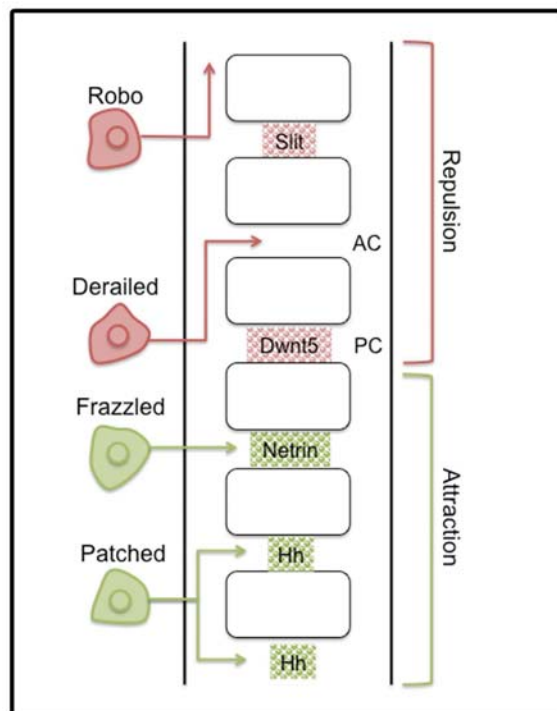


Figura 64. El morfogen Hedgehog és un quimioattractant pels axons de la línia mitjana de *D. melanogaster*. Model on s'esquematisa la funció de Hedgehog a la línia mitjana embrionària, on s'indiquen també els quimioattractants i quimiorrepelents més destacables pel que fa al guiatge a la línia mitjana en *D. melanogaster*. Robo-Slit i Derailed-Wnt5 són repel·lents del creixement dels cons comissurals i en són attractants Frazzled-Netrins. Juntament amb els Netrins, els axons són atrets cap a la línia mitjana per Hedgehog, via el seu receptor Patched.

DISCUSSION

V. DISCUSSIÓ

La discussió està dividida en tres grans blocs, discutint els tres punts desenvolupats en els resultats. El primer fa referència al cribatge de EMS. En el segon bloc s'analitzen els resultats obtinguts de la contribució de *ptc* i la via de senyalització de Hh durant el desenvolupament del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. I en el tercer apartat, la contribució de la via de senyalització de Hh en el guiatge axonal del sistema nerviós de *Drosophila melanogaster*.

1. Cribatges per trobar nous mutants en el sistema nerviós i traqueal.

1.1. Mutagènesis en *Drosophila*. Avantatges i desavantatges dels cribatges de EMS

Un dels èxits de la *Drosophila melanogaster* com a organisme model genètic és el fet que poder identificar una gran varietat de gens, implicats en diversos processos biològics, gràcies als *screens* o cribatges genètics.

Una de les metodologies més eficients per a la identificació de nous gens és el fet d'afegir etil metà sulfonat (EMS) en el menjar de les mosques, una substància que genera mutacions puntuals (Lewis, 1968). L'EMS és un dels mutàgens més utilitzats ja que és fàcil d'administrar i provoca mutacions en una alta freqüència. Majoritàriament indueix canvis en les bases nitrogenades (mutacions puntuals), la qual cosa interromp la funció gènica causant mutacions sense sentit (missense or nonsense), i la freqüència d'aquestes mutacions dependrà de les característiques del gen, de la mida de les regions codificants, del nombre d'aminoàcids crucials que contingui i de la concentració de EMS. Utilitzant el protocol de mutagènesi estàndard amb 25 mM d'EMS, la taxa de mutació és d'1 mutació letal per braç de cromosoma aproximadament (Fly pushing).

Un altre dels avantatges dels cribatges d'EMS, és el fet que es puguin produir mutacions hipomorfes (no nul·les), les quals causen una pèrdua parcial de la funció gènica, ja sigui per una reducció de la proteïna o el RNA, o per una funcionalitat reduïda. En els cribatges d'EMS també es poden produir diferents mutacions en el

mateix gen, la qual cosa pot ser interessant per a la posterior caracterització de la mutació.

Tanmateix, aquest mètode presenta una sèrie de desavantatges, per exemple, que els gens que són molt llargs apareixen amb molta freqüència en els cribatges. Un altre punt feble dels cribatges fets amb EMS és que la progènia F1 sovint són mosaics, és a dir, que algunes de les cèl·lules hauran heretat la mutació i algunes altres no, i per tant, mutants identificats en la primera generació del cribatge poden no transmetre la mutació a la següent generació, a no ser que la mutació s'hagi produït en la línia germinal, ja que els canvis de bases nitrogenades generats amb EMS es produeixen en només una de les cadenes de DNA. És per aquest motiu que s'escullen els mutants de la segona generació F2 i no en la primera.

Una alternativa de mutagènesis és la radiació amb raig X, la qual és menys eficient que el EMS, però indueix mutacions en la doble cadena de DNA cosa que evitarà els mosaics. A més, com que la majoria de mutacions induïdes per raigs X produeixen reorganitzacions cromosòmiques o delecions, poden ser fàcilment detectables citològicament en els cromosomes politènics, els quals permeten un mapatge ràpid de la regió afectada i la identificació mitjançant Southern blots (St Johnston, 2002).

Els elements-P transposables són una altra estratègia comunament utilitzada per a la generació de cribatges. Les mutacions causades per insercions d'elements P poden ser ràpidament identificables ja que sovint s'utilitzen amb una etiqueta *tag*.

Cal tenir present que no hi ha un cribatge perfecte, que en cap d'ells es poden trobar tots els gens, i l'elecció d'un o altre mutagen dependrà de l'objectiu de l'estudi.

1.2. Mutant embrionari GA833

El fenotip del mutant embrionari de GA833 presenta problemes de fusió o migració cel·lular a nivell del TD i del TL. Es va fer una hibridació *in situ* del gen CG6280 en els mutants de GA833, després d'haver descartat els altres gens pels resultats del test de complementació o nivells d'expressió dels altres gens en l'embrió. El gen CG6280 es troba present a la regió 2R:9510513;9613158. El fet que es detecti la presència de mRNA de CG6280 en els embrions mutants de GA833 no significa que la mutació no es pugui trobar en aquest gen, ja que es podria tractar d'una proteïna truncada i no funcional. La seqüenciació d'un mutant que conté una mutació puntual, ja que prové d'un cribatge amb EMS, és laboriosa i en ella s'han de poder discriminar les mutacions sense sentit i aquelles que poden eliminar la funció o provocar un canvi de funció en la proteïna. És per això que es va seqüenciar cada regió tant des de 3' com de 5', per tal de tenir el resultat per duplicat del mateix fragment seqüenciat.

El fet que no s'hagi pogut identificar cap mutació pot significar que aquesta es troba en alguna de les regions que no ha estat seqüenciada, que es troba localitzada en regions no codificants a 3'UTR o 5'UTR, o en un intró. També podria ser que no es tractés d'aquest gen, amb la qual cosa s'haurien d'analitzar els altres gens candidats que es troben a la mateixa regió cromosòmica encara que segons modENCODE sembla que no tinguin expressió en l'embrió.

En la hibridació *in situ* s'ha observat que, tant en embrions wt com en embrions mutants de GA833, l'expressió es troba en el TD. No podem assegurar que no presenti expressió en el TL, ja que la *in situ*, tenint el compte el fons del revelat no ens permet la suficient resolució per aclarir-ho. En tot cas si que podem assegurar que l'expressió del gen CG6280 es localitza específicament en el TD, la qual cosa encaixaria amb el fenotip de falta de fusió o migració que observem en el mutant.

L'únic domini conegut que s'ha pogut trobar en la regió on es troba la mutació GA833 és un complex proteic de membrana interna (IMCp) el qual s'ha descrit en bacteris i eucariotes. Es tracta d'un domini proteic d'aproximadament 120 aminoàcids, que és l'encarregat de la formació de la membrana interna d'alguns organismes paràsits, com ara en els Apicomplexes paràsits, un grup descrit recentment dins dels Alveolats

(*Toxoplasma gondii* n'és un dels membres). Aquests protists contenen uns sacs membranosos sota la membrana plasmàtica anomenat IMC, en aquests organismes en concret. Durant la replicació parasitària, la IMC es forma *de novo* dins la cèl·lula mare en un procés descrit com a brot intern, en el qual es veu implicat un transport vesicular específic des del Golgi fins a la IMC, i on s'ha identificat la presència de la GTPasa petita Rab11b (Agop-Nersesian et al., 2010). En el fenotip traqueal dels mutants embrionaris GA833, s'observen defectes que podrien ser deguts la formació del lumen, que s'ha de produir *de novo* entre les cèl·lules de fusió dels segments adjacents per tal de permetre la continuïtat dels tubs. El domini del IMC podria estar implicat en la formació d'aquest tub nou, de contacte entre les dues cèl·lules de fusió.

L'expressió del gen CG6280, segons el modENCODE, es restringeix als estadis embrionaris de 14 a 18 hores del desenvolupament, és a dir, de l'estadi 13 en endavant, que és quan té lloc la fusió cel·lular entre els segments traqueals adjacents, i per tant, on es requereix la formació d'un nou lumen entre les dues cèl·lules de fusió.

Per tal de verificar aquesta teoria caldria completar la seqüenciació el mutant GA833, i construir un transgen a fi de poder rescatar específicament el fenotip de fusió o migració cel·lular.

2. Mutants embrionari de *ptc*^{D130}

2. 1. Fenotip de *ptc*^{D130}

La característica que més hem descrit del fenotip del mutant embrionari de *ptc*^{D130} en els resultats és el fet que les BG no migrin fins al SNC, fet que ha quedat demostrat ser causa d'una sobreexpressió de Bnl en el domini d'expressió de Ptc.

No obstant això, el mutant de *ptc*^{D130} presenta altres fenotips en el conjunt del sistema traqueal. Un d'aquests és el fet que les BD siguin més curtes i sovint mostrin bifurcacions. S'ha pogut demostrar fent comptatges cel·lulars, que el ST del mutant de *ptc* presenta menys cèl·lules que el d'un embrió wt, cosa que també afecta a les cèl·lules que formen les BD. Pel que fa referència a les bifurcacions, és possible que també siguin el resultat d'una sobreexpressió de Bnl. En un embrió wt, l'extrem més distal de les DB està format per una cèl·lula de fusió i una cèl·lula terminal. En els mutants de *ptc*, s'observa que sovint les bifurcacions estan formades per dues cèl·lules terminals, tot i que es pot detectar alguna cèl·lula de fusió, encara que no en totes les BD. Així doncs, un increment de Bnl en la part dorsal de l'embrió podria ser el causant d'una sobreactivació del factor de transcripció DSRF també en aquestes cèl·lules.

Una altra característica destacable del fenotip del mutant de *ptc*^{D130} és que presenta un TD sinuós, en comparació amb TD d'un embrió wt, i sovint sembla més gruixut. El fenotip d'expansió dels tubs que formen la part apical (luminal) el sistema traqueal, pot ser conseqüència de mutacions en gens implicats en la síntesi de quitina (Lubarsky and Krasnow, 2003; Devine et al., 2005). Dos d'aquests gens *serpentine* (*serp*) i *vermiform* (*verm*), localitzats a la matriu extracel·lular, van ser descrits per afectar la mida i la forma dels tubs del sistema traqueal. Ambdues proteïnes s'expressen i es secreten durant l'expansió del tub traqueal, i es localitzen en el lumen juntament amb la quitina (Luschnig et al., 2006). En el mutant de *ptc*^{D130} no s'ha comprovat la correcta expressió de *serp* i *verm*, així que no es pot descartar una contribució per part d'aquests gens en el fenotip sinuós del TD.

S'han descrit altres casos de factors que es troben *downstream* de la via de senyalització de Hh i mostren fenotips en el sistema traqueal. Un exemple és la via de senyalització de Wg. El gen *wg* a *Drosophila* és el membre més ben descrit de la família de Wnt. *wg*, conjuntament amb els altres membres d'aquesta via de senyalització canònica, estan implicats en l'especificació dels destins cel·lulars durant l'embriogènesi de varis òrgans. Les cèl·lules productores de *wg* estan regulades pel morfogen Hh i el seu efector de la via, Ci. La proteïna transmembrana Ptc actua com a regulador negatiu de l'expressió de *wg*, i els mutants de *ptc* mostren una expressió ectòpica de *wg* (Ingham et al., 1991). Quan es sobreexpressa *wg* dins les cèl·lules de la traquea (efecte autònom utilitzant *bilGAL4*), s'observa un fenotip del TD sinuós, com en els mutants de *ptc*, on el TD és més gruixut que en els embrions wt, i les BVs no es formen o es troben molt reduïdes (Llimargas, 2000). En els mutants embrionaris de *armadillo* (*arm*), diana de la via de senyalització de Wg, el TD no es forma o es troba molt reduït, no es produeixen fusions de les BDs i les BGs presenten problemes de guiatge (Llimargas, 2000). Quan la via de senyalització de Wg es bloqueja utilitzant un dominant negatiu (dTFC^{DN}), les BGs mostren defectes de guiatge tal i com passa en els mutants d'*arm*, tot i mostrar correctament els marcadors terminals (Llimargas, 2000). Així doncs, en el cas dels mutants de *ptc*, un dels factors causants del fenotip del TD, com la sinuositat o l'engruiximent, podria ser deguda a la l'expressió ectòpica de *wg*. Encara que aquest fet és poc probable ja que hem vist que l'activació de la via a les cèl·lules de la tràquea no produeix fenotip traqueal. En tot cas hauria de ser un efecte no-autònom.

Pel que referència a l'engruiximent del TD en els mutants de *ptc*, també es podria relacionar amb el fet que en aquests mutants es produeix una major expressió de Bnl, fet que provoca una manca de migració en les cèl·lules que formen les BGs, afectant també la resta de branques de l'arbre traqueal, i per tant aquest podria ser un factor pel qual més cèl·lules quedessin retingudes en el TD. A fi de comprovar aquest fet, es podria fer un comptatge de cèl·lules específicament en el TD per comprovar si està format per més cèl·lules que l'embrió wt, tenint en compte que ja s'ha fet el comptatge de les cèl·lules que constitueixen el sistema traqueal i, de forma segmental, s'ha pogut concloure que en global els mutants de *ptc* presenten menys cèl·lules.

A la literatura, s'ha analitzat la contribució de la via de senyalització de Hh a la tràquea en dues ocasions. Una d'elles és una publicació del laboratori de Shilo, on demostren que la via de senyalització de Hh modula el patró de les branques traqueals, basant-se sobretot en el fenotip dels mutants de *hh* i en la seva expressió dins les cèl·lules traqueals (Glazer and Shilo, 2001). En el mateix article mostren l'expressió de Ptc utilitzant l'*enhancer trap* PtcLacZ, però només en les cèl·lules de les BDs i s'esmenta que el fenotip observat en els embrions mutants de *ptc* presenta només defectes marginals, tot i que en cap cas es mostren imatges detallades de les BGs. Amb el nostre estudi exhaustiu d'aquesta mateixa via, s'ha pogut demostrar que els mutants de *ptc* sí que presenten un fenotip en el sistema traqueal, el qual és altament penetrant i reproduïble. A més s'ha focalitzat en la migració de les BGs, de les quals s'ha pogut concloure que el fet que no puguin estendre correctament, és degut als alts nivells de Bnl en el domini d'expressió de Ptc, conseqüència de l'activació constitutiva de la via de senyalització de Hh que presenten aquests mutants.

Un altre dels articles que té com a objectiu l'anàlisi de la via de senyalització de Hh en la tràquea, conjuntament amb Dpp, és el realitzat en el laboratori de Hayashi. En aquesta publicació conclouen que els senyals de Hh i Dpp determinen en creixement polaritzat de les extensions cel·lulars, de les cèl·lules terminals en les BDs (Kato et al., 2004). Hh s'expressa en el compartiment posterior i forma un gradient de concentració que disminueix a mesura que s'allunya de la font. Les cèl·lules terminals de les BDs s'adhereixen a l'epidermis i reben el senyal de Hh, el qual les posiciona en la regió de més concentració d'aquest. El senyal de Dpp actua com a barrera contra les extensions de les cèl·lules terminals, assegurant així un creixement monopolar (Kato et al., 2004). Les cèl·lules terminals experimenten canvis importants en el volum i la superfície cel·lular durant el desenvolupament traqueal, el qual es produeix durant l'embriogènesi i continua en els estadis post-embrionaris. El senyal de FGF promou aquests processos (Reichman-Fried and Shilo, 1995; Jarecki et al., 1999) de dues maneres; activant el seu gen diana DSRF, el qual és necessari pel correcte creixement de la cèl·lula terminal i la formació del lumen intracel·lular (Guillemin et al., 1996; Gervais and Casanova, 2011), i estimulant el ràpid moviment dels fil·lopodis (Ribeiro et al., 2002). Es discuteix que aquests dos efectes són independents de Hh i Dpp, ja que el lligand del senyal de FGF, Bnl, s'expressa en petites regions a les cèl·lules epidèrmiques, per la qual cosa postulen com a improbable la seva contribució en la informació vectorial d'aquestes branques,

fet que atribueixen a la restricció en el compartiment posterior de la via de senyalització de Hh, limitada per l'expressió de Dpp (Kato et al., 2004). En el cas de les BGs, i després dels estudis realitzats durant aquesta tesi en els mutants embrionaris de *hh* i *ptc*, s'ha pogut concloure que, com a mínim en aquestes branques, l'expressió de Bnl sí que és determinant pel que fa referència a la migració i guiatge de les BGs, ja que en els mutants de *ptc*, on es troba la via de senyalització de Hh constitutivament activa, no s'observa migració de les BGs, i en el cas dels mutants de *hh*, sí que s'observa migració d'aquestes branques, tot i que presentin un fenotip clar de guiatge i molts fenotips de morfogènesi.

2.2. Mutació de *ptc*^{D130} i UPR

La proteïna Ptc^{D130} es tradueix fins a la posició 395 on hi ha una mutació puntual que correspon al primer *loop* extracel·lular d'aquesta proteïna. Aquesta mutació puntual es tracta d'una transició que provoca un canvi d'aminoàcid de Glutamina (CAG) a un codó STOP (TAG), provocant així un trencament de la proteïna i eliminant tota possible funció. Tanmateix, el fragment de proteïna que es transcriu és detectable amb l'anticòs de Ptc, ja que aquest reconeix precisament la primera regió de la proteïna, abans del primer *loop* extracel·lular.

De tota manera, el fet que el fragment de proteïna que queda abans de la mutació no sigui degudament degradada és motiu d'anàlisi. En *Drosophila*, igual que en vertebrats, existeix un mecanisme anomenat resposta de la proteïna mal plegada o UPR (Unfolded Protein Response), el qual s'encarrega d'eliminar els fragments de proteïna que no s'han plegat correctament. Es tracta d'una via de senyalització intracel·lular que s'activa quan es detecta una acumulació de proteïnes mal plegades en el reticle endoplasmàtic (Bernal et al., 2006). La síntesi proteica requereix un correcte plegament de la proteïna i de la posterior localització d'aquesta al compartiment cel·lular que li correspongui. En les cèl·lules eucariotes, les proteïnes secretades i les que s'han de localitzar a la membrana plasmàtica entren en una via secretora a través de la translocació dins el reticle endoplasmàtic, com a cadenes de polipèptids i és dins del

reticle on tindrà lloc el correcte plegament (Wickner and Schekman, 2005) gràcies a les seves xaperones residents.

Per tal que les proteïnes de membranes es col·loquin a la seva posició correcte, cal que hagin sigut degudament plegades en el reticle endoplasmàtic. Una situació d'estrès en aquest òrgan pot comportar canvis en el programa d'expressió gènica, pot ser deguda a canvis en els senyals extracel·lulars i arriba a ser permanent en casos de mutacions que interfereixen a la pròpia secreció i maduració de proteïnes de membrana.

Així doncs, el fet que la proteïna Ptc^{D130} sigui detectable a la membrana, significa que el tros de proteïna que es transcriu ha pogut ser plegada i transportada en el lloc correcte. Aquest fet podria ser degut a la presència d'un domini transmembrana en la proteïna Ptc^{D130}, encara que també hi ha evidències d'altres proteïnes mutants de *ptc* que també són detectables amb anticossos anti-Ptc, tot i ser més petites que la mutació *ptc*^{D130}, i no presentar cap domini de membrana, com és el cas de la proteïna mutant Ptc¹⁶ (Strutt et al., 2001).

2.3. Altres al·lels de Ptc

Ptc és el receptor de la via de senyalització de Hh i consta de 12 dominis transmembrana. Un conjunt d'aquests dominis és homòleg al domini *sterol-sensing* (SSD) (Vegi's esquema de l'estructura de la proteïna de Ptc en la Figura 36). L'activació de la via de senyalització de Hh dóna lloc a més expressió de *ptc*, ja que *ptc* és una de les dianes de la via, actuant així com un regulador de la seva pròpia via de senyalització. Ptc presenta dues funcions diferenciades pel que fa la via. En primer lloc s'encarrega de l'activació de la via, ja que en presència del receptor, Hh és internalitzat i Smo queda lliure per l'activació de la via. El domini SSD contribueix en l'activació de la via senyalització modulant l'activitat de Smo a través del trànsit vesicular (Martín et al., 2001; Strutt et al., 2001) i l'endocitosi depèn de la formació de vesícules de *dynamín* (Torroja et al., 2004). La segona funció de Ptc és la d'unir i segrestar Hh, i té lloc a través de la regulació del gradient morfogènic de Hh (Tabata and Kornberg, 1994; Chen and Struhl, 1996; Martín et al., 2001; Strutt et al., 2001). Tanmateix, també s'ha demostrat que el mateix Ptc pot induir la seva pròpia degradació independent de Hh, i

d'aquesta manera ajustar el nombre de molècules de Ptc presents a la cèl·lula, cosa que controlarà la sensibilitat cel·lular pel que fa la concentració de Hh extracel·lular (Casali, 2010). Així doncs, Hh promou la seva pròpia *downregulacion* mitjançant la regulació transcripcional de *ptc*, sent aquest un mecanisme de feedback negatiu i un dels factors que restringeix la regió de senyalització de Hh. Un cop unit i internalitzat, el complex Hh-Ptc serà degradat a través dels lisosomes.

L'al·lel de *ptc*¹⁴ va ser descrit primerament com un al·lel nul de *ptc*, basant-se en el seu fenotip embrionari cuticular (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Aquest al·lel no pot internalitzar Hh ni activar la via de senyalització, mentre que el seu complementari de l'al·lel *ptc*^{S2}, és capaç d'internalitzar Hh però no pot activar la via de senyalització. Sembla ser que Ptc¹⁴ només és capaç d'activar la via de senyalització de Hh quan Hh hi és present, d'una manera similar al Ptc wt, tot i que la unió de l'al·lel *ptc*¹⁴ a Hh sembla ser poc eficient (Torroja et al., 2004).

Existeix una epístasi de la funció de *ptc* sobre la funció de *hh*, ja que el doble mutant de *ptc;hh* format per al·lells nuls d'aquests gens, mostra el fenotip de *ptc* (vegi's l'exemple en el doble mutant *ptc*^{D130};*hh*²¹ en la Figura). Tanmateix, el doble mutant *ptc*¹⁴;*hh*^{ts} a la temperatura restrictiva s'assembla més al fenotip dels embrions mutants de *hh* (Torroja et al., 2004), fet que podria ser degut a que la proteïna Ptc¹⁴ si que és capaç de reprimir Smo.

Així doncs, els resultats que s'han obtingut en aquest estudi (vegi's la figura on es veu l'expressió de la proteïna de *ptc* en els diferents mutants al·lèlics del mateix) es mostra que *ptc*¹⁴ no internalitza, ja que es detecta l'expressió de la proteïna a la membrana, i tampoc pot unir eficientment Hh, amb la qual cosa hi ha més del lligand en el medi fet que podria implicar que, ectòpicament, hi hagués més cèl·lules que poguessin detectar Hh i per tant la via es trobaria més activada, permetria la regulació de Smo i l'activació de la via en aquest cas en concret. També podria ser que s'estigués detectant més expressió de Ptc en els mutants *ptc*¹⁴ pel fet que aquest mutant queda estabilitzat a la membrana.

Per tal de verificar aquestes hipòtesis s'hauria de mirar quin fenotip traqueal presenta el doble mutant $ptc^{14};hh$, esperant que sigui més similar a hh que a ptc tal i com passa amb el fenotip cuticular i comprovar els nivells d'expressió de Bnl en mutants embrionaris de ptc^{14} , ja que uns nivells més elevats d'aquests indicarien una activació de la via de senyalització de Hh i justificarien el fenotip.

	Ptc ^{11W}	Ptc ^{S2}	Ptc ¹⁴	Ptc ^{D130}
Unió a Hh	X	√	√ (poc eficient)	X
Internalització	X	√	X	X
Repressió de Smo	X	X	√	X

Un altre qüestió a discutir és el fet que el transheterozigot de ptc^{14}/ptc^{S2} mostri un rescat parcial de la migració de les BG, on algunes sí que són capaces de creuar la barrera del SNC, fet que no passa en qualsevol de les altres combinacions transheterozigòtiques dels al·lels de ptc . En les glàndules salivars s'ha descrit que la coexpressió de ptc^{S2} i ptc^{14} recupera la distribució subcel·lular normal de la proteïna Ptc¹⁴ (Torroja et al., 2004), fet que indica que la proteïna Ptc té dues funcions clarament separables, una involucrada en la senyalització a través de la interacció amb Smo, i l'altra implicada en el segrest de Hh). L'existència d'una recuperació parcial del fenotip traqueal rau en el fet que ambdues proteïnes formen un complex que restableix la funció de la proteïna Ptc wt, ja que si Ptc^{S2} i Ptc¹⁴ s'expressen conjuntament, Ptc¹⁴ es detecta dins de vesícules, mentre que si s'expressa sol es detecta a la membrana (Torroja et al., 2004). Aquest fet també demostra que tant el segrest de Hh com la senyalització de la via tenen lloc en diferents compartiments cel·lulars (Torroja et al., 2004).

Així doncs, en el transheterozigot de ptc^{14}/ptc^{S2} s'obté un rescat parcial de la migració de les BG, perquè en certa manera es restableix la via de senyalització de Hh; les molècules de Ptc^{S2} permeten el segrest del lligand, mentre que les de Ptc¹⁴ són capaces de reprimir Smo i per tant d'inactivar la via, la qual no es troba sobreactivada, i per tant els nivells de Bnl a les cèl·lules que envolten la tràquea es troben reduïts, fet que permet la migració d'algunes de les BG.

2.4. Diferència entre Ptc>Hh-Ptc i Ptc>Ci^{Act}

Tant en la sobreexpressió de la construcció Hh-Ptc (la que activa la via de Hh constitutivament) com la de de Ci^{Act} utilitzant PtcGAL4 com a *driver* es van poder observar defectes en la migració de les BG de l'embrió, cosa que no passa si es sobreexpressa la construcció Ptc^{Δloop2} (la que reprimeix la via) o la forma dominant negativa de Ci. Això indica que cal tenir la via de senyalització de Hh activa, com a mínim en el domini d'expressió de Ptc per tal de prevenir la migració.

Tanmateix, en els dos casos on s'observa fenotip, ja sigui sobreexpressant Hh-Ptc o Ci^{Act}, la resposta no és la mateixa, ja que quan es sobreexpressa Hh-Ptc el fenotip de manca de migració s'assembla molt més als embrions mutants de *ptc*, on cap de les BGs és capaç d'entrar en el SNC, que no quan es sobreexpressa Ci^{Act}, situació en la que sí que s'observen algunes BGs arribant al SNC. Aquest fet podria ser degut a varis factors. Primerament, podria ser que la construcció de Ci^{Act} no tingui una funció tant forta com el Ci endògen i al no activar tant fortament la via, hi haguessin algunes BGs capaces de migrar. També cal tenir en compte el fet que Hh es pot unir a altres receptors de la membrana a part de Ptc, i això podria estar afectant d'alguna manera indirecta el fenotip de migració de les BGs en el cas de la sobreexpressió del Ci^{Act}. La construcció Hh-Ptc és una molècula de Ptc que porta unit el lligand Hh al seu extrem C-terminal, la qual cosa significa que el Hh endogen no seria internalitzat per Ptc, i es podria acumular en el medi. Així doncs, a part d'estar activant la via de senyalització de Hh constitutivament *downstream* de Ci, podria estar passant el mateix fenomen que en el cas del mutant *ptc*¹⁴, el qual no internalitza el lligand, el qual s'acumula en el medi, i aquest fet també implicaria una sobreactivació de la via de senyalització de Hh. Per altra banda, cal recordar que les dues sobreexpressions s'estan duent a terme en un fons wt, en el qual hi ha l'expressió de les proteïnes endògenes que podrien estar emmascarant el fenotip real de les sobreexpressions. A fi de comprovar l'efecte precís de l'expressió de les formes Hh-Ptc i Ci^{Act}, en el domini d'expressió de Ptc, caldria fer-les en un fons mutant de *hh* i/o *ptc*.

2.5. Expressió de DSRF

Gràcies al comptatge de cèl·lules del sistema traqueal utilitzant el software de l'IMARIS (el qual permet fer reconstruccions en 3D, enumerar i comptabilitzar els elements d'interès), s'ha pogut concloure que els mutants de *ptc* tenen menys cèl·lules formant el sistema traqueal que els embrions wt. Una altra observació interessant sobre el mutant de *ptc* és que presenta una expressió més primerenca del factor de transcripció DSRF, el qual determina el destí terminal de les cèl·lules.

Aquestes dues característiques, analitzades conjuntament poden crear confusió. La manca d'extensió de les BG en els mutants embrionaris de *ptc* fa que les cèl·lules quedin retingudes en la part lateral de l'embrió, i es confonguin amb les branques del tronc lateral i les branques visceral. Observant l'expressió del Complex-2-LacZ es pot determinar i diferenciar la identitat de les BGs. La qüestió és que bona part de les cèl·lules que formen les BV i algunes de les que formen el TL anterior són també cèl·lules terminals i per tant expressen el DSRF. En els mutants de *ptc*, doncs, pot semblar que hi hagi més cèl·lules positives per DSRF, i de fet en alguns casos s'ha observat alguna BG formada per més d'una cèl·lula que expressava DSRF, fet que no passa en les BGs dels embrions wt, però és molt difícil determinar si en els embrions mutants de *ptc* hi ha més cèl·lules DSRF positives.

S'ha descrit que el DSRF es troba *downstream* de la via de senyalització de Hh en el disc imaginal d'ala de la mosca adulta. El DSRF és necessari per a la determinació de les cèl·lules terminals del sistema traqueal i pel desenvolupament del teixit d'entre les venes del disc imaginal d'ala (Affolter et al., 1994; Guillemin et al., 1996; Montagne et al., 1996).

2.6. Expressió de Bnl

Nivells més elevats de Bnl en un embrió wt de *Drosophila* prevenen la migració cel·lular (Sutherland et al., 1996). De la mateixa manera, si es sobreexpressa Hh, i per tant s'activa constitutivament la seva via de senyalització, implica també una sobreexpressió de Bnl, amb la conseqüent falta d'extensió de les BGs.

En el SNC de *Drosophila* s'ha descrit un cas on Bnl i Hh actuen conjuntament. Per a l'inici de la proliferació dels neuroblasts és necessària l'expressió de Bnl i Hh (Barrett et al., 2008). El SNC de *Drosophila* es produeix en dues rondes de neurogènesi: una durant l'embriogènesi per formar el cervell de la larva, i l'altra durant els estadis larvaris per formar el SNC de la mosca adulta. La neurogènesi causada per l'activació de la divisió cèl·lules mare neurals en el cervell de la larva, és essencial per al correcte funcionament del SNC de l'adult, així com la formació del patró. Les vies de senyalització de FGF (Bnl) i Hh formen un *feedback loop* positiu per regular el conjunt de divisions dels neuroblasts, el qual s'inicia durant l'embriogènesi. Així doncs, el nivells de Bnl i Hh són crítics per tal d'activar completament la divisió cel·lular de les cèl·lules mare (Barrett et al., 2008).

En vertebrats, existeixen altres sistemes que mostren una dependència linear de l'expressió de FGF amb la via de senyalització de Shh i a la inversa. Durant la morfogènesi del brot del pulmó en ratolí, la via de senyalització de Shh inhibeix l'expressió de FGF10, però augmenta la de FGF7 (Pepicelli et al., 1998; Lebeche et al., 1999; Chuang et al., 2003). En l'ull de *Xenopus*, l'expressió de Hh incrementa l'expressió de FGF8 (Lupo et al., 2005). En el cervell (*forebrain*) de peix zebra, la inhibició del senyal de Hh redueix l'expressió de FGF3, FGF8 i FGF19, tot i que l'expressió de Hh requereix el senyal de FGF (Miyake et al., 2005). Hh també regula l'expressió de FGF en altres parts del cervell (*mid/hindbrain*) (Blaess et al., 2006). La inhibició de l'expressió de FGF3 i FGF8 produeix una disminució de la de Shh (Walshe and Mason, 2003). Alternativament, les vies de Hh i FGF es poden integrar a nivell de components intracel·lulars, ja que s'ha demostrat que FGF pot induir el senyal de Gli2, el factor de transcripció i efector del senyal de Hh, en el desenvolupament de la regió ventral-posterior en el peix zebra (Brewster et al., 2000).

D'altra banda, un exemple clàssic de d'interacció entre els senyals de FGF i Hh es troba en el desenvolupament del brot de de les extremitats en el pollet (Martin, 1998). En aquest sistema, diferents senyals de FGF organitzen el centre de senyal a l'extrem de l'extremitat en desenvolupament, que canvia l'expressió de Shh a la part posterior del brot del mesènquima. Per la seva banda, el senyal de Hh és necessari pel manteniment de l'expressió de FGF4, FGF9 i FGF17 en l'extrem del brot. Aquesta funció es produeix durant l'expressió de Gremlin, un inhibidor del senyal de BMP, la qual prevé la regulació dels FGF (Zuniga et al., 1999), amb la qual cosa, el *feedback loop* positiu, que existeix en aquest cas entre Shh i FGF, és mediat per Gremlin.

No obstant això, en el sistema traqueal embrionari de *Drosophila*, es desconeix si la regulació de Bnl per part de Hh podria tenir lloc de forma directa o indirecta. Pensem que és més probable que tingui un efecte indirecta, la qual cosa implicaria l'existència d'un factor intermedi entre Hh i Bnl.

3. El morfogen Hedgehog actua com a quimioatracent en els axons de la línia mitja de *Drosophila melanogaster*

En els resultats s'ha revelat una nova contribució de Hh en el guiatge axonal de *Drosophila melanogaster*, i s'ha identificat Ptc com el receptor axonal d'aquest morfogen. Tanmateix, es requereixen futurs estudis per tal d'establir, a través de quins mecanismes, la unió de Hh a Ptc es tradueix en moviment cel·lular així com per determinar si aquest guiatge es troba conservat en altres tipus neuronals, tant a *Drosophila melanogaster* com en altres organismes.

3. 1. Fenotips del SNC dels mutants de *hh* i *ptc*

Els embrions mutants de *hh*, tot i presentar defectes més severos que no pas els de *ptc*, mostren menys disruptcions axonals al SNC. Comissures i connectors es troben desorganitzats i fins i tot fusionats en varis segments, i les fibres longitudinals són més primes. A més, falten algunes de les comissures i en els feixos axonals positius per Fas II rarament creuen la línia mitjana. Hh s'ha descrit per actuar com a regulador de l'expressió de molts gens a la línia mitjana. Concretament, Hh reprimeix la glia mitja anterior (GMA) i activa l'expressió gènica de la glia mitja posterior (GMP), i defineix el destí neuronal a la part posterior de cada segment (Jacobs, 2000; Watson et al., 2011). En els mutants de *hh*, moltes cèl·lules de la línia mitjana moren, i les que sobreviuen no estan diferenciades (Bossing and Brand, 2006). Tanmateix, de la mateixa manera que en mutants de *ptc*, alguns defectes que presenten els mutants de *hh* al SNC es poden atribuir també a alteracions de quimioatracents i/o quimiorepel·lents i no només a canvis de destí cel·lular. No obstant això, cal tenir en compte els efectes que pot tenir la via de senyalització de Hh en el conjunt de l'embriogènesi.

A més, els fenotips embrionaris tardans van en concordança amb resultats previs que mostren que quan es produeix un rescat dels mutants de *ptc* pels seus defectes primerencs en la neurogènesi, continuen mostrant fenotips de guiatge axonal (Merianda et al., 2005). Aquesta observació implica que hi ha influència de Hh i Ptc no només durant la neurogènesi, sinó també durant els estadis de guiatge. Així doncs, aquests

resultats suggereixen que el morfogen Hh i el seu receptor Ptc podrien estar implicats en el guiatge axonal de *D. melanogaster*.

3. 2. Hh com a quimioattractant de la línia mitjana

La línia mitjana de *Drosophila melanogaster* proporciona un bon sistema model per dur a terme estudis de creixement i guiatge axonal. Els fenotips obtinguts posen de manifest que, tal i com passa en la placa del terra dels vertebrats, les cèl·lules de la línia mitjana que secreten Hh poden reorientar el seu creixement i atraure el creixement dels axons positius per Fas II. No obstant això, és probable que hi hagin altres molècules implicades en aquesta atracció, sobretot pel que fa a la regió de la línia mitjana. Els candidats més probables per dur a terme aquesta funció són les Netrins, tot i que com en els vertebrats, a la *Drosophila* la majoria dels axons són capaços d'orientar correctament i créixer a través de la línia mitjana en absència de Netrins (Brankatschk and Dickson, 2006), podria ser que aquestes actuessin sinèrgicament amb Hh per tal d'atraure els axons comissurals de la línia mitjana.

Quan es sobreexpressa *hh* a la línia mitjana, s'observa un increment de creuaments de les fibres intermèdies dels axons Fas II-m. En les mateixes condicions, els axons positius per la SemaIIb es van detectar més propers a la línia mitjana a pesar de no presentar creuaments ectòpics. A més, quan *hh* es va expressar en cèl·lules de la perifèria del CNV (apGAL4), els axons mantenen una certa atracció cap a la seva font, tot i que menor que en el cas de la sobreexpressió a la línia mitjana. Aquest fet suggereix que Hh contribueix en el creuament dels axons positius per Fas II-m específicament a la línia mitjana, però que actua com a atractant per axons en d'altres fascicles. Aquesta especificitat és probablement deguda a la proximitat al gradient de Hh, i a la presència addicional d'altres senyals atractants i repulsius. Tanmateix, no es pot descartar la possibilitat que els axons que responen al senyal de Hh, interactuïn amb altres molècules de guiatge com ara Robo-Slit, disminuint la capacitat de les fibres Fas II-m per respondre al senyal de repulsió de Slit.

CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

Les conclusions que es poden extreure dels resultats són:

1. La mutació GA833 mostra defectes de migració i fusió en el sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*.
2. Els mutants embrionaris de *ptc* mostren un fenotip de falta de migració de les BGs en el sistema traqueal i de guiatge axonal en el sistema nerviós.
3. La proteïna *ptc*^{D130} presenta una mutació puntual en el primer *loop* extracel·lular de la proteïna.
4. Ptc s'expressa al voltant de les cèl·lules de la tràquea.
5. Els mutants de *ptc*^{D130} tenen menys cèl·lules en el sistema traqueal.
6. Els mutants de *ptc*^{D130} presenten una expressió de DSRF abans en el desenvolupament que els embrions wt.
7. La sobreexpressió de Hh a la línia mitjana de l'embrió produeix un fenotip de falta de migració en les BGs, com en els embrions mutants de *ptc*.
8. La via de senyalització de Hh presenta un efecte no-autònom pel que fa al sistema traqueal.
9. Alts nivells de Bnl en les cèl·lules que envolten la tràquea, en el domini de Ptc, produeixen un fenotip de falta de migració en les BGs, d'una manera semblant al mutant de *ptc*.
10. Els embrions mutants de *ptc*^{D130} presenten nivells més alts de Bnl que els embrions wt.
11. Un augment dels nivells de Bnl en un fons heterozigot de *ptc* rescata parcialment el fenotip de migració de les BGs.
12. Els mutants de Hh mostren un fenotip de guiatge axonal a la línia mitjana.
13. El morfogen Hh actua com a atraient dels axons de la línia mitjana.
14. Ptc és el receptor pel senyal de Hh provinent de la línia mitjana.

BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- Affolter, M., Bellusci, S., Itoh, N., Shilo, B. and Thiery, J. (2003) 'Tube or Not Tube Remodeling Epithelial Tissues by Branching Morphogenesis', *Dev Cell*.
- Affolter, M. and Caussinus, E. (2008) 'Tracheal branching morphogenesis in *Drosophila*: new insights into cell behaviour and organ architecture', *Development* 135(12): 2055-2064.
- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M. and Gehring, W. J. (1994) 'The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development', *Development* 120(4): 743-53.
- Agop-Nersesian, C., Egarter, S., Langsley, G., Foth, B. J., Ferguson, D. J. and Meissner, M. (2010) 'Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B', *PLoS Pathog* 6(7): e1001029.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. and Hooper, J. E. (1996) 'The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal', *Cell* 86(2): 221-32.
- Araujo, S., Aslam, H., Tear, G. and Casanova, J. (2005) 'mummy/cystic encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development—Analysis of its role in tracheal morphogenesis', *Dev Biol* 288(1): 179-193.
- Araújo, S. J. and Casanova, J. (2011) 'Sequoia establishes tip-cell number in *Drosophila* trachea by regulating FGF levels', *J Cell Sci*.
- Araujo, S. J., Cela, C. and Llimargas, M. (2007) 'Tramtrack regulates different morphogenetic events during *Drosophila* tracheal development', *Development* 134(20): 3665-3676.
- Araújo, S. J. and Tear, G. (2003) 'Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates', *Nat Rev Neurosci* 4(11): 910-922.
- Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008) 'Polarity complex proteins', *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 614-30.
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V. and Donoghue, D. J. (2001) 'Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression', *EMBO J* 20(9): 2214-23.

- Barrett, A., Krueger, S. and Datta, S. (2008) 'Branchless and Hedgehog operate in a positive feedback loop to regulate the initiation of neuroblast division in the *Drosophila* larval brain', *Dev Biol* 317(1): 234-245.
- Bastiani, M. J., Harrelson, A. L., Snow, P. M. and Goodman, C. S. (1987) 'Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper', *Cell* 48(5): 745-55.
- Behr, M., Wingen, C., Wolf, C., Schuh, R. and Hoch, M. (2007) 'Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control', *Nat Cell Biol* 9(7): 847-53.
- Beitel, G. J. and Krasnow, M. A. (2000) 'Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system', *Development* 127(15): 3271-82.
- Bejsovec, A. and Wieschaus, E. (1993) 'Segment polarity gene interactions modulate epidermal patterning in *Drosophila* embryos', *Development* 119(2): 501-17.
- Bernales, S., Papa, F. R. and Walter, P. (2006) 'Intracellular signaling by the unfolded protein response', *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487-508.
- Bhat, K. M. and Schedl, P. (1997) 'Requirement for engrailed and invected genes reveals novel regulatory interactions between engrailed/invected, patched, gooseberry and wingless during *Drosophila* neurogenesis', *Development* 124(9): 1675-88.
- Bijlsma, M. F., Borensztajn, K. S., Roelink, H., Peppelenbosch, M. P. and Spek, C. A. (2007) 'Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites', *Cell Signal* 19(12): 2596-604.
- Blaess, S., Corrales, J. D. and Joyner, A. L. (2006) 'Sonic hedgehog regulates Gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region', *Development* 133(9): 1799-809.
- Bossing, T. and Brand, A. H. (2006) 'Determination of cell fate along the anteroposterior axis of the *Drosophila* ventral midline', *Development* 133(6): 1001-12.
- Bradley, P. L. and Andrew, D. J. (2001) 'ribbon encodes a novel BTB/POZ protein required for directed cell migration in *Drosophila melanogaster*', *Development* 128(15): 3001-15.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(2): 401-15.
- Brankatschk, M. and Dickson, B. J. (2006) 'Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range', *Nat Neurosci* 9(2): 188-94.
- Bredesen, D. E., Mehlen, P. and Rabizadeh, S. (2005) 'Receptors that mediate cellular dependence', *Cell Death Differ* 12(8): 1031-43.

- Brewster, R., Mullor, J. L. and Ruiz i Altaba, A. (2000) 'Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning', *Development* 127(20): 4395-405.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. and Struhl, G. (2001) 'A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube', *Mol Cell* 7(6): 1279-91.
- Brodu, V. and Casanova, J. (2006) 'The RhoGAP crossveinless-c links tracheless and EGFR signaling to cell shape remodeling in Drosophila tracheal invagination', *Genes Dev* 20(13): 1817-28.
- Burglin, T. R. (2008) 'The Hedgehog protein family', *Genome Biol* 9(11): 241.
- Campos-Ortega, A. J. and Hartenstein, V. (1985) 'The Embryonic Development of Drosophila Melanogaster', *Springer-Verlag* New York: 10-84.
- Casali, A. (2010) 'Self-induced patched receptor down-regulation modulates cell sensitivity to the hedgehog morphogen gradient', *Sci Signal* 3(136): ra63.
- Casali, A. and Struhl, G. (2004) 'Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein', *Nature* 431(7004): 76-80.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P. and Tessier-Lavigne, M. (2003) 'The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance', *Cell* 113(1): 11-23.
- Chen, C. K., Kuhnlein, R. P., Eulenberg, K. G., Vincent, S., Affolter, M. and Schuh, R. (1998) 'The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during Drosophila tracheal development', *Development* 125(24): 4959-68.
- Chen, Y. and Struhl, G. (1996) 'Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog', *Cell* 87(3): 553-63.
- Chiang, C., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1995) 'Control of Drosophila tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex', *Development* 121(11): 3901-12.
- Chihara, T. and Hayashi, S. (2000) 'Control of tracheal tubulogenesis by Wingless signaling', *Development* 127(20): 4433-42.
- Chisholm, A. and Tessier-Lavigne, M. (1999) 'Conservation and divergence of axon guidance mechanisms', *Curr Opin Neurobiol* 9(5): 603-15.
- Chuang, P. T., Kawcak, T. and McMahon, A. P. (2003) 'Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung', *Genes Dev* 17(3): 342-7.

- Cohen, M. M., Jr. (2003) 'The hedgehog signaling network', *Am J Med Genet A* 123A(1): 5-28.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004) 'Cell death: critical control points', *Cell* 116(2): 205-19.
- Devine, W. P., Lubarsky, B., Shaw, K., Luschnig, S., Messina, L. and Krasnow, M. A. (2005) 'Requirement for chitin biosynthesis in epithelial tube morphogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 17014-9.
- Dickson, B. J. (2002) 'Molecular mechanisms of axon guidance', *Science* 298(5600): 1959-64.
- Dorfman, R., Shilo, B.-Z. and Volk, T. (2002) 'Stripe provides cues synergizing with branchless to direct tracheal cell migration', *Dev Biol* 252(1): 119-26.
- Englund, C., Steneberg, P., Falileeva, L., Xylourgidis, N. and Samakovlis, C. (2002) 'Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the Drosophila trachea', *Development* 129(21): 4941-51.
- Englund, C., Uv, A. E., Cantera, R., Mathies, L. D., Krasnow, M. A. and Samakovlis, C. (1999) 'adrift, a novel bnl-induced Drosophila gene, required for tracheal pathfinding into the CNS', *Development* 126(7): 1505-14.
- Evans, T. A. and Bashaw, G. J. (2010) 'Axon guidance at the midline: of mice and flies', *Curr Opin Neurobiol* 20(1): 79-85.
- Forster, D., Armbruster, K. and Luschnig, S. (2010) 'Sec24-dependent secretion drives cell-autonomous expansion of tracheal tubes in Drosophila', *Curr Biol* 20(1): 62-8.
- Franch-Marro, X. and Casanova, J. (2000) 'The alternative migratory pathways of the Drosophila tracheal cells are associated with distinct subsets of mesodermal cells', *Dev Biol* 227(1): 80-90.
- Gervais, L. and Casanova, J. (2010) 'In vivo coupling of cell elongation and lumen formation in a single cell', *Curr Biol* 20(4): 359-66.
- Gervais, L. and Casanova, J. (2011) 'The Drosophila homologue of SRF acts as a boosting mechanism to sustain FGF-induced terminal branching in the tracheal system', *Development* 138(7): 1269-74.
- Gervais, L., Lebreton, G. and Casanova, J. (2012) 'The making of a fusion branch in the Drosophila trachea', *Dev Biol* 362(2): 187-93.
- Ghabrial, A. S. and Krasnow, M. A. (2006) 'Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis', *Nature* 441(7094): 746-749.

- Gibson, M. C. and Perrimon, N. (2003) 'Apicobasal polarization: epithelial form and function', *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 747-52.
- Gilbert, S. F. (2000) *Developmental Biology*: NCBI Bookshelf.
- Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1991) 'The Drosophila FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension', *Genes Dev* 5(4): 697-705.
- Glazer, L. and Shilo, B. Z. (2001) 'Hedgehog signaling patterns the tracheal branches', *Development* 128(9): 1599-606.
- Goodman, C. S. and Doe, C. Q. (1993). in C. S. H. L. Press (ed.) *The Development of Drosophila melanogaster*
- Granderath, S. and Klambt, C. (1999) 'Glia development in the embryonic CNS of Drosophila', *Curr Opin Neurobiol* 9(5): 531-6.
- Guillemin, K., Groppe, J., Ducker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, M. and Krasnow, M. A. (1996) 'The pruned gene encodes the Drosophila serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system', *Development* 122(5): 1353-62.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. and Krasnow, M. A. (1998) 'sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways', *Cell* 92(2): 253-63.
- Harris, R., Sabatelli, L. M. and Seeger, M. A. (1996) 'Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs', *Neuron* 17(2): 217-28.
- Hartenstein, V. (1993) *Atlas of Drosophila Development*
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994) 'Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila', *Development* 120(8): 2121-9.
- Hemphala, J. (2003) 'Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signalling', *Development* 130(2): 249-258.
- Hepker, J., Wang, Q. T., Motzny, C. K., Holmgren, R. and Orenic, T. V. (1997) 'Drosophila cubitus interruptus forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes', *Development* 124(2): 549-58.
- Herzig, M. C., Thor, S., Thomas, J. B., Reichert, H. and Hirth, F. (2001) 'Expression and function of the LIM homeodomain protein Apterous during embryonic brain development of Drosophila', *Dev Genes Evol* 211(11): 545-54.

- Hidalgo, A. and Booth, G. E. (2000) 'Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS', *Development* 127(2): 393-402.
- Hidalgo, A. and Brand, A. H. (1997) 'Targeted neuronal ablation: the role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of *Drosophila*', *Development* 124(17): 3253-62.
- Hidalgo, A., Urban, J. and Brand, A. H. (1995) 'Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS', *Development* 121(11): 3703-12.
- Hooper, J. E. and Scott, M. P. (1989) 'The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning', *Cell* 59(4): 751-65.
- Ikeya, T. and Hayashi, S. (1999) 'Interplay of Notch and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the *Drosophila* trachea', *Development* 126(20): 4455-63.
- Imam, F., Sutherland, D., Huang, W. and Krasnow, M. (1999) 'stumps, a *Drosophila* gene required for Fibroblast Growth Factor (FGF)-directed Migrations of Tracheal and Mesodermal Cells', *Genetics*.
- Ingham, P. W., Taylor, A. M. and Nakano, Y. (1991) 'Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling', *Nature* 353(6340): 184-7.
- Jacobs, J. R. (2000) 'The midline glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of glia', *Prog Neurobiol* 62(5): 475-508.
- Jarecki, J., Johnson, E. and Krasnow, M. A. (1999) 'Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF', *Cell* 99(2): 211-20.
- Jenkins, D. (2009) 'Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways', *Cell Signal* 21(7): 1023-34.
- Kato, K., Chihara, T. and Hayashi, S. (2004) 'Hedgehog and Decapentaplegic instruct polarized growth of cell extensions in the *Drosophila* trachea', *Development* 131(21): 5253-61.
- Kidd, T., Bland, K. S. and Goodman, C. S. (1999) 'Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*', *Cell* 96(6): 785-94.
- Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. and Tear, G. (1998) 'Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline', *Neuron* 20(1): 25-33.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. and Klambt, C. (1994) 'The *Ets* transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS', *Cell* 78(1): 149-60.

- Klämbt, C., Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1992) 'breathless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells', *Genes Dev* 6(9): 1668-78.
- Klämbt, C., Jacobs, J. R. and Goodman, C. S. (1991) 'The midline of the Drosophila central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance', *Cell* 64(4): 801-15.
- Kolahgar, G., Bardet, P. L., Langton, P. F., Alexandre, C. and Vincent, J. P. (2011) 'Apical deficiency triggers JNK-dependent apoptosis in the embryonic epidermis of Drosophila', *Development* 138(14): 3021.
- Kolodkin, A. L. and Tessier-Lavigne, M. (2011) 'Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(6).
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996) 'frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance', *Cell* 87(2): 197-204.
- Kühnlein, R. P. and Schuh, R. (1996) 'Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during Drosophila tracheal system development', *Development* 122(7): 2215-23.
- Kuranaga, E. (2011) 'Caspase signaling in animal development', *Dev Growth Differ* 53(2): 137-148.
- L. Quijada, A. C., C. Torroja, and I. Guerrero (2006) Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease: Molecular Biology Intelligence Unit.
- Laprise, P., Paul, S. M., Boulanger, J., Robbins, R. M., Beitel, G. J. and Tepass, U. (2010) 'Epithelial polarity proteins regulate Drosophila tracheal tube size in parallel to the luminal matrix pathway', *Curr Biol* 20(1): 55-61.
- Lebeche, D., Malpel, S. and Cardoso, W. V. (1999) 'Fibroblast growth factor interactions in the developing lung', *Mech Dev* 86(1-2): 125-36.
- Lee, S. and Kolodziej, P. A. (2002) 'The plakin Short Stop and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion', *Development* 129(6): 1509-20.
- Lekven, A. C., Tepass, U., Keshmeshian, M. and Hartenstein, V. (1998) 'faint sausage encodes a novel extracellular protein of the immunoglobulin superfamily required for cell migration and the establishment of normal axonal pathways in the Drosophila nervous system', *Development* 125(14): 2747-58.

- Letizia, A., Sotillos, S., Campuzano, S. and Llimargas, M. (2011) 'Regulated Crb accumulation controls apical constriction and invagination in *Drosophila* tracheal cells', *J Cell Sci* 124(Pt 2): 240-51.
- Lewis, E. B. F. B. (1968) *Methods of feeding ethyl methane sulphonate (EMS) to Drosophila males* *Drosophila Information Service* 43 (2): 193.
- Llimargas, M. (1999) 'The Notch pathway helps to pattern the tips of the *Drosophila* tracheal branches by selecting cell fates', *Development* 126(11): 2355-64.
- Llimargas, M. (2000) 'Wingless and its signalling pathway have common and separable functions during tracheal development', *Development* 127(20): 4407-17.
- Llimargas, M. and Casanova, J. (1999) 'EGF signalling regulates cell invagination as well as cell migration during formation of tracheal system in *Drosophila*', *Dev Genes Evol* 209(3): 174-9.
- Locke, M. (2001) 'The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology', *J Insect Physiol* 47(4-5): 495-507.
- Lohs-Schardin, M., Cremer, C. and Nusslein-Volhard, C. (1979) 'A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam', *Dev Biol* 73(2): 239-55.
- Lubarsky, B. and Krasnow, M. A. (2003) 'Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes', *Cell* 112(1): 19-28.
- Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S. and Thomas, J. B. (1995) 'Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*', *Development* 121(6): 1769-73.
- Lupo, G., Liu, Y., Qiu, R., Chandraratna, R. A., Barsacchi, G., He, R. Q. and Harris, W. A. (2005) 'Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling', *Development* 132(7): 1737-48.
- Luschnig, S., Bätz, T., Armbruster, K. and Krasnow, M. A. (2006) 'serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*', *Curr Biol* 16(2): 186-94.
- Manning, G. and Krasnow, M. A. (1993) Development of the *Drosophila* tracheal system. in M. Bate and A. Martínez-Arias (eds.) *The development of Drosophila melanogaster*, vol. I. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martin, G. R. (1998) 'The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs', *Genes Dev* 12(11): 1571-86.

- Martín, V., Carrillo, G., Torroja, C. and Guerrero, I. (2001) 'The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking', *Curr Biol* 11(8): 601-7.
- Merabet, S., Ebner, A. and Affolter, M. (2005) 'The Drosophila Extradenticle and Homothorax selector proteins control branchless/FGF expression in mesodermal bridge-cells', *EMBO Rep* 6(8): 762-8.
- Merienda, T. T., Botta, V. and Bhat, K. M. (2005) 'Patched regulation of axon guidance is by specifying neural identity in the Drosophila nerve cord', *Dev Genes Evol* 215(6): 285-96.
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. and Dickson, B. J. (1996) 'Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons', *Neuron* 17(2): 203-15.
- Miyake, A., Nakayama, Y., Konishi, M. and Itoh, N. (2005) 'Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development', *Dev Biol* 288(1): 259-75.
- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J. and Affolter, M. (1996) 'The Drosophila Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered', *Development* 122(9): 2589-97.
- Moussian, B., Tång, E., Tonning, A., Helms, S., Schwarz, H., Nüsslein-Volhard, C. and Uv, A. E. (2006) 'Drosophila Knickkopf and Retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle differentiation through their specific requirement for chitin filament organization', *Development* 133(1): 163-71.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S. and Crews, S. T. (1990) 'The single-minded gene of Drosophila is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells', *Cell* 63(1): 63-75.
- Nishimura, M., Inoue, Y. and Hayashi, S. (2007) 'A wave of EGFR signaling determines cell alignment and intercalation in the Drosophila tracheal placode', *Development* 134(23): 4273-82.
- Noordermeer, J. N., Kopczynski, C. C., Fetter, R. D., Bland, K. S., Chen, W. Y. and Goodman, C. S. (1998) 'Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in Drosophila', *Neuron* 21(5): 991-1001.

- Nussbaumer, U., Halder, G., Groppe, J., Affolter, M. and Montagne, J. (2000) 'Expression of the blistered/DSRF gene is controlled by different morphogens during *Drosophila* trachea and wing development', *Mech Dev* 96(1): 27-36.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', *Nature* 287(5785): 795-801.
- Parsons, L., Harris, K. L., Turner, K. and Whitington, P. M. (2003) 'Roundabout gene family functions during sensory axon guidance in the *drosophila* embryo are mediated by both Slit-dependent and Slit-independent mechanisms', *Dev Biol* 264(2): 363-75.
- Patel, N. H., Schafer, B., Goodman, C. S. and Holmgren, R. (1989) 'The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis', *Genes Dev* 3(6): 890-904.
- Pearse, R. V., 2nd, Vogan, K. J. and Tabin, C. J. (2001) 'Ptc1 and Ptc2 transcripts provide distinct readouts of Hedgehog signaling activity during chick embryogenesis', *Dev Biol* 239(1): 15-29.
- Pepicelli, C. V., Lewis, P. M. and McMahon, A. P. (1998) 'Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung', *Curr Biol* 8(19): 1083-6.
- Petit, V., Nussbaumer, U., Dossenbach, C. and Affolter, M. (2004) 'Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits Corkscrew upon receptor activation', *Mol Cell Biol* 24(9): 3769-81.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. and Dickson, B. J. (2000) 'Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS', *Cell* 103(7): 1033-45.
- Raper, J. A., Bastiani, M. J. and Goodman, C. S. (1984) 'Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone', *J Neurosci* 4(9): 2329-45.
- Reichman-Fried, M. and Shilo, B. Z. (1995) 'Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation', *Mech Dev* 52(2-3): 265-73.
- Ribeiro, C., Ebner, A. and Affolter, M. (2002) 'In vivo imaging reveals different cellular functions for FGF and Dpp signaling in tracheal branching morphogenesis', *Dev Cell* 2(5): 677-83.
- Ribeiro, C., Neumann, M. and Affolter, M. (2004) 'Genetic Control of Cell Intercalation during Tracheal Morphogenesis in *Drosophila*', *Curr Biol* 14(24): 2197-207.

- Rincon-Limas, D. E., Lu, C. H., Canal, I. and Botas, J. (2000) 'The level of DLDB/CHIP controls the activity of the LIM homeodomain protein apterous: evidence for a functional tetramer complex in vivo', *EMBO J* 19(11): 2602-14.
- Robinow, S. and White, K. (1988) 'The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages', *Dev Biol* 126(2): 294-303.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D. C., Guillemin, K. and Krasnow, M. A. (1996a) 'Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events', *Development* 122(5): 1395-407.
- Samakovlis, C., Manning, G., Steneberg, P., Hacohen, N., Cantera, R. and Krasnow, M. A. (1996b) 'Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development', *Development* 122(11): 3531-6.
- Sánchez-Soriano, N., Tear, G., Whittington, P. and Prokop, A. (2007) '*Drosophila* as a genetic and cellular model for studies on axonal growth', *Neural development* 2: 9.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B. et al. (2012) 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods* 9(7): 676-82.
- Schnorrer, F. and Dickson, B. J. (2004) 'Axon guidance: morphogens show the way', *Curr Biol* 14(1): R19-21.
- Shaye, D. D., Casanova, J. and Llimargas, M. (2008) 'Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea', *Nature* 455(7208): 964-970.
- Simpson, J. H., Bland, K. S., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (2000) 'Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position', *Cell* 103(7): 1019-32.
- Spitzweck, B., Brankatschk, M. and Dickson, B. J. (2010) 'Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for *Drosophila* Robo receptors', *Cell* 140(3): 409-20.
- St Johnston, D. (2002) 'The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*', *Nat Rev Genet* 3(3): 176-88.
- Steneberg, P., Hemphälä, J. and Samakovlis, C. (1999) 'Dpp and Notch specify the fusion cell fate in the dorsal branches of the *Drosophila* trachea', *Mech Dev* 87(1-2): 153-63.

- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M. and Ingham, P. W. (2001) 'Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation', *Curr Biol* 11(8): 608-13.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A. (1996) 'branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching', *Cell* 87(6): 1091-101.
- Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T. B. (1992) 'The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation', *Genes Dev* 6(12B): 2635-45.
- Tabata, T. and Kornberg, T. B. (1994) 'Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning Drosophila imaginal discs', *Cell* 76(1): 89-102.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M. and Hayashi, S. (1996) 'Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in Drosophila trachea regulated by the transcription factor Escargot', *Development* 122(12): 3697-705.
- Tear, G. (1999) 'Neuronal guidance. A genetic perspective', *Trends Genet* 15(3): 113-8.
- Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. and Seeger, M. A. (1996) 'commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in Drosophila and encodes a novel membrane protein', *Neuron* 16(3): 501-14.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001) 'Epithelial cell polarity and cell junctions in Drosophila', *Annu Rev Genet* 35: 747-84.
- Thor, S., Andersson, S. G., Tomlinson, A. and Thomas, J. B. (1999) 'A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection', *Nature* 397(6714): 76-80.
- Tonning, A., Hemphala, J., Tang, E., Nannmark, U., Samakovlis, C. and Uv, A. (2005) 'A transient luminal chitinous matrix is required to model epithelial tube diameter in the Drosophila trachea', *Dev Cell* 9(3): 423-30.
- Torroja, C., Gorfinkiel, N. and Guerrero, I. (2004) 'Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction', *Development* 131(10): 2395-408.
- Tsarouhas, V., Senti, K.-A., Jayaram, S. A., Tiklová, K., Hemphälä, J., Adler, J. and Samakovlis, C. (2007) 'Sequential pulses of apical epithelial secretion and endocytosis drive airway maturation in Drosophila', *Dev Cell* 13(2): 214-25.
- Uv, A. (2003) 'Drosophila tracheal morphogenesis: intricate cellular solutions to basic plumbing problems', *Trends in Cell Biology* 13(6): 301-309.

- Uv, A. and Moussian, B. (2010) 'The apical plasma membrane of *Drosophila* embryonic epithelia', *Eur J Cell Biol* 89(2-3): 208-11.
- Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N. C., Chen, C. K., Haerry, T., Schuh, R. and Affolter, M. (1997) 'DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo', *Development* 124(14): 2741-50.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M. and Leptin, M. (1998) 'The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling', *Mol Cell* 2(4): 515-25.
- Walshe, J. and Mason, I. (2003) 'Fgf signalling is required for formation of cartilage in the head', *Dev Biol* 264(2): 522-36.
- Wang, S., Jayaram, S. A., Hemphala, J., Senti, K. A., Tsarouhas, V., Jin, H. and Samakovlis, C. (2006) 'Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the *Drosophila* trachea', *Curr Biol* 16(2): 180-5.
- Wappner, P., Gabay, L. and Shilo, B. Z. (1997) 'Interactions between the EGF receptor and DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes', *Development* 124(22): 4707-16.
- Watanabe, H., Kawabe, T., Yodoi, J., Tanaka, M., Kim, K. M., Nambu, M., Tsuruta, S., Morita, M., Yorifuji, T., Mayumi, M. et al. (1990) 'Transforming growth factor beta and dexamethasone suppress the expression of Fc epsilon receptor 2 (CD23) on a human eosinophilic cell line EoL-3', *Immunol Lett* 25(4): 313-8.
- Watson, J. D., Wheeler, S. R., Stagg, S. B. and Crews, S. T. (2011) '*Drosophila* hedgehog signaling and engrailed-runt mutual repression direct midline glia to alternative ensheathing and non-ensheathing fates', *Development* 138(7): 1285-95.
- Wickner, W. and Schekman, R. (2005) 'Protein translocation across biological membranes', *Science* 310(5753): 1452-6.
- Wilson, R., Battersby, A., Csiszar, A., Vogelsang, E. and Leptin, M. (2004) 'A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling', *Mol Cell Biol* 24(6): 2263-76.
- Zelzer, E. and Shilo, B. Z. (2000) 'Cell fate choices in *Drosophila* tracheal morphogenesis', *Bioessays* 22(3): 219-26.
- Zhan, Y., Maung, S., Shao, B. and Myat, M. M. (2010a) 'The bHLH transcription factor, Hairy, refines the terminal cell fate in the *Drosophila* embryonic trachea', *PLoS One* 5(11): e14134.

Zhan, Y., Maung, S. W., Shao, B. and Myat, M. M. (2010b) 'The bHLH transcription factor, hairy, refines the terminal cell fate in the *Drosophila* embryonic trachea', *PLoS One* 5(11): e14134.

Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. and Zeller, R. (1999) 'Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds', *Nature* 401(6753): 598-602.