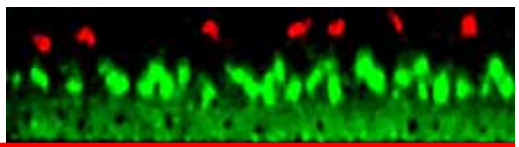


ARQUITECTURA CEL·LULAR I TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL:

**el gen *cdi/TESK1* com a
modulador de Sevenless**

Marta Sesé i Faustino

ARQUITECTURA CEL·LULAR i TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL:
EL GEN *cdi/TESK1* COM A MODULADOR DE SEVENLESS



Marta Sesé i Faustino

Barcelona, 2006

Programa de Doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Bienni 2002-2004

ARQUITECTURA CEL·LULAR I TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL: EL GEN *cdi/TESK1* COM A MODULADOR DE SEVENLESS

Memòria presentada per la
Marta Sesé i Faustino

per optar al grau de
Doctora

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Florenci Serras Rigalt i la Dra. Montserrat Corominas Guiu, del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Dr. Florenci Serras i Rigalt
director de la Tesi

Dra. Montserrat Corominas i Guiu
directora de la Tesi

Marta Sesé i Faustino
autora

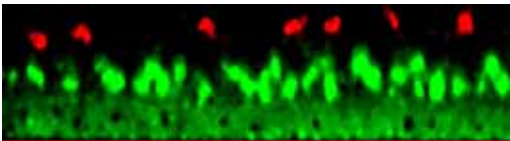
Ahora es el momento de hacer lo que más quieres.
No esperes al lunes, ni esperes a mañana.
Que no aumente ante ti la caravana
de sueños pisoteados. Ya no esperes.

No reprimas por miedo o cobardía.
No postergues la vida con más muerte,
y no esperes más nada de la suerte
que no hay más que tu tesón y tu energía.

Si tu sueño es hermoso dale forma
como esculpe el arroyo a la ribera;
como el viento que vive y se transforma.

Y para que todo resulte a tu manera,
redacta para ti mismo tu norma
y convierte tu otoño en primavera.

e. j. malinowski



INDEX

PRÒLEG	1
INTRODUCCIÓ	3
Determinació del fotoreceptor R7.	
La via de transducció de senyal de Sevenless	3
El model: Desenvolupament de l'ull de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Desenvolupament de l'ull i determinació dels fotoreceptors.....	3
Determinació del R7. La via de Sevenless.....	6
Antagonistes de les vies RTK a l'ull de <i>Drosophila</i>	8
Screening genètic per la cerca de reguladors negatius de la via de Sevenless	11
Disseny de l' <i>screening</i> genètic.....	12
La mutació <i>sev</i> ^{S11}	12
Els elements EP.....	12
La construcció <i>sevEP-Gal4</i>	13
El gen <i>cdi/TESK1</i>	16
Citoesquelet d'actina.....	16
Organització epitelial i Polaritat apico-basal.....	20
OBJECTIUS	23
RESULTATS	25
Capítol 1	25
“The Cdi/TESK1 kinase is required for Sevenless signaling and epithelial organization in the <i>Drosophila</i> eye”.....	27
Supplementary data.....	37
Capítol 2	53
“TESK1 inhibits PC12 cell differentiation and interferes with ERK signaling transduction”.....	55
DISCUSSIÓ	63
Anàlisi de l' <i>screening</i>	63
<i>cdi</i> com a supressor de la via de Sev.....	64

<i>cdi</i> com a modulador en altres sistemes	65
<i>cdi</i> en la reorganització del citoesquelet d'actina	67
<i>cdi</i> en el disc imaginal d'ull. Efecte en la polaritat apico-basal	70
<i>cdi</i> : consideracions globals	75
<i>CONCLUSIONS</i>	79
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	81
<i>AGRAÏMENTS</i>	93

The beauty of cell signalling, is the way different pathways are combined and adapted to control a diverse array of cellular processes in a widely different spatial and temporal domains

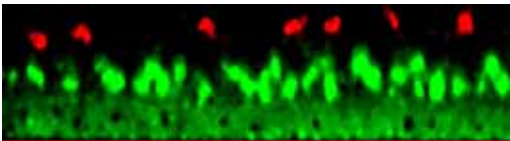
Michael J. Berridge

Durant el desenvolupament dels organismes multicel·lulars els fenòmens de transducció de senyals estan íntimament lligats als mecanismes de comunicació cèl·lula-cèl·lula. En el marc d'un teixit epitelial, la formació i manteniment de l'arquitectura cel·lular i dels contactes que estableixen les cèl·lules són processos altament regulats. Una de les vies de senyalització més coneguda, i alhora estudiada, és la via de Ras/Raf/MAPK. L'activació d'aquesta via es dona per lligands externs a la cèl·lula i s'interpreta per factors de membrana i citosòlics que transduiran el senyal intracel·lular cap al nucli. Aquesta via està altament conservada en tots els organismes eucariotes i s'usa reiteradament durant el desenvolupament en processos tan importants com la diferenciació cel·lular, la proliferació, l'apoptosi o la supervivència cel·lular. Per això, és indispensable entendre com es modula la via de Ras/Raf/MAPK, ja que segons la durada, magnitud i compartimentalització d'aquest senyal es pot donar una resposta cel·lular específica.

Per tal d'identificar nous factors implicats en la regulació de la via Ras/Raf/MAPK es va dissenyar un *screening* genètic a *Drosophila* utilitzant com a model la determinació del fotoreceptor R7 durant el desenvolupament de l'ull. Per l'especificació d'aquest fotoreceptor es requereix de l'activació de dos receptors tirosina quinasa, Sevenless (Sev) i Epidermal growth factor receptor (Egfr). Una activació constitutiva del receptor Sev es manifesta en un increment en el nombre de fotoreceptors R7 en l'omatidi, i l'ull esdevé rugós. L'*screening* genètic per guany de funció en aquest fons sensibilitzat es basava en la cerca de factors que suprimissin aquest fenotip d'ull rugós i per extensió, factors que serien reguladors negatius de la via. D'entre els resultats que es van obtenir es va identificar un gen, *center divider (cdi)*, la funció del qual està vinculada a la reorganització del citoesquelet d'actina cortical.

Cdi és una serina/treonina quinasa encarregada de fosforilar per inactivar el factor despolimeritzador dels filaments d'actina, la ADF/Cofilina. En la present Tesi Doctoral s'ha estudiat el patró d'expressió i la funció del gen *cdi* en el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*. Un guany de funció d'aquest gen és capaç de promoure un acúmulo d'actina polimeritzada en el grup de cèl·lules de l'omatidi. També s'ha demostrat que tant el guany com la pèrdua de funció de *cdi* alteren la localització en l'eix apico-basal de factors integrals de les unions adherents i dels receptors i lligands propis de la via de Sev. A banda d'altres estudis fets en *Drosophila* per caracteritzar la funció de *cdi* i entendre el mecanisme d'acció en la regulació de la via de Sev, s'ha emprat el model de cèl·lules en cultiu de mamífers per analitzar el paper que té TESK1, l'homòleg de *cdi* en mamífers, en la regulació de la via Ras/Raf/MAPK. S'ha observat que TESK1 té l'habilitat d'inhibir la diferenciació neuronal de les cèl·lules PC12, i també que aquesta proteïna interacciona i modifica el perfil de l'activació de la MAPK.

A la introducció d'aquesta Tesi Doctoral es fa una descripció més detallada del sistema model, la determinació del fotoreceptor R7 i la via de Sev. Després s'explica acuradament l'*screening* genètic per la cerca de reguladors negatius d'aquesta via. Finalment s'inclou una introducció del citoesquelet d'actina i dels factors implicats en el seu ensamblatge/desensamblatge, i és on s'exposen alguns conceptes sobre l'organització epitelial, els contactes cel·lulars i la polaritat apico-basal d'una cèl·lula epitelial. L'apartat de resultats s'ha dividit en dos capítols. En el primer es mostren els resultats obtinguts sobre la funció de *cdi* en el desenvolupament de l'ull. S'inclou també un annex amb altres experiments sobre la funció de *cdi* i sobre l'*screening*. El segon capítol mostra el treball fet amb TESK1 en cèl·lules de mamífer. Finalment, una discussió general intenta integrar els resultats dels dos apartats anteriors per tal de formular un model pel qual *cdi* està fent de regulador negatiu de la via de Sev.



INTRODUCCIÓ

DETERMINACIÓ DEL FOTORECEPTOR R7. LA VIA DE TRANSDUCCIÓ DE SENYAL DE SEVENLESS

L'ull de *Drosophila* és un model excel·lent per estudiar el paper que té la senyalització entre cèl·lules en la determinació de destins cel·lulars específics. L'activació del receptor Sev és necessària només per la determinació d'una única cèl·lula en l'omatidi, el fotoreceptor R7 (Basler and Hafen, 1988). Seymour Benzer i els seus col·laboradors, interessats en relacionar els gens amb el comportament van ser els pioners a descriure el fenotip associat a la mutació *sevenless*, eren mosques insensibles a la llum ultraviolada (Benzer, 1971). A partir d'aquell moment, nombrosos estudis van anar dirigits a descriure l'expressió i funció d'aquest gen. Uptal Banerjee, postdoc en el laboratori de S. Benzer va identificar i clonar el gen responsable del fenotip de *sevenless* en competència amb Ernst Hafen, que ho va fer al mateix temps en el laboratori d'en Gerald Rubin (Banerjee et al., 1987b; Hafen et al., 1987).

El model: Desenvolupament de l'ull de *Drosophila melanogaster*

L'ull compost de *Drosophila* està format per unes 750 unitats hexagonals anomenades omatidis i disposades de forma molt regular (Fig. In1). Cadascun d'aquests omatidis consta d'un total de 20 cèl·lules perfectament organitzades: vuit cèl·lules fotoreceptores (R1-R8), dues cèl·lules pigmentàries primàries i sis de secundàries que estan envoltant els fotoreceptors, com també hi ha quatre cons disposats per sobre els mateixos (Ready et al., 1976).

Els fotoreceptors, localitzats al mig del grup de cèl·lules de l'omatidi contenen un rabdòmer encarregat dels processos de captació de la llum. El rabdòmer és un conjunt de prolongacions membranoses apilades formant *microvilli*. Els fotoreceptors R1-R6, anomenats fotoreceptors externs es disposen al voltant dels més petits, els R7 i R8 designats com a fotoreceptors interns. D'aquesta manera, els fotoreceptors interns ocupen una posició central a l'omatidi, la cèl·lula R7 per sobre la R8 (Ready et al., 1976) (Fig. In1).

Desenvolupament de l'ull i determinació dels fotoreceptors

L'ull deriva d'un epitel·li monoestratificat anomenat disc imaginal d'ull-antena. Els discs imaginals són un grup de cèl·lules embrionàries presents durant tot el desenvolupament larvari de la mosca, i són els que durant la metamorfosi donaran les estructures i apèndixs de la cutícula de l'adult, com és el cas de l'ull. Durant l'estadi de blastoderm, un grup d'un 20 cèl·lules contribuirà al desenvolupament del disc imaginal d'ull. En estadis posteriors, aquest disc prolifera per tal de formar un sac epitelial d'un 2000

cèl·lules que penja del teixit de la larva. Però no serà fins a la larva de tercer estadi que l'ull s'organitza per tal d'iniciar els processos de determinació cel·lular (revisat a Wolff and Ready, 1993).

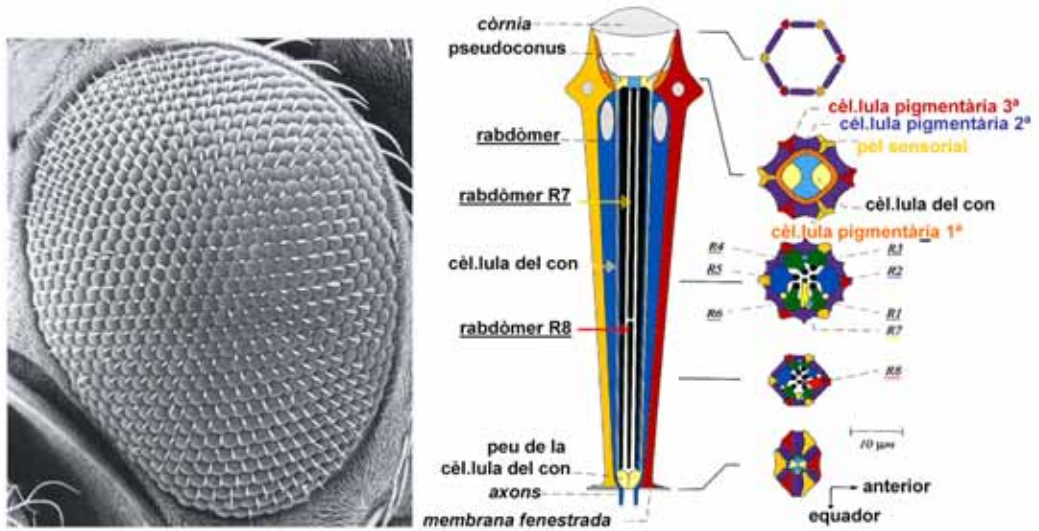


Fig In1. L'ull de *Drosophila melanogaster*. Imatge de microscopia electrònica de rastreig d'un ull compost per uns 750 omatidis disposats de forma regular (esquerra). Estructura d'un omatidi que conté 20 cèl·lules (dreta), 8 de les quals són cèl·lules fotoreceptores (R1-R8). Els rabdòmers dels R7 i R8 ocupen una posició central, el R8 per sota del R7 (adaptat de Wolff and Ready, 1993).

En el disc imaginal d'ull de la larva de tercer estadi es forma una fenadura dorsoventral, el solc morfogenètic que avança per tot el disc de posterior a anterior (Fig. In2). Aquest solc és fàcilment identificable ja que les cèl·lules queden contretes per la part apical i retingudes a la fase G1 del cicle cel·lular. A l'àrea immediatament anterior al solc morfogenètic es donen moltes divisions cel·lulars sincronitzades però encara no s'estableix cap mena de patró. A la part posterior del solc les cèl·lules del futur omatidi es determinen i s'organitzen en el patró característic de l'ull compost dels insectes. Per a la progressió d'aquest solc es requereix de la funció dels morfògens Hedgehog i Decapentaplegic que permetran l'inici de la determinació dels primers fotoreceptors, i s'encarregaran de fer avançar aquest solc (Dominguez and Hafen, 1997; Heberlein et al., 1993; Ma et al., 1993). A mesura que es van determinant els primers grups de cèl·lules proneurals, el disc pateix una segona onada de divisions mitòtiques a la part posterior del solc morfogenètic que servirà per generar el nombre adequat de cèl·lules de la retina (de Nooij and Hariharan, 1995).

L'especificació de les cèl·lules que integren un omatidi comença a la part posterior del solc morfogenètic. Per tal que s'iniciï la determinació cel·lular és necessària

la presència del gen proneural *atonal* a vàries cèl·lules en el solc morfogènètic, després l'expressió del gen *atonal* es refinarà per acabar essent present només al futur fotoreceptor R8, que esdevindrà la cèl·lula fundadora de l'omatidi (Jarman et al., 1994; Jarman et al., 1995). Seguidament hi ha un procés seqüencial de reclutament de cèl·lules en el qual es requereix la via de senyalització de l'Egfr mediada a través de la cascada de fosforilacions de la via de Ras/Raf/MAPK (Freeman, 1996; Freeman, 1997; Kumar et al., 1998). L'activació d'aquest receptor tirosina quinasa (RTK) s'usa reiteradament per dur a terme l'especificació de cada tipus cel·lular en el disc imaginal de l'ull. Successives activacions de l'Egfr permeten el reclutament dels fotoreceptors. Els primers a determinar-se són el parell R2/R5, després R3/R4, els R1/R6 i finalment l'R7 el qual requereix de l'activació d'un altre RTK al mateix temps, Sev (Fig. In2). Posteriorment es determinen els cons i en últim terme, les cèl·lules pigmentaries de la retina.

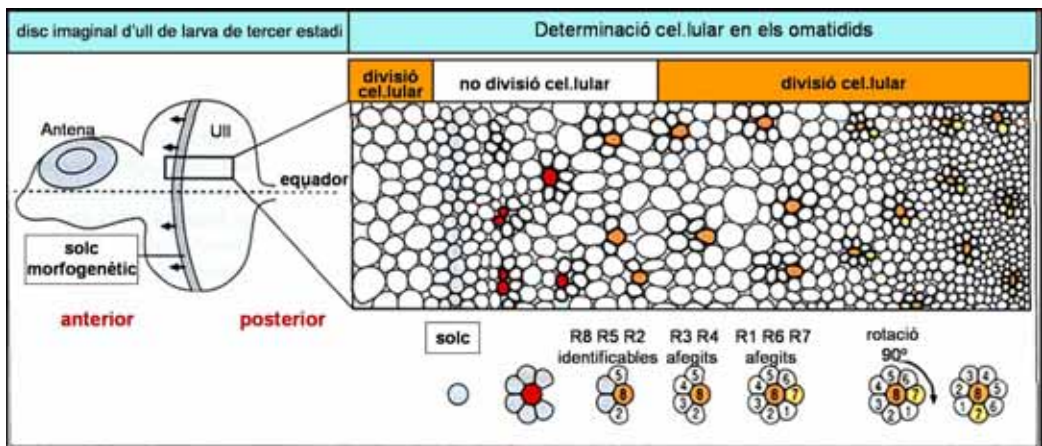


Fig In2. Desenvolupament del disc imaginal d'ull. A l'esquerra, l'estructura d'un disc imaginal d'ull-antena de la larva de tercer estadi. A la dreta es mostra un esquema de la determinació seqüencial dels fotoreceptors en l'omatidi. A la part posterior (dreta) tots els fotoreceptors estan reclutats, mentre que a la part més jove del disc (anterior, esquerra), el primer fotoreceptor a determinar-se és el R8 (vermell) que s'encarregarà d'emetre els senyals activadors per a la determinació de la resta de fotoreceptors (adaptat de Wolpert et al., 1998. "Principles of Development". Oxford University Press. pp. 391).

L'Egfr s'activa pel seu lligand Spitz, proteïna secretable produïda per les cèl·lules centrals de l'omatidi i difon a curta distància (Freeman, 1994). Els R8 són els primers a secretar aquest lligand, i una vegada el parell R2/5 està especificat també secreten Spitz per tal d'anar reclutant successivament la resta de cèl·lules de l'omatidi (Tio et al., 1994). Per contra, un inhibidor del receptor Egfr, Argos, també es secreta i pot difondre més lluny per tal d'inactivar el senyal a cèl·lules més distals que encara no s'han d'especificar (Freeman, 1997; Tio and Moses, 1997). El lligand Spitz es produeix com una forma inactiva expressada de manera ubiqua per totes les cèl·lules del disc d'ull.

Així, el patró espacial-temporal pel qual Spitz es secreta per activar l'Egfr està altament controlat per dues proteïnes: Star, que s'encarrega del transport del reticle endoplasmàtic al golgi d'aquest lligand (revisat a Shilo, 2003), i Rhomboid que és una proteasa responsable d'activar per proteòlisi a Spitz permetent la seva secreció (Urban et al., 2001; Wasserman et al., 2000).

En resum, la determinació dels fotoreceptors ve donada per l'activació de senyals específics, però per tal d'integrar bé aquests senyals el grup de cèl·lules del futur ommatidi ha d'estar altament organitzat. A mesura que s'han d'anar determinant els precursors neuronals, les cèl·lules canvien la seva polaritat en l'eix apico-basal de manera que els nuclis dels fotoreceptors ocupen una posició apical en l'epiteli del disc imaginal (revisat a Wolff and Ready, 1993). Per tant, les cèl·lules s'agruparan per les seves superfícies apicals mitjançant unions cel·lulars que assegurin el contacte entre totes elles.

Determinació del R7. La via de Sevenless

Les vies de senyalització per receptors RTK estan molt conservades en l'escala evolutiva, i els organismes multicel·lulars les usen reiteradament en diferents contextos del desenvolupament. Un RTK pot ser activat per un únic lligand o bé per uns quants. Un cop activat el receptor, aquest dimeritza i s'autofosforila en el seu domini citoplasmàtic. Això permet a les proteïnes adaptadores amb dominis SH2 o PTB unir-se al receptor per tal de reclutar i activar el conjunt de proteïnes que transduiran el senyal intracel·lular (revisat a Schlessinger, 2000). Aquesta primera xarxa d'interaccions proteïna-proteïna permet l'activació del senyal per sota dels receptors RTK de manera ràpida, controlada espacialment i reversible.

Concretament, la via del receptor Sev es requereix només per l'especificació del fotoreceptor R7 (Basler and Hafen, 1988; Tomlinson and Ready, 1986). Aquest és un dels pocs exemples que existeix en que és necessària l'activació de dos RTKs diferents per tal d'especificar la identitat d'una sola cèl·lula. Així, en mosques mutants pel gen *sev* el precursor neuronal del R7 no es determina i adopta un destí no neuronal, el de cèl·lula con (Tomlinson and Ready, 1986) (Fig. In3). No obstant això, tot i que la funció del gen *sev* es requereix només per la determinació del fotoreceptors R7, la seva expressió no és exclusiva del precursor R7 en el grup de cèl·lules de l'ommatidi. La proteïna Sev es localitza a la part apical de vàries cèl·lules, és l'anomenat "grup d'equivalència de Sevenless" (Banerjee et al., 1987a; Banerjee et al., 1987b; Tomlinson et al., 1987). Sev s'expressa primer als fotoreceptors R3/R4, després els R1/R6 l'expressen molt poc i es fa més evident als quatre cons i al precursor del R7 (Tomlinson et al., 1987). Així doncs, el patró d'expressió de Sev no explica l'especificitat d'aquest receptor en determinar un sol tipus cel·lular. Per altra banda, el lligand del receptor Sev, Bride of Sevenless (Boss) (Reinke and Zipursky, 1988), és una proteïna que conté set

passos transmembrana i que s'expressa totes les cèl·lules del grup de l'omatidi però només s'acumula a les unions adherents de la cèl·lula R8 en el moment de l'especificació del R7 (Hart et al., 1990; Kramer et al., 1991; Reinke and Zipursky, 1988). Tant és així que, en l'absència del gen *boss*, els precursors R7 també adoptaran un destí alternatiu i no neuronal, el de cèl·lules con (Cagan et al., 1992; Hart et al., 1990) (Fig. In3A,B). Per tant, la regulació en l'espai i en el temps de l'expressió i localització de la proteïna Boss al R8 és molt important per fer que la determinació del R7 funcioni adequadament (Van Vactor et al., 1991). Per contra, és sabut que l'activació del RTK Sev és suficient per a la determinació d'un fotoreceptor R7 degut a que una activació constitutiva del receptor Sev provoca la presència de nombrosos R7s per omatidi ja que les cèl·lules con, que també expressen *sev*, adoptaran un destí neuronal (Basler et al., 1991) (Fig. In3C).

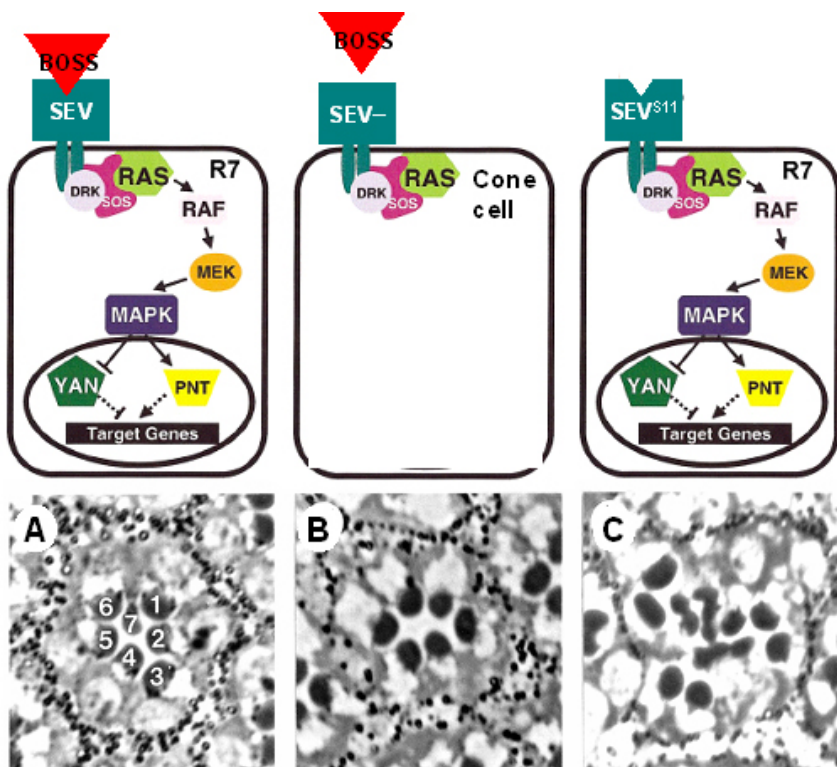


Fig. In3. La via de senyalització de Sev. A dalt es mostra la via de transducció de senyal de Sev en una condició normal (esquerra), una condició on *sev* està mutat i el precursor del R7 adoptarà el destí no neuronal de cèl·lula con (al mig), i una condició en que hi ha una activació constitutiva del receptor Sev (*Sev^{S11}*) on es determinarà un R7 sense necessitat del lligand Boss (adaptat de Rebay, 2002). A baix es mostren seccions histològiques d'omatidis per cadascuna d'aquestes condicions. En la condició normal, els omatidis mostren 7 fotoreceptors degut que no es veu el R8 perquè està per sota del R7. En la condició de pèrdua de funció de *sev*, l'omatidi no té R7. I en el cas d'expressar la construcció *sev^{S11}*, els omatidis tenen varis R7s per omatidi (adaptat de Basler et al., 1991).

La conseqüència de la interacció Boss-Sev és l'estimulació de l'activitat quinasa del receptor i la seva autofosforilació als residus tirosina on s'hi uniran proteïnes amb domini SH2. En aquests dominis es comencen a reclutar proteïnes adaptadores com la proteïna Drk que té un domini SH2/SH3 (Simon et al., 1993). Drk és la proteïna que s'encarrega d'unir una altra de les proteïnes que també es recluten en aquest complex, l'intercanviador de nucleòtids guanina Son of Sevenless (Sos) (Rogge et al., 1991). Sos té la capacitat d'unir-se a la GTPasa Ras i l'activa (Simon et al., 1991). Ras és una GTPasa que es troba inactiva quan està unida a GDP i unida a la membrana plasmàtica. Quan s'activa Ras unint-se a GTP és capaç d'activar a la quinasa Raf. L'activació de Raf sembla ser un procés complex en que es requereix la localització de Raf a la membrana unit a Ras-GTP i interaccionant amb d'altres proteïnes que el fosforilaran (Morrison and Cutler, 1997). Com a conseqüència, Raf desencadena una cascada de fosforilacions de proteïnes citosòliques que culmina amb l'activació per fosforilació de la mitogen activated MAP kinase (MAPK) (Biggs et al., 1994; Dickson et al., 1992; Karim et al., 1996). La MAPK fosforilada es dirigeix al nucli on tindrà la funció d'activar factors de transcripció mitjançant la fosforilació de residus serina o treonina (revisat a Raabe, 2000). Pointed i Yan són factors de transcripció de la família de proteïnes amb dominis ETS (Klambt, 1993; Lai and Rubin, 1992; Tei et al., 1992). Pointed s'activa per la MAPK i Yan queda reprimat per l'activitat de la mateixa, i són els que promouen el destí cel·lular del R7 (revisat a Raabe, 2000) (Fig. In3). Pointed s'expressa a les cèl·lules precursors de l'omatidi en el disc imaginal d'ull, i la seva pèrdua de funció resulta en l'absència de fotoreceptors, inclòs el R7 (Brunner et al., 1994). Per contra, una pèrdua de funció de Yan genera l'aparició de fotoreceptors extras en l'omatidi (Lai and Rubin, 1992), i per tant, una forma desfosforilada de Yan manté les cèl·lules en un estat no diferenciat mentre que la fosforilació de Pointed serveix per iniciar el procés de determinació cel·lular dels fotoreceptors. Finalment, els factors de transcripció s'encarreguen de l'activació de l'expressió de gens com *phyllopod* que s'expressa als R1, R6 i R7. En l'absència d'aquest gen, aquests tres fotoreceptors adopten un destí no neuronal, el de cèl·lules con (Chang et al., 1995; Dickson et al., 1995). En resum, degut a l'activació de la via de Sev s'inactiva Yan i s'activa Pointed per tal de transcriure els gens necessaris per a la determinació del fotoreceptor R7.

Antagonistes de les vies RTK a l'ull de *Drosophila*

En funció de la durada i la intensitat de la transducció del senyal es poden donar les diferents instruccions a la cèl·lula. Per tant, hi ha mecanismes que asseguruen un lliandar òptim d'activació del senyal i un correcte manteniment o silenciament del mateix. És per això que els reguladors negatius de les vies RTK són tan essencials. Els reguladors negatius més coneguts que operen en el desenvolupament de l'ull regulant les vies RTK són:

A) Gap-1 i Yan. Per una banda, la “GTPase-activating protein1” (Gap-1) és una proteïna que es localitza a la membrana citoplasmàtica i interacciona amb les vies de Sev i Egrf. És una proteïna GAP capaç de tornar Ras al seu estat inactiu, Ras-GDP (Gaul et al., 1992). Yan (o *anterior open*) en canvi, és un repressor transcripcional de la via Ras/MAPK esmentat anteriorment. L'activitat d'aquest factor està modulada per la MAPK que el fosforila i l'instabilitza. El guany de funció de *yan* bloqueja la determinació de fotoreceptors (Lai and Rubin, 1992; Rebay and Rubin, 1995) (Fig. In4).

B) Factors regulats transcripcionalment per l'activació de la via Ras/Raf/MAPK com Sprouty, Kekk-1 o Argos. Argos és una proteïna secretada que té un únic domini tipus EGF i té la funció d'unir-se al receptor Egrf per inhibir-lo. També té la capacitat de prevenir la unió del lligand Spitz a l'Egrf (Jin et al., 2000; Taguchi et al., 2000). *kekkon-1* codifica per una proteïna transmembrana d'adhesió amb activitat serina/treonina quinasa, on s'hi uneixen proteïnes d'adhesió i també l'Egrf que queda inhibit (Ghiglione et al., 1999). Per últim, *sprouty* va ser aïllat inicialment com a regulador negatiu del RTK Fibroblast Growth Factor (Fgfr) (Hacohen et al., 1998) però posteriorment es va veure que la seva expressió podia ser promoguda per l'Egrf i es va estudiar la capacitat de Sprouty per actuar sobre la via Sev. Sprouty és una proteïna intracel·lular que es localitza a la membrana plasmàtica i conté un domini ric en cisteïnes que el fa capaç d'associar-se a components de la via com Grb2/Drk i Gap-1, regulant així el reclutament del complexe citosòlic a la membrana per tal que es transdueixi el senyal (Casci et al., 1999; Kramer et al., 1999; Reich et al., 1999) (Fig. In4).

C) PTP-ER, Echinoid i Cbl són altres reguladors de la via. Primerament, PTP-ER es va identificar a partir d'un *screening* de gens que regulaven positivament o negativament a Ras1 (Karim et al., 1996) i és una fosfatasa que es localitza en el citoplasma i forma un complexe amb la MAPK per desfosforilar-la (Karim and Rubin, 1999). En segon lloc, Echinoid és una molècula d'adhesió que es localitza a la membrana plasmàtica i la seva pèrdua de funció provoca l'aparició de fotoreceptors i cèl·lules del con extrems (Bai et al., 2001). Aquest factor defineix una via addicional per inhibir l'activació de l'Egrf i de Sev per sota del receptor, a través d'interaccionar amb ell o bé mitjançant l'estabilització de Tramtrak, que és un repressor transcripcional (Spencer and Cagan, 2003). Per últim, Cbl té un domini SH2 inusual que s'uneix a l'Egrf facilitant la seva ubiquitinització. D'aquesta manera, el receptor s'internalitza i entra en la via de degradació anticipadament (Hime et al., 1997; Meisner et al., 1997; Pai et al., 2000) (Fig. In4).

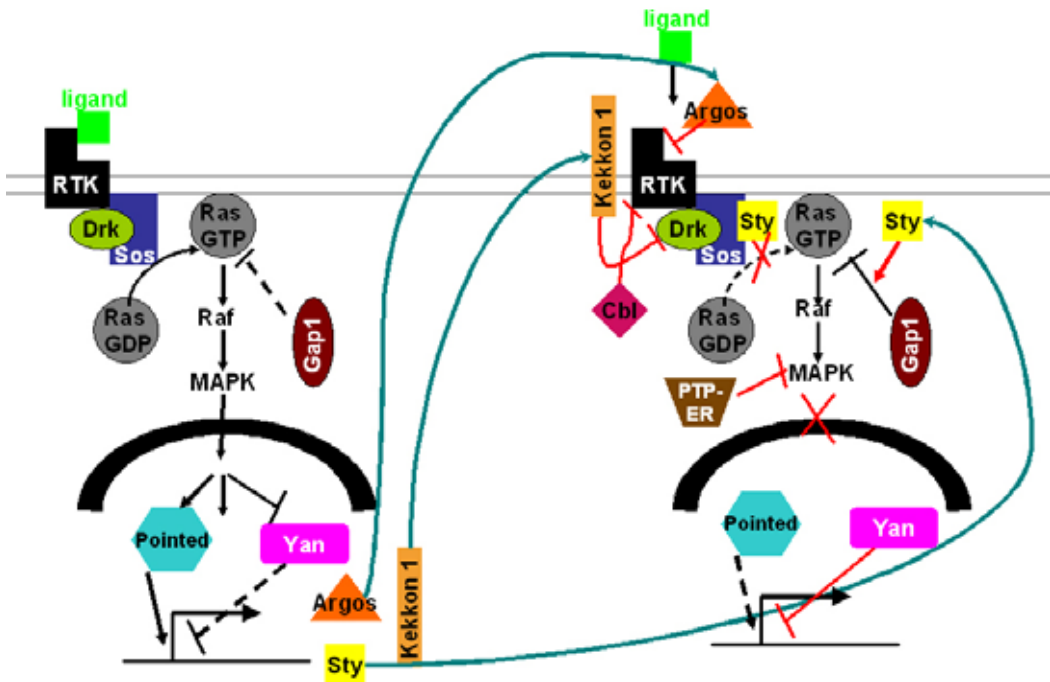


Fig. In4. Reguladors negatius de les vies RTK que operen en el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*. A l'esquerra es mostra la seqüència d'activacions proteiques de la via Ras/MAPK quan el receptor està activat. Sprouty (Sty), Argos i Kekkón 1 s'expressen degut a l'activació d'aquesta via. A l'esquerra estan representats tots els reguladors negatius i la posició on efectuen la seva funció en una via activada per un RTK.

SCREENING GENÈTIC PER LA CERCA DE REGULADORS NEGATIUS DE LA VIA DE SEVENLESS

Un dels principals avantatges que ofereix *Drosophila* és la possibilitat de fer *screenings* genètics que permeten detectar gens involucrats en un procés cel·lular o via de senyalització concreta, simplement observant-ne els fenotips de la primera generació. Els primers *screenings* anaven destinats a la cerca d'al·lels que de forma dominant, manifestessin un fenotip. Amb aquesta estratègia, els Drs. Christiane Nusslein-Volhard i Eric Wieschaus van desenvolupar un *screening* per identificar gens involucrats en el desenvolupament primerenc a l'embrió (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Aquest treball els va permetre obtenir el Premi Nobel en Medicina l'any 1995, compartit amb el Dr. Edward B. Lewis.

Un altre tipus d'*screenings* més sofisticats són els dissenyats en un fons genètic sensibilitzat. Aquests permeten detectar al·lels que no manifesten un fenotip en heterozigosi, però que de manera dominant suprimeixen o potencien un procés en particular prèviament alterat. Molts dels investigadors es van centrar en un sistema tan atractiu i conegut com era el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*. Des del moment en que es va postular que el fotoreceptor R7 requeria de l'activació de dos RTKs per a conduir la seva determinació cel·lular, es van dur a terme molts *screenings* per la cerca de gens efectors de la via de Sev en particular. El pioner va ser el Dr. Michael Simon quan l'any 1991 va utilitzar un al·lel hipomorf de *sev* per identificar mutacions en gens que potenciessin el fenotip associat, la pèrdua del R7 per en l'omatidi (Simon et al., 1991). Així es van aïllar els factors Ras1 i el seu intercanviador de GTP Sos, tot i que aquest últim factor va ser identificat en un altre laboratori al mateix temps (Rogge et al., 1991). A partir d'aquests dos *screenings* i d'altres de molt similars en que feien servir la mateixa estratègia, es van anar identificant altres factors involucrats en la via de Sev com: *Downstream of receptors kinases* (*Drk*) (Olivier et al., 1993; Simon et al., 1993), *rolled* (que és la MAPK), *Star*, *Phyllopod* (Dickson et al., 1996), *conector enhancer of Ksr* (Therrien et al., 1998) i *crosscrew* (Allard et al., 1996) entre d'altres.

Posteriorment va aparèixer una nova generació d'*screenings* de guany de funció basats en el sistema Gal4/UAS, sistema dissenyat per dirigir l'expressió de gens *in vivo* a *Drosophila* (Brand and Perrimon, 1993). La pionera en fer un *screening* de guany de funció va ser la Dra. Pernille Rorth que va dissenyar uns elements-P anomenats *Enhancer and Promoter (EP)- elements*. Aquests EPs tenen la peculiaritat de contenir *Upstream Activating Sequences* (UAS) que en presència del factor de transcripció Gal4 poden dirigir la transcripció de gens flanquejants a la inserció de l'EP en el genoma de *Drosophila* (Rorth, 1996; Rorth et al., 1998). Aquests tipus d'*screenings* són molt útils per tal d'identificar gens que no manifesten fenotip en la seva pèrdua de funció, però

que en canvi el seu guany de funció és capaç d'interferir en una via concreta. Pel que fa a aquests *screenings* de guany de funció, també es van idear estratègies per sobreexpressar gens a l'atzar en un fons genètic sensibilitzat, i així aïllar gens que suprimissin o potenciessin una via d'interès.

Disseny de l'*screening* genètic

Tal i com s'ha esmentat, la via de transducció de senyal de Sev mediada per la cascada d'activacions de Ras/Raf/MAPK ha estat força estudiada. No obstant, encara es desconeixen alguns factors reguladors negatius o moduladors de la mateixa. Per tal d'abordar aquesta qüestió, el Dr. Ernst Hafen de la Universitat de Zürich (Suïssa) en col·laboració amb el Dr. Florenci Serras de la Universitat de Barcelona varen dissenyar un *screening* genètic de guany de funció en un fons genètic sensibilitzat per una activació constitutiva del receptor Sev. Aquest disseny experimental permet la detecció de nous gens que suprimeixen l'activació d'aquesta via Ras/Raf/MAPK. Es va utilitzar una col·lecció de línies de mosques amb elements EP inserits atzarosament en el genoma i es va dirigir l'expressió de gens flanquejants als EPs només en les cèl·lules del grup d'equivalència de *sev*. L'objectiu va ser aïllar gens candidats que sobreexpressats suprimissin el fenotip d'ull rugós associat a una activació constitutiva del receptor Sev (*sev^{S11}*). A continuació es farà una descripció detallada de cadascun dels elements que constitueixen el disseny experimental d'aquest *screening*.

La mutació *sev^{S11}*

La construcció *sev^{S11}* és una mutació de guany de funció de Sev que s'expressa a totes les cèl·lules del "grup d'equivalència de *sev*". Aquesta construcció té truncada la part N-terminal del receptor Sev i això permet la seva activació constitutiva sense la necessitat del lligand Boss. Per tant, les mosques mutants *sev^{S11}* mostren múltiples fotoreceptors R7 per omatidi i això, externament es detecta perquè l'ull perd la seva estructura regular i adquireix un fenotip d'ull rugós (Basler et al., 1991) (Fig. In3C i Fig. In5).

Els elements EP

Es van dissenyar uns elements EP que s'anomenen *double-headed EP-elements* ja que contenen unes seqüències UAS a 3' i 5' de l'EP que permeten la transcripció de gens flanquejants al punt d'inserció en el genoma. Aquests EPs consten de:

a) dos conjunts de 10 seqüències d'activació transcripcional de llevat UAS que estan dirigint la transcripció de gens situats tant a 5' com a 3' de l'EP. D'aquesta manera, en presència del factor de transcripció Gal4 es donarà la sobreexpressió de gens flanquejants a aquest EP (Fig. In5).

b) el gen *yellow+* (*y+*) com a marcador per detectar aquelles mosques que han incorporat l'EP(*y+*) en el genoma, ja que originàriament són mosques en un fons genètic

yellow (*y*) i *white* (*w*). Per tant, aquelles mosques que porten l'EP(*y*+) tenen el color del cos més fosc.

c) dues seqüències LoxP flanquejant les seqüències UAS situades a 5' de l'EP. Aquests LoxP permetran, en presència de la recombinasa Cre, una recombinació en *cis* dins l'EP(*y*+) que provocarà una escissió del gen *yellow*+ i de les seqüències UAS situades a 5' de l'EP, quedant així mosques amb l'element EP(*y*-) que distingirem perquè el color del cos és més clar. Ara aquests EP(*y*-) només dirigiran la transcripció de gens situats a 3' de l'EP (Fig. In5).

La construcció *sevEP-Gal4*

Les mosques que tenen aquesta construcció, que també denominem *sev-Gal4*, expressen el factor de transcripció Gal4 sota el promotor propi del gen *sev*. Per tant, hi haurà proteïna Gal4 a les cèl·lules del "grup d'equivalència de *sev*" on es podrà induir la transcripció de gens que es trobin regulats per promotors UAS.

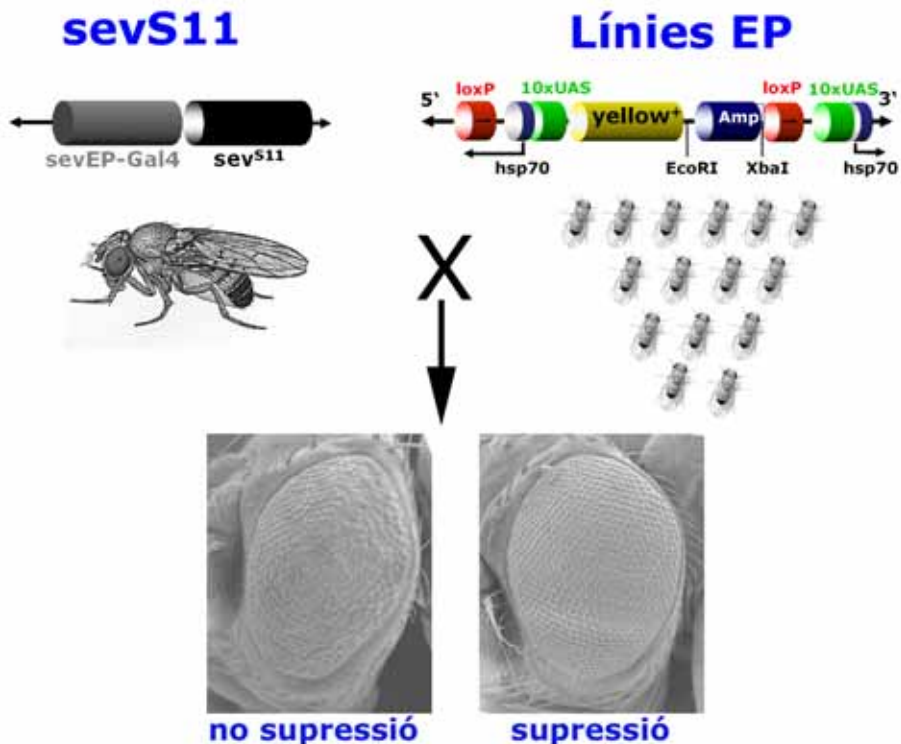


Fig. In5. *Screening* genètic per la cerca de reguladors negatius de la via de Sev. A la part superior es mostren els esquemes de les construccions *sevEP-Gal4 sev^{S11}* (esquerra) i de l'EP utilitzat en aquest *screening*. Les línies EP(*y*+) es van encreuar amb mosques *sevEP-Gal4 Sev^{S11}* i es va analitzar la descendència. Es van triar les línies EP(*y*+) que suprimien el fenotip d'ull rugós de *sev^{S11}*. A la part inferior es mostren els fenotips d'ull rugós designat com a "no supressió" i el de "supressió" de l'ull rugós.

Per dur a terme l'experiment es van obtenir 5.000 línies de mosques que cadascuna duia inserit un sol $EP(y+)$ a l'atzar en el genoma. Es van encreuar aquestes línies $EP(y+)$ amb les mosques recombinants $sev-Gal4 sev^{S11}$ que tenien l'ull rugós i expressaven la proteïna Gal4 només a cèl·lules del "grup d'equivalència de sev " (Fig. In5). En analitzar la descendència, totes aquelles línies $EP(y+)$ que suprimien fortament el fenotip d'ull rugós de sev^{S11} es van caracteritzar molecularment mitjançant la tècnica de *plasmid rescue* (Taula In1). Com a control de l'experiment, aquestes línies $EP(y+)$ es van encreuar amb mosques sev^{S11} en absència de Gal4. Això es va fer per descartar que la supressió de fenotip d'ull rugós fos per causa d'una mutació produïda per l'inserció de l'EP en el genoma (Taula In1).

Un cop analitzada la localització d'aquests EPs en el genoma, aquestes línies $EP(y+)$ es van encreuar amb mosques que expressaven la transposasa Cre. Això provoca una recombinació en *cis* dins l' $EP(y+)$ amb l'objectiu de fer escindir les seqüències UAS a 5' de l'EP, i així en van resultar les línies de mosques $EP(y-)$. Aquestes línies $EP(y-)$, que ara ja només eren capaces de dur a terme la sobreexpressió d'un sol gen flanquejant a 3', es van tornar a encreuar altre cop per les mosques $sev-Gal4 sev^{S11}$ per testar-ne la supressió, i així decidir quin dels gens flanquejants a l'EP era el responsable de la supressió de sev^{S11} , el que estava a 3' de l'EP o el que havia estat a 5'. Els resultats es mostren a la primera taula (Taula In1).

Línia	$EP(y+) \times sev-Gal4sev^{S11}$	$EP(y+) \times sev^{S11}$	$EP(y-) \times sev-Gal4 sev^{S11}$	<i>plasmid</i>	<i>rescue</i>	gen
32-163	supressió	cap efecte	supressió	2.178.718	2L / 22C	<i>yan</i>
33-077	supressió	cap efecte	cap efecte	14.922.419	3R / 91F	<i>CG6040</i>
34-030	supressió	cap efecte	lleu supressió	2.178.781	2R / 22C	<i>yan</i>
34-120	supressió	cap efecte	supressió	18.148.370	2L / 36E	<i>SOCS36E</i>
34-165	supressió	cap efecte	lleu supressió	14.922.664	3R / 91F	<i>cdi</i>
41-185	supressió	cap efecte	cap efecte	19.857.061	3R / 95D	<i>CG5933</i>
44-004	supressió	cap efecte	supressió	14.923.582	3R / 91F	<i>cdi</i>
44-035	supressió	cap efecte	lleu supressió	25.304.896	3R / 99A	<i>PTP99A</i>
44-050	supressió	cap efecte	lleu supressió	4.672.087	3R / 85B	<i>pyd</i>
46-047	supressió	supressió	supressió		NO IDENTIF.	
47-038	supressió	cap efecte	supressió	18.148.323	2L / 36E	<i>SOCS36E</i>
48-014	supressió	cap efecte		2.178.793	2L / 22C	<i>yan</i>
48-060	supressió	cap efecte	supressió	18.145.465	2R / 58F	<i>cdk9</i>
48-068	supressió	cap efecte	supressió	11.693.728	2R / 52F	<i>PTP52F</i>
49-089	supressió	cap efecte	supressió	18.145.403	2R / 58F	<i>cdk9</i>
51-044	supressió	cap efecte	cap efecte	10.116.048	2R / 51B	<i>sec61B</i>
yw	cap efecte	cap efecte				

Taula In1. Resultats de l'*screening*. Setze línies $EP(y+)$ suprimen el fenotip de sev^{S11} (primera columna). També s'indiquen els resultats en la supressió de sev^{S11} per part de les línies $EP(y-)$. A la quarta columna s'indica la posició d'inserció d'aquests EPs en el genoma, i finalment, a la última columna s'indica el gen candidat a ser supressor de la via de Sev en cada cas.

Posteriorment, i amb la finalitat d'esbrinar a quin nivell de la via de Sev estaven actuant aquests gens identificats en l'*screening*, les línies *EP(y+)* es van encreuar amb un guany de funció tant de Ras (*sev-RasV12*) com de Raf (*sev-Raf*) que també provoquen un excés de fotoreceptors R7 en l'omatidi amb rugositat associada de l'ull. Es va analitzar si les línies *EP(y+)* suprimien la via de Ras/MAPK en aquests nivells de la via (Taula In2).

Línia	<i>EP(y+) x sev-Gal4 sev-RasV12</i>	<i>EP(y+) x sev-Gal4 sev-Raf^{torY9}</i>	gen
32-163	lleu supressió	lleu supressió	<i>yan</i>
33-077	cap efecte	cap efecte	<i>CG6040</i>
34-030	cap efecte	cap efecte	<i>yan</i>
34-120	cap efecte	cap efecte	<i>SOCS36E</i>
34-165	cap efecte	cap efecte	<i>cdi</i>
41-185	cap efecte	cap efecte	<i>CG5933</i>
44-004	cap efecte	cap efecte	<i>cdi</i>
44-035	cap efecte	cap efecte	<i>PTP99A</i>
44-050	cap efecte	cap efecte	<i>pyd</i>
46-047	cap efecte	cap efecte	
47-038	cap efecte	cap efecte	<i>SOCS36E</i>
48-014	lleu supressió	cap efecte	<i>yan</i>
48-060	lleu supressió	supressió	<i>cdk9</i>
48-068	cap efecte	cap efecte	<i>PTP52F</i>
49-089	lleu supressió	lleu supressió	<i>cdk9</i>
51-044	cap efecte	cap efecte	<i>sec61B</i>
yw	cap efecte	cap efecte	

Taula In2. Resultats de les interaccions genètiques entre les línies *EP(y+)* i els guanys de funció de Ras i de Raf.

De totes les línies que es van identificar com a supressores de la via de Sev, cridaven especialment l'atenció tres d'elles inserides al mateix punt en el genoma. *EP(33-077)*, *EP(44-004)* i *EP(34-165)* suprimien fortament el fenotip d'ull rugós de *sev^{S11}*. Els gens candidats que flanquejaven a aquests EPs encara no s'havien descrit com a reguladors negatius, i un d'ells era *center divider (cdi)*. En aquesta Tesi Doctoral s'ha descrit la funció d'aquest gen com a supressor de la via de Sev.

EL GEN *cdi*/TESK1

El gen de *Drosophila center divider* (*cdi*) va ser aïllat a partir d'*screenings* per identificar gens amb expressió en el sistema nerviós de l'embrió (Crews et al., 1992; Nambu et al., 1990). El seu nom és en honor a la seva expressió a la línia mitja del sistema nerviós central de l'embrió (Matthews and Crews, 1999). Altres *screenings* genètics han aïllat *cdi* com a candidat a regular el desenvolupament neuronal i la guia axonal (Kearney et al., 2004; Kraut et al., 2001; Norga et al., 2003).

cdi codifica per una serina/treonina quinasa ortòloga a la proteïna de mamífers Testis specific kinase 1 (TESK1) (Matthews and Crews, 1999). Ambdues comparteixen un 61% de similaritat en la seqüència aminoacídica del domini quinasa. L'estructura d'aquestes proteïnes es compon bàsicament d'un domini catalític proteïna quinasa a N-terminal i un domini a C-terminal ric en prolines, domini encarregat d'unió proteïna-proteïna (Fig. In6). La quinasa TESK1 és una proteïna de 68KDa que comparteix un 64% d'homologia en la seqüència aminoacídica amb la LIM motif-containing protein kinase 1 (LIMK1) de mamífers (Toshima et al., 1995). A l'igual que la LIMK1, TESK1 és responsable de fosforilar el residu Ser-3 del Factor despolimeritzador de l'actina (ADF)/Cofilina i així l'inactiva tant *in vitro* com *in vivo* (Toshima et al., 2001a).

Amb tot ens trobem davant d'un gen, *cdi*, candidat a ser un regulador negatiu de la via de Sev i que se li atribueix una funció en la reorganització del citoesquelet d'actina.

Citoesquelet d'actina

L'actina és un dels principals components del citoesquelet de les cèl·lules eucariotes. El seu ensamblatge i desensamblatge dinàmic està implicat en processos tan importants com la divisió cel·lular, la motilitat, l'endocitosi i el manteniment de l'estructura cel·lular. Pel que fa a un teixit epitelial, la polimerització/despolimerització està íntimament lligada a canvis en la forma cel·lular, que es defineixen com la modificació en la dimensió d'una o més cares de la cèl·lula en el pla epitelial (revisat a Schock and Perrimon, 2002).

L'actina és una proteïna d'unió a ATP i es presenta en dues formes diferents a la cèl·lula: els filaments (F-actina) que es formen a partir de les subunitats d'actina globular (G-actina). Aquests filaments d'actina estan polaritzats, de manera que hi ha un extrem positiu (*barbed end*) per on els monòmers d'actina s'hi enganxen per anar construint el filament, i un extrem negatiu (*pointed end*) per on l'actina es despolimeritza i s'alliberen els monòmers de G-actina (revisat a Welch and Mullins, 2002). L'entramat de filaments d'actina fa de suport de moltes estructures cel·lulars. La xarxa de filaments d'actina cortical és molt dinàmica en quant el seus processos d'ensamblatge/desensamblatge

per tal de construir filopodis, lamelipodis i estructures necessàries per la motilitat cel·lular.

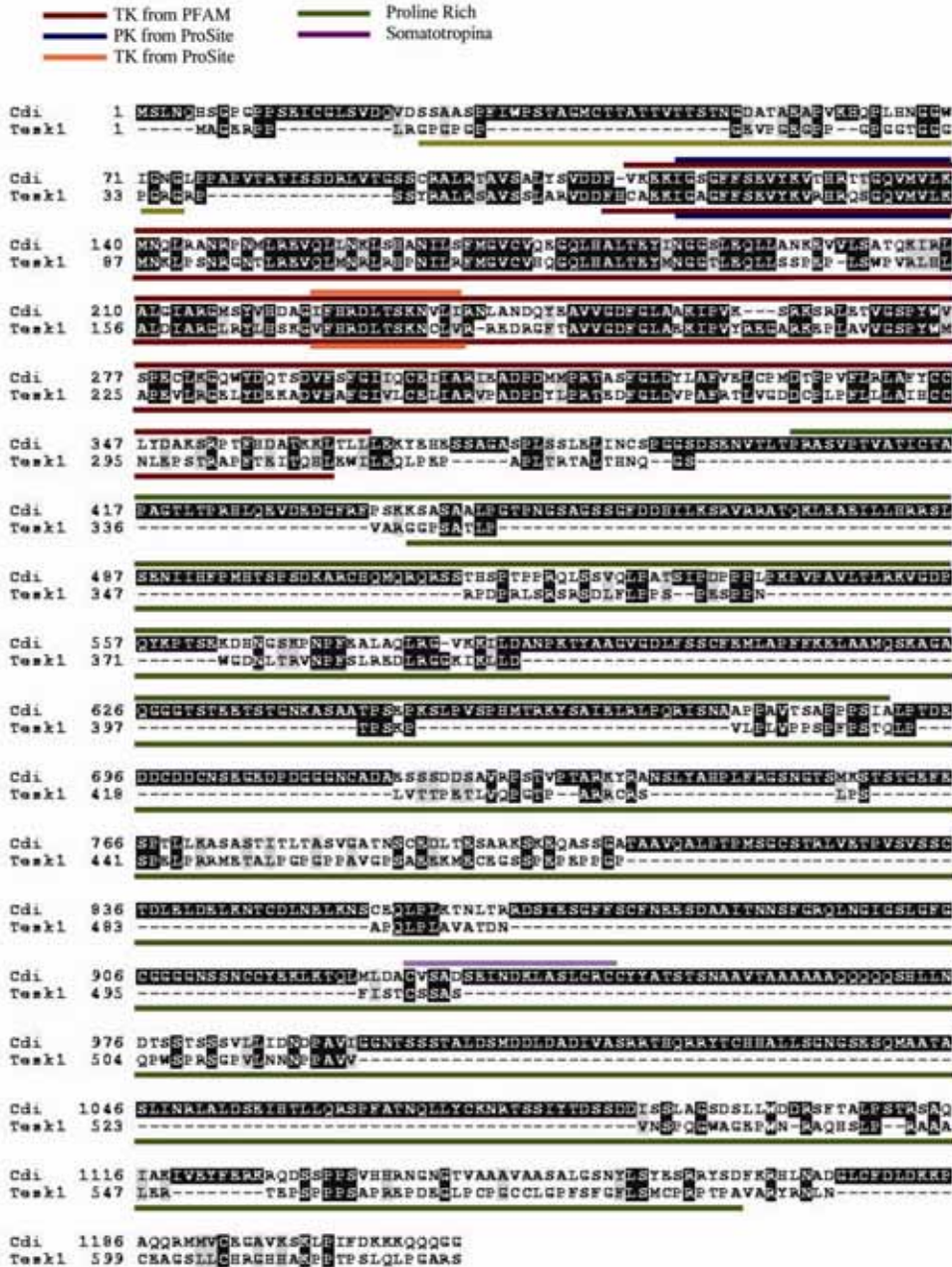


Fig. In6. Aliniament de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes TESK1 i Cdi. Les dues proteïnes tenen un domini C-terminal ric en prolines i un domini quinasa a N-terminal. Es pot observar que la similitud del domini catalític (taronja) és molt elevada entre ambdues proteïnes.

El fenomen de nucleació de l'actina es defineix com la formació de nous filaments d'actina a partir de G-actina i està controlat pel complex Arp2/3 i altres factors promotors de la nucleació de l'actina (revisat a Welch and Mullins, 2002). No obstant, els filaments d'actina també es poden allargar pels seus *barbed ends* sempre i quan aquests estiguin lliures i accessibles. La Profilina té gran afinitat per la G-actina, actuant com un factor intercanviador de nucleòtids amb l'actina per tal de promoure l'elongació dels filaments mitjançant la conversió de ADP a ATP (revisat a Witke, 2004) (Fig. In7). Per altra banda, la ADF/Cofilina és el factor que estimula la despolimerització de l'actina en els *pointed ends*, incrementant així la quantitat de G-actina i promovent el reciclatge dels filaments (Moon and Drubin, 1995). A vertebrats, ADF i Cofilina són productes de gens diferents tot i que realitzen la mateixa funció (revisat a Bamburg, 1999). L'homòleg de la ADF/Cofilina a *Drosophila*, *twinstar*, va ser aïllat en un *screening* de gens implicats en defectes en la mitosi (Gunsalus et al., 1995). Així es va caracteritzar i descriure la funció d'aquest gen que està implicat en la citoquinesi durant la mitosi i la meiosi, on participa en la migració i separació dels centrosomes (Edwards et al., 1994; Gunsalus et al., 1995; Somma et al., 2002). La pèrdua de funció d'aquest gen despolimeritzador de l'actina provoca un gran acúmulo de F-actina tant a cèl·lules S2 de *Drosophila*, on s'impedeix la formació de lamel·lipodis essencials per la motilitat (Gunsalus et al., 1995; Rogers et al., 2003; Somma et al., 2002), com també a les ovarioles on provoca defectes en la formació de l'oòcit (Chen et al., 2001).

La ADF/Cofilina s'inactiva per fosforilació a la Ser-3, perdent així la seva capacitat d'unir-se a l'actina (revisat a Bamburg et al., 1999). Aquesta fosforilació la duen a terme dues famílies de quinases molt relacionades entre elles; les LIM kinases i les quinases TESK esmentades anteriorment (Fig. In7). Primerament, per *Northern blot* s'observa que TESK1 s'expressa a varis teixits però majoritàriament a les cèl·lules germinals dels testicles (Toshima et al., 1999). També es coneix que TESK1 s'expressa a diverses línies cel·lulars com: COS-7, HeLa, Rat1A, Swiss3T3 Jurkat T, N1E-115 i PC12 on es comprova una localització citoplasmàtica (Toshima et al., 2001a). Quan aquesta serina/treonina quinasa s'expressa en cèl·lules en cultiu es promou la formació de fibres d'estrés i adhesions focals als marges de les cèl·lules (Toshima et al., 2001a). L'activitat quinasa de TESK1 està regulada per fosforilació, i se sap que TESK1 es pot autofosforilar a la serina-215 creant així un *loop* activador (Toshima et al., 1999). Hi ha altres factors coneguts amb capacitat d'inhibir el domini quinasa de TESK1. L'actopaxina és un membre integral de les adhesions focals i interacciona amb el domini C-terminal de TESK1 per regular les adhesions focals sobre un substrat de fibronectina (LaLonde et al., 2005). També, la proteïna 14-3-3 β inhibeix TESK1 i regula la seva localització subcel·lular conduint-lo al domini on estan presents les integrines (Toshima et al., 2001c), proteïnes encarregades de la unió de la cèl·lula amb la matriu extracel·lular i de la transducció de senyal entre la matriu i la cèl·lula. Per últim, TESK1

interacciona amb la proteïna de mamífers mSprouty-4 el qual inhibeix el domini quinasa de TESK1 (Tsumura et al., 2005). Cal esmentar també, que TESK1 comparteix un 48% d'homologia amb TESK2 en la seqüència aminoacídica. Són proteïnes de la mateixa família i s'ha demostrat que TESK2 també fosforila la ADF/Cofilina (Toshima et al., 2001b). A diferència de TESK1, la localització de TESK2 és nuclear, cosa que suggereix que ambdues proteïnes estan executant funcions diferents.

Per altra banda, la LIMK1 és una serina/treonina quinasa citoplasmàtica que va ser aïllada en *screenings* d'expressió de quinases en el sistema nerviós (Bernard et al., 1994; Cheng and Robertson, 1995; Mizuno et al., 1994; Proschel et al., 1995) i que regula la dinàmica de l'actina mitjançant la fosforilació de la ADF/Cofilina (Arber et al., 1998). El gen de *Drosophila dLimk* es va descriure i clonar per homologia a la seqüència de LIMK1 d'humans, i es va comprovar que també era capaç de fosforilar la ADF/Cofilina permetent-ne així la seva inactivació (Ohashi et al., 2000).

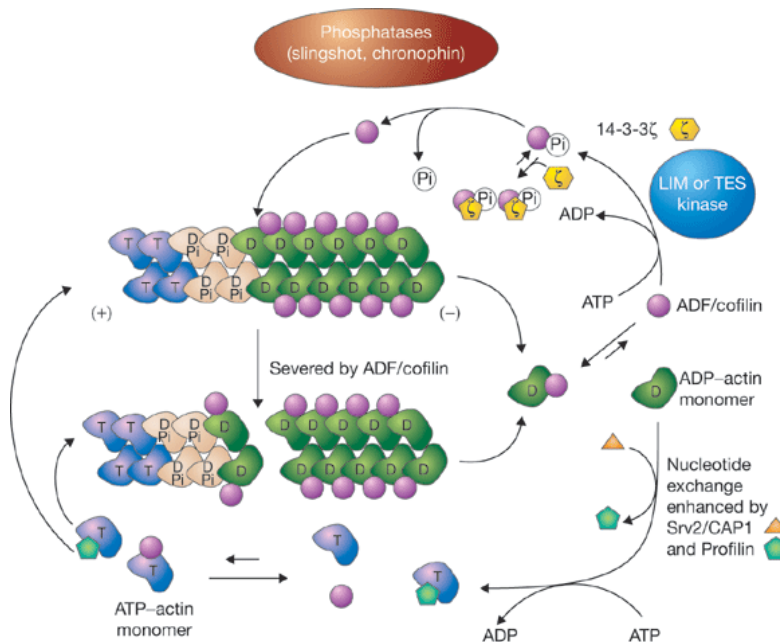


Fig. In7. Ensamblatge/desensamblatge dels filaments d'actina. ADF/Cofilina promou la despolimerització dels filaments als *barbed ends* s'activa per CIN i Ssh i s'inactiva per les quinases LIMK i TESK. La Profilina promou la polimerització als *pointed ends* (adaptat de Wiggan et al., 2005).

L'activitat de la LIMK1 es regula per les quinases ROCK i PAK (Arber et al., 1998; Chernoff, 1999; Yang et al., 1998). Aquestes proteïnes són efectores de les *small GTPases* Rho i Rac, respectivament (revisat a Burrigge and Wennerberg, 2004). Rac i

Rho pertanyen al grup de les *small GTPases* de la família de les Rho que són reguladores de l'organització del citoesquelet d'actina (revisat a Burridge and Wennerberg, 2004). Per contra, TESK1 no es regula mitjançant PAK i ROCK sinó per senyals procedents de les integrines (Toshima et al., 2001a). No obstant això, a *Drosophila* s'ha vist que l'homòleg de TESK1, *cdi*, és un efector de la *small GTPasa* Rac (Raymond et al., 2004).

La ADF/Cofilina s'activa per desfosforilació de la Ser-3. Es coneixen dues fosfatases capaces d'activar la ADF/Cofilina i són Slingshot (Ssh), altament conservada en diversos organismes (Niwa et al., 2002) i Chronophin (CIN) (Gohla et al., 2005) (Fig. In7). Aquestes dues fosfatases no es relacionen en la mateixa família de proteïnes i es requereixen de manera espacial-temporal diferent per controlar l'activitat de la ADF/Cofilina (Gohla et al., 2005). Per una banda, CIN pertany a la família de proteïnes de mamífer *non-thiol-based HAD superfamily of hydrolases* i té un paper important en la divisió cel·lular. Una sobreexpressió de CIN a cèl·lules de mamífer provoca una dissolució de l'actina cortical i de les fibres d'estrès. Per contra, una pèrdua de funció de CIN fa augmentar l'actina polimeritzada (Gohla et al., 2005). Es coneix almenys un orthòleg de CIN a *Drosophila* de funció encara desconeguda. En canvi, Ssh es va descobrir a *Drosophila* com a regulador de la morfogènesi cel·lular, i es va demostrar que en cèl·lules de mamífer era capaç de desfosforilar la ADF/Cofilina (Niwa et al., 2002). La seva pèrdua de funció fa augmentar el nivell de filaments d'actina polimeritzada, tant en cultiu cel·lular com a nivell dels discs imaginals de la larva de *Drosophila*. També s'ha demostrat que Ssh és capaç de revertir els efectes sobre la polimerització d'actina provocats tant per la LIMK com per TESK1 (Niwa et al., 2002). Fenotípicament, la pèrdua de funció de *ssh* causa defectes en la morfologia dels pèls de l'ala de la mosca i una rugositat a l'ull (Niwa et al., 2002). Pel que fa al desenvolupament del disc imaginal d'ull a *Drosophila*, Ssh es localitza en els dominis apicals dels fotoreceptors en desenvolupament, colocalitzant amb l'expressió del receptor Sev. I a més, la seva localització és depenent de Sev i de Egfr però independent de Boss (Rogers et al., 2005).

Organització epitelial i Polaritat apico-basal

Un epiteli és una unió lateral de cèl·lules que tenen una diferenciada polaritat en el pla apico-basal. *Drosophila* ha servit per identificar molts dels factors que mantenen íntegra la polaritat epitelial, i s'ha vist que la majoria dels components responsables de generar aquesta polaritat estan associats al domini apical de la membrana plasmàtica. Dins el marc d'un epiteli, cada cèl·lula es divideix en dos dominis: el domini baso-lateral serveix per l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu, i el domini apical que es caracteritza per ser un domini lliure anomenat zona marginal (MZ) a *Drosophila* (o *tight junctions* en

vertebrats) (revisat a Schock and Perrimon, 2002). El conjunt de les unions cel·lulars en l'epiteli de *Drosophila* són (revisat a Tepass et al., 2001) (Fig. In8):

- les unions adherents (AJ), que són les primeres a formar-se
- les unions septades (SJ), que es troben just a la part basal de les unions adherents i es proposa que formen un complexe bioquímic que controla la segregació dels dominis apical i baso-lateral de la membrana.
- les unions gap (GJ) que formen canals intercel·lulars per permetre el pas d'ions i petites molècules entre cèl·lules
- les unions hemiadherents (HAJ), també anomenades contactes focals que connecten el citoesquelet d'actina amb la membrana cel·lular per formar els contactes amb la matriu extracel·lular.

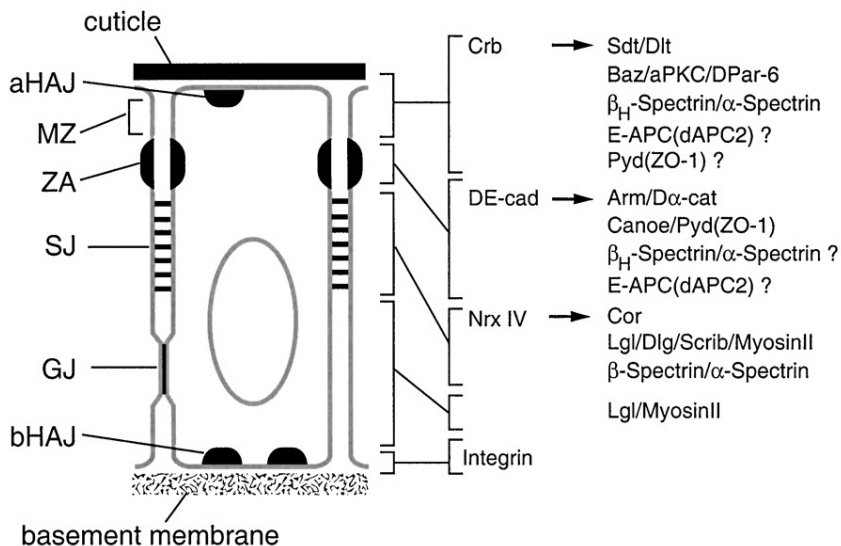


Fig. In8. Conjunt de les unions cel·lulars en una cèl·lula epitelial de la larva de *Drosophila* (adaptat de Tepass et al., 2001).

Les unions adherents es localitzen a la part basal del compartiment apico-lateral de la cèl·lula just per sota de la zona marginal, i la seva funció principal és la de vincular el citoesquelet d'actina entre les cèl·lules veïnes de manera Ca^{2+} depenent (revisat a Tepass et al., 2001). Aquestes connexions cel·lulars es componen bàsicament de cadherines i catenines. La DE-cadherina té varis dominis extracel·lulars que serveixen per mantenir el contacte entre cèl·lules, i també conté dos dominis citoplasmàtics, un per unir-se a la β -catenina (o Armadillo a *Drosophila*) i l'altre per contactar amb la p120-catenina que s'uneix al citoesquelet d'actina mitjançant la α -catenina (Fig. In9). Per la formació de les unions adherents es requereix de l'acció de tirosina quinases i de la

família de les Rho *small GTPases*. Com ja s'ha esmentat, la zona marginal a *Drosophila* es localitza a la part més apical de les cèl·lules, just per sobre de les unions adherents. Aquesta zona més apical està formada per l'acumulació de dos complexos proteics: el complex de Crumbs; Stardust i Discs lost (revisat a Tepass, 2002; revisat a Tepass et al., 2001) i el complex Bazooka/Par-3, atypical protein kinase C i Par-6 (revisat a Tepass et al., 2001). Aquests complexos són importants per tal de generar la polaritat epitelial i en especial, per establir la formació i posició de les unions adherents (revisat a Tepass et al., 2001).

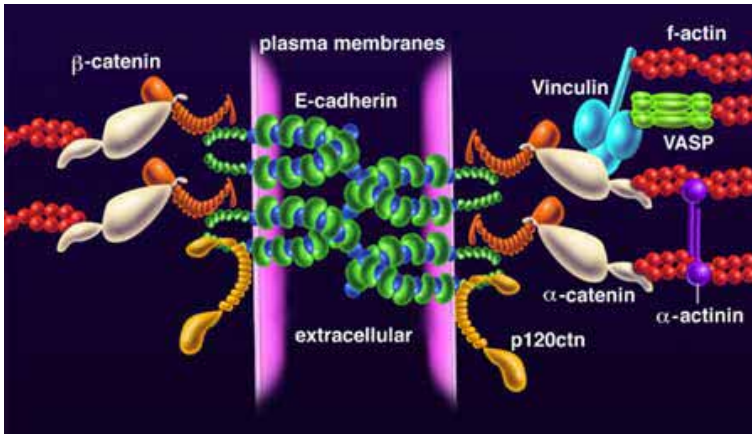
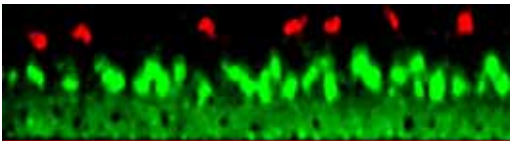


Fig. In9. Components de les unions adherents

Tot aquests tipus d'unions cel·lulars, i en especial les unions adherents, estan íntimament lligades al desenvolupament del disc imaginal d'ull de *Drosophila*. Prèviament als processos de determinació cel·lular, es produeixen uns canvis en la forma i la polaritat del cèl·lules que es recluten en el grup de cèl·lules de l'omatidi en desenvolupament (revisat a Wolff and Ready, 1993). Un dels processos més importants per mantenir aquestes cèl·lules en contacte és la sobreactivació dels factors de les unions adherents. Així, a la superfície apical s'acumula una gran quantitat de proteïnes com la DE-cadherina i la beta-catenina. El manteniment d'aquests contactes permet a les cèl·lules estar preparades per rebre els estímuls destinats a la seva determinació cel·lular.

En la present Tesi Doctoral s'ha profunditzat sobre la funció del gen *cdi* en el disc imaginal de l'ull, i s'ha demostrat que *cdi* és un factor implicat en el manteniment de la integritat epitelial.



OBJECTIUS

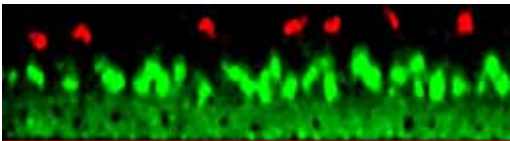
En un *screening* genètic es va identificar el gen *cdi* com a possible candidat a ser un regulador negatiu de la via de Sevenless, encarregada de determinar el fotoreceptor R7 en l'omatidi de *Drosophila*. *cdi* codifica per una serina/treonina quinasa amb funcions en la reorganització del citoesquelet d'actina. Aquesta Tesi Doctoral té com a **objectiu principal** estudiar com es coordinen les reorganitzacions epitelials i els canvis en l'arquitectura cel·lular per regular la via de transducció del senyal de Sev.

Així, els **objectius concrets** són:

1-Analitzar la funció de *cdi* a l'ull de *Drosophila* a través de:

- validar que *cdi* és un regulador negatiu de la via de Sev
- estudiar el patró d'expressió de *cdi* en el disc imaginal d'ull
- analitzar els fenotips de guany i de pèrdua de funció de *cdi* en l'organització epitelial de l'ull

2-Analitzar si TESK1 en cèl·lules en cultiu de mamífer regula l'activació d'altres receptors tirosina quinasa que senyalitzen a través de la via Ras/MAPK.



RESULTS

CAPÍTOL 1

Article

Sesé, M., Corominas, M., Stocker, H., Heino, T.I., Hafen, E. i Serras, F. *The Cdi/TESK1 kinase is required for Sevenless signaling and epithelial organization in the Drosophila eye.*

J Cell Sci. 2006 Dec 15;119(Pt 24):5047-56.

Resum

El desenvolupament de l'ull de *Drosophila* és un excel·lent model per estudiar la coordinació de comportaments cel·lulars tals com la comunicació cèl·lula-cèl·lula, l'organització epitelial i la reorganització de la forma cel·lular durant el desenvolupament. En el disc imaginal d'ull, la polimerització localitzada d'actina a la superfície apical de les cèl·lules epitelials és necessària per contraure-les en aquests dominis i mantenir l'estructura de l'omatidi en desenvolupament. La identitat de cada fotoreceptor dins l'omatidi es determina per contactes entre cèl·lules que impliquen el desencadenament dels fenòmens de transducció de senyals. El fotoreceptor R7 requereix de l'activitat del RTK Sevenless per tal d'adoptar el seu destí neuronal. Es va realitzar un *screening* genètic per la cerca de reguladors negatius d'aquest procés inductiu i es va identificar el gen *center divider (cdi)* que suprimia el fenotip d'una activació constitutiva del receptor Sev. *cdi* codifica per una serina/treonina quinasa homòloga a la proteïna de mamífers Testis specific quinase 1 (TESK1), que és un membre de la família de les quinases LIMK encarregades del control del citoesquelet d'actina mitjançant la fosforilació de la ADF/Cofilina. En aquest treball hem analitzat els efectes del guany i la pèrdua de funció de *cdi* i hem observat alteracions en l'organització del citoesquelet d'actina i de les proteïnes β -catenina i DE-cadherina del complex de les unions adherents, així com també la localització apical de Sev queda alterada. A part, una pèrdua de funció hipomorfa de la fosfatasa Ssh que activa la ADF/Cofilina, i que per tant antagonitza la funció de *cdi*, també suprimeix la via de transducció de senyal desencadenada per l'activació constitutiva de Sev. Els nostres resultats posen de manifest que hi ha una relació entre la localització de les molècules implicades en l'arquitectura epitelial i la transducció del senyal.

The Cdi/TESK1 kinase is required for Sevenless signaling and epithelial organization in the *Drosophila* eye

Marta Sesé¹, Montserrat Corominas¹, Hugo Stocker², Tapio I. Heino³, Ernst Hafen² and Florenci Serras^{1,*}

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

²Institute for Molecular Systems Biology, ETH Zürich, c/o Zoologisches Institut, Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, 8057 Zürich, Switzerland

³Institute of Biotechnology and Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland

*Author for correspondence (e-mail: fserras@ub.edu)

Accepted 10 October 2006

Journal of Cell Science 119, 5047-5056 Published by The Company of Biologists 2006

doi:10.1242/jcs.03294

Summary

How cellular behaviors such as cell-to-cell communication, epithelial organization and cell shape reorganization are coordinated during development is poorly understood. The developing *Drosophila* eye offers an ideal model system to study these processes. Localized actin polymerization is required to constrict the apical surface of epithelial cells of the eye imaginal disc to maintain the refined arrangement of the developing ommatidia. The identity of each photoreceptor cell within the epithelium is determined by cell-to-cell contacts involving signal transduction events. The R7 photoreceptor cell requires the activity of the Sevenless RTK to adopt a proper cell fate. We performed an EP screen for negative regulators of this inductive process, and we identified the serine/threonine kinase Center divider (*cdi*) as a suppressor of the phenotype

caused by an activated Sevenless receptor. Cdi is homologous to the human testis-specific kinase 1 (TESK1), a member of the LIM kinases involved in cytoskeleton control through ADF/cofilin phosphorylation. We have analyzed the effects of gain- and loss-of-function of *cdi* and found alterations in actin organization and in the adherens junctions proteins DE-cadherin and β -catenin, as well as in Sevenless apical localization. Interference with the function of the ADF/cofilin phosphatase Slingshot (*ssh*), which antagonizes Cdi, also results in a suppression of signaling triggered by the Sevenless RTK. Our results reveal a critical interplay between the localization of molecules involved in epithelial organization and signal transduction.

Key words: cdi, Sevenless, Photoreceptor, Eye, Actin

Introduction

During development, epithelial tissues provide the structural framework where many morphogenetic events operate. Signaling pathways, cytoskeleton organization and cell polarity are known to be crucial for epithelial organization and cell shape in development. However, little is known about how these cellular activities are integrated to coordinate development. *Drosophila* eye development offers the possibility to study the link between signaling and cellular architecture, since cell differentiation requires cell-to-cell interactions in a tightly organized epithelium.

The organization of the *Drosophila* compound eye is initiated when a groove, called the morphogenetic furrow, sweeps the columnar epithelium of the imaginal disc from posterior to anterior (Ready et al., 1976; Wolff and Ready, 1991) and leaves the determined R8 photoreceptor founder cell behind it. The R8 photoreceptor precursor progressively recruits the other precursors of photoreceptor cells in an inductive event essentially triggered by the activation of the Ras/MAPK pathway mediated by the induction of the epidermal growth factor receptor (DER). The activation of the DER is sufficient to recruit R1 to R6 photoreceptors (Freeman, 1996) but the R7 photoreceptor cell requires the additional activation of a second receptor tyrosine kinase (RTK), the Sevenless (Sev) receptor (Tomlinson and Ready, 1986; Hafen

et al., 1987; Basler and Hafen, 1988). In *sev* mutants, each R7 precursor cell fails to adopt a neuronal cell fate and assumes the cone cell fate instead (Tomlinson and Ready, 1986). *sev* is transiently expressed in a subpopulation of ommatidial precursor cells, the *sevenless* equivalence group (the precursors of R3, R4, R7, R1, R6 and cone cells), but is exclusively required in R7 (Tomlinson et al., 1987; Banerjee et al., 1987). The Sev RTK protein is mostly localized in the apical region of these cells where cell-to-cell contacts with the R8 founder cell occur (Banerjee et al., 1987; Tomlinson et al., 1987). The ligand of Sev RTK is the seven-pass transmembrane protein Bride of sevenless (Boss), which is localized in the apices of the R8 cell (Reinke and Zipursky, 1988; Hart et al., 1990). The precise spatio-temporal expression and localization of Boss is a prerequisite for the R7-precursor to activate the Sev RTK and assume the R7 fate (Van Vactor et al., 1991).

Photoreceptor cells are specified in an epithelium where the apical surfaces are tightly packed and constricted, probably to concentrate the receptors for signaling events (Tomlinson and Ready, 1987; Wolff and Ready, 1991). The intercellular junctional complex of the arthropods includes adherens junctions located at the most apical position on the lateral cell membrane (Woods et al., 1997). Adherens junctions hold epithelial cells together and provide strong mechanical attachments between adjacent cells. They are built of

cadherins, which are transmembrane proteins whose intracellular segments bind to catenins connected to actin filaments (reviewed by Tepass et al., 2001). Regulators of the apical-basal polarity and the integrity of the adherens junctions, have a distinct role in photoreceptor morphogenesis (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Moreover, some elements associated with structural components of the cell appear to be required for R7 fate. For example, the membrane skeleton protein β H-spectrin, which in its tetrameric form crosslinks actin, is essential for the correct development of R7, as mutants for β H-spectrin result in missing R7 (Thomas et al., 1998).

The epithelial organization requirement for photoreceptor specification can be bypassed by the constitutive activation of signal transduction pathways. A gain of Sev function (*sev^{S11}*) was achieved by overexpressing an N-terminally truncated Sev protein under the control of the duplicated *sev* enhancer fragment. This construct lacks most of the extracellular domain and ensures the temporal and spatial expression pattern of *sev* (Basler et al., 1991). This constitutive activation of Sev is sufficient to specify R7 cell fate not only in the R7 precursor but also in other cells of the equivalence group, resulting in rough eye phenotype (Basler et al., 1991).

In a sensitized misexpression screen for EP lines modifying the rough eye phenotype of *sev^{S11}*, we found *center divider* (*cdi*) as a suppressor. *cdi* encodes a serine/threonine kinase orthologous to mammalian testis-specific kinase 1 (TESK1) (Matthews and Crews, 1999). The protein kinase domain of TESK1 is structurally similar to domains of LIMK1 (Toshima et al., 1995) and stimulates the formation of actin stress fibers and focal adhesions through phosphorylation of F-actin depolymerizing factor ADF/cofilin (Toshima et al., 2001a). ADF/cofilin is reversibly activated by phosphatases and inhibited by kinases (Niwa et al., 2002; Ghosh et al., 2004; DesMarais et al., 2005; Gohla et al., 2005). We show that Cdi is required for the correct signaling activity of the Sev pathway as well as for the cellular organization of the developing eye. This work provides evidence for a link between signaling and cytoskeletal organization and polarity of the epithelium, which act in conjunction to fine tune the signal transduction events that lead to the specification of photoreceptor cells.

Results

cdi as a suppressor of the activated Sevenless pathway

To identify negative regulators of the Sev RTK-activated signaling pathway, we carried out a misexpression screen for genes that suppress a rough eye phenotype caused by the constitutively activated form of the Sev receptor, *sev^{S11}*. This activated form, which is expressed in *sevenless* equivalence group cells, resulted in a characteristic rough eye of irregular ommatidia due to extra R7 photoreceptors per ommatidium (Basler et al., 1991). We tested 5000 fly lines containing random insertions of a double-headed enhancer-promoter (EP) element carrying 3'UAS and 5'UAS sites that permit the transcription of genes flanking the insertion in response to Gal4 (Fig. 1C). Flies carrying both the *sev^{S11}* construct and the *sev-Gal4* driver were crossed to those EP lines. Several independent lines were identified as suppressors of the activated Sev pathway, among them *EP(33-077)*, *EP(44-004)* and *EP(34-165)* that clustered in the 91F region of the third chromosome very close to each other (Fig. 1A-B). To

determine whether the suppression was due to the EP insertion site, each EP line was crossed to *sev^{S11}* flies in the absence of *sev-Gal4*, and no suppression could be observed (Fig. 1D). Then, for each EP line, the 5' UAS site was excised by Cre-loxP-mediated recombination to yield a single-headed *EP(y⁻)* element (Fig. 1C). The resulting *EP(44-004y⁻)* and *EP(34-165y⁻)* lines were still strongly suppressing the *sev^{S11}* rough eye phenotype (Fig. 1D). Three genes are located in the vicinity of the EP insertion sites: *ATP synthase, subunit d* (*ATPsyn-d*), *mitochondrial ribosomal protein L55* (*mRpL55*) and *center divider* (*cdi*) (Fig. 1E). However, all three EP lines were oriented with the 3' UAS site driving the expression of both *mRpL55*, which has been described as a ribosomal protein implicated in cell cycle progression (Dimova et al., 2003), and *cdi*, which is expressed in the embryonic midline of the *Drosophila* central nervous system (Muralidhar et al., 1993; Matthews and Crews, 1999). To corroborate transcriptional induction of both genes through the EPs, we tested the EP lines by RT-PCR after activation of a heat shock driven Gal4, and found an increase of the transcription of both *cdi* and *mRpL55* genes in double and single-headed EP lines (Fig. 1F), whereas *ATPsyn-d*, which is in opposite orientation, did not show any change of expression (not shown).

Since those two genes in tandem were activated by the EPs, we used *UAS-cdi* and *UAS-mRpL55* transgenes to find out which of them is responsible for the suppression or whether they both contribute to it. We found that *UAS-cdi* recapitulated the suppression of *sev^{S11}* phenotype, whereas *UAS-mRpL55* did not. In the absence of *UAS-cdi* activation, the average of the number of R7 cells per ommatidium was 4.3, and this number dropped to 3.3 in the presence of the *sev-Gal4* driver (Fig. 2A).

To exclude some contribution of *mRpL55*, *UAS-mRpL55* construct was activated together with *UAS-cdi* and no enhancement of the *sev^{S11}* suppression was observed (data not shown). To determine whether both the EP lines and the *UAS-cdi* are capable of driving expression of the Cdi protein, we activated them with an *en-Gal4* line in the wing disc and found strong Cdi localization in the posterior compartment after staining with anti-Cdi (Fig. 1G,H).

To examine the specificity of *cdi* as a suppressor of the *sevenless* pathway, we used *UAS-boss* as an independent construct to activate the signaling pathway. Overexpression of the ligand Boss in the *sevenless* equivalence group cells results in an expanded ligand-receptor interaction and therefore more R7 cells in 80% of the ommatidia (Fig. 2B) with an average of 2.7 R7 cells per ommatidium. When we overexpressed *cdi* in this context, even with only one copy of the *UAS-cdi* transgene, we observed that the average number of R7 per ommatidium dropped to 1.9 (Fig. 2B). In some of these ommatidia no R7 was detected (<5% in Fig. 2B), which suggests that overexpression of *cdi* can interfere with R7 formation. To test this, we analyzed flies carrying *sev-Gal4 UAS-cdi* constructs in a wild-type background and found that in 3% of the ommatidia the R7 cell was absent (inset in Fig. 2B).

To analyze *cdi* expression in the wild-type eye disc we used an antibody against the Cdi protein. At the third instar we found extensive localization throughout the eye-antenna disc. The localization of Cdi was cytoplasmic and more prominent in the apical domains of the eye disc epithelium, as seen in transverse sections of both photoreceptor precursors and surrounding cells (Fig. 3A-D). To analyze whether the

Fig. 1. The *EP(33-077)*, *EP(44-004)* and *EP(34-165)* suppression of the rough eye phenotype when *Sev* RTK signaling is activated. (A) Rough eye phenotype caused by the constitutively activated *Sev* receptor (*sev^{S11/+}*). (B) Suppression of the rough eye phenotype due to the overexpression of a double-headed EP line identified in the screen (*sev-Gal4 sev^{S11/EP}*). Note that the regular pattern of ommatidia is rescued. (C) The double-headed EP transposable element, showing the 5' and 3' UAS sites (black arrowheads). Activation of the Gal4 drives expression of the genes adjacent to 5' and 3' UAS sites. The loxP sites flanking the 5' UAS (red boxes), will remove the 5' UAS site when in the presence of the recombinase *cre*. Note that flies lacking the 5' UAS site will be distinguished by the lack of the *yellow⁺* marker and named *EP(y⁻)*. (D) Summary of the suppression of the *Sev^{S11}* construct by the three EP lines. (E) Genomic region and insertion of *EP(33-077)*, *EP(44-004)* and *EP(34-165)*. There are three genes in this region: *ATPsyn-d*, *mRpL55* and *cdi*. Black arrows indicate the transcription starts and orientation of the three genes. The *EP(33-077)* is 1.800 bp upstream from 5' UTR of *mRpL55*. They are orientated with the 3' UAS site (small blue arrows) towards the 5' end of *cdi* and *mRpL55*. The blue bar represents the 2.077 bp deletion of the *cdi^{R47}* allele. (F) Molecular characterization of the gene expression induced by the EP lines. RT-PCR from *hs-Gal4 EP* larvae after heat shock induction indicates that both *cdi* and *mRpL55* transcripts are overexpressed. *EP(34-165y⁻)* and *EP(44-004y⁻)* are shown as examples, and *rp49* expression as a control. C lanes show expression without heat shock. E lanes show expression after heat shock. (G) Wing disc from *en-Gal4/+; EP 34-165/+* larvae stained with an antibody against Cdi. Cdi protein is strongly expressed in the posterior compartment due to EP activation. (H) *en-Gal4/UAS-cdi* wing discs stained with anti-Cdi show abundant localization of Cdi in the posterior compartment.

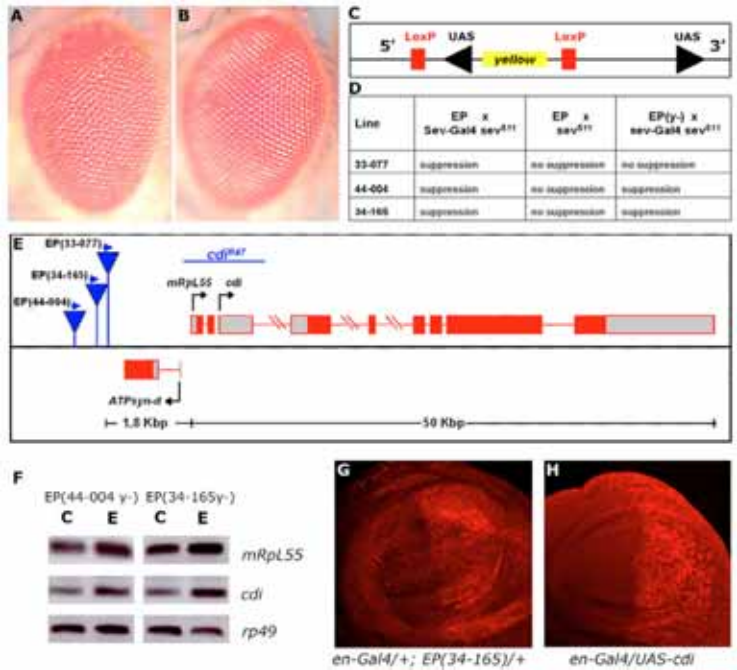
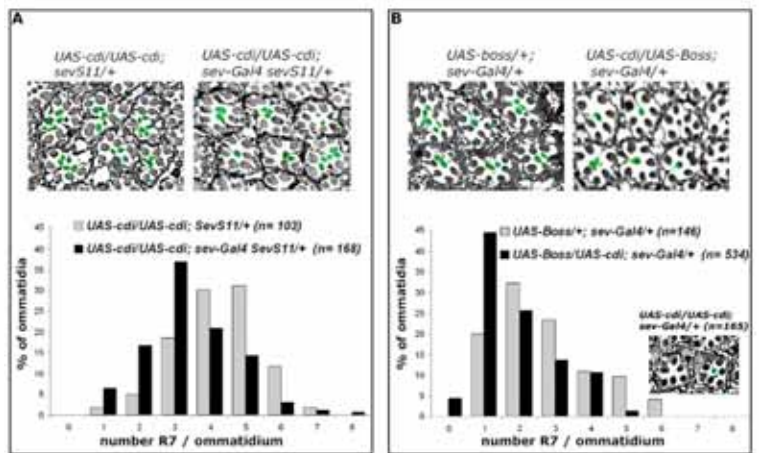


Fig. 2. *cdi* as a suppressor of the activated *Sev* pathway. (A) Semi-thin section from a control eye (left) where *UAS-cdi* is not overexpressed (*UAS-cdi/UAS-cdi; sev^{S11/+}*) and an experimental eye (right) where the *UAS-cdi* is overexpressed by *sev-Gal4* (*UAS-cdi/UAS-cdi; sev-Gal4 sev^{S11/+}*). The histogram shows distribution profiles of the number of R7 photoreceptors per ommatidium for each genotype represented. The statistical analysis reveals significant differences between the genotypes ($P < 0.001$). (B) Semi-thin section of control eye (left), where *UAS-Boss* is expressed under *sev-Gal4* (*UAS-Boss/+; sev-Gal4/+*) and experimental eyes (*UAS-cdi/UAS-Boss; sev-Gal4/+*) are shown. The histogram quantifies the number of R7 per ommatidium with and without *cdi* overexpression ($P < 0.001$). The inset below shows two ommatidia from a *UAS-cdi/UAS-cdi; sev-Gal4* fly, one with R7 (right) and one without (left). R7 rhabdomeres are colored green.



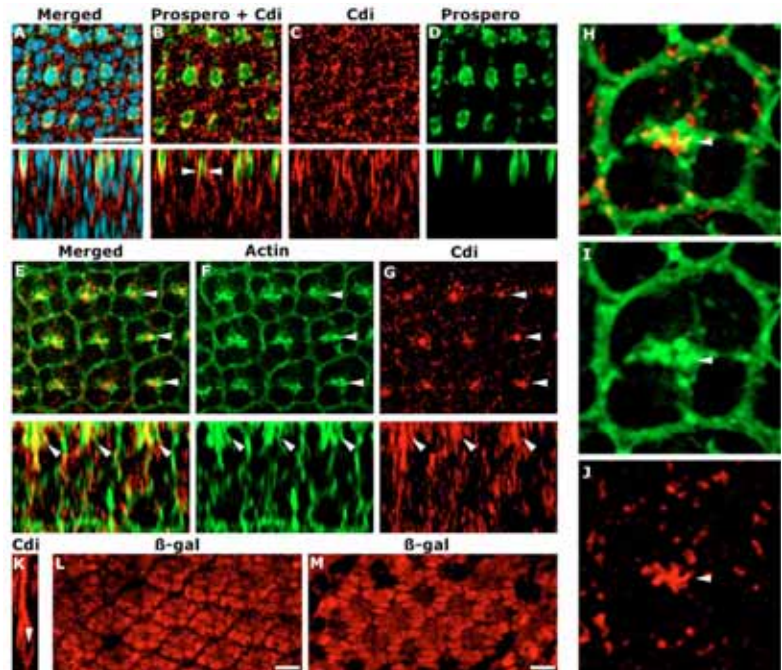


Fig. 3. *cdi* expression pattern in the eye imaginal disc. (A–D) *Cdi* pattern (red) of a disc co-stained with prospero (green). The confocal image was captured at the level of the R7 cells to discriminate from the prospero-stained cone cells. Upper panels: cross-section. Lower panels: transverse section. Arrowheads point to the localization of R7 cells. The merged figure in A also shows nuclear staining with Sytox-green (blue) to show distribution of nuclei. Note that in the transverse XZ sections (lower panels) the localization of *Cdi* is more abundant in the apical region of the epithelium (top). (E–G) Co-localization of F-actin (green) and *Cdi* (red) in the apical constrictions. Arrowheads point to apical constrictions. Upper panels: optical section taken through the most apical domain of the eye disc. Lower panels: transverse sections. (H–J) High magnification of an ommatidium of the previous image, showing *Cdi* (red) in the F-actin enriched apical constriction (green). (K) High magnification of a transverse section of a pupal photoreceptor to show cytoplasmic localization of *Cdi*. Apical: top. Arrowhead points to the nucleus. (L–M) Two confocal planes of developing ommatidia of a *cdi*^{BA01} early pupal disc stained with anti β -galactosidase. Labeling is extensive throughout the ommatidial cells. Bars, 10 μ m.

precursor of the R7 photoreceptor also expressed *Cdi*, we co-stained these discs with an antibody to the nuclear protein Prospero and detected *Cdi* in the cytoplasm of the R7 cells (Fig. 3A–D). The apical surfaces of the ommatidial cluster cells remain constricted and they are enriched with F-actin (Tomlinson et al., 1987). To examine whether these apical constrictions also contain *Cdi*, we co-stained eye discs with phalloidin and anti-*Cdi*. In addition to the cytoplasmic localization, an accumulation of *Cdi* was found in the apical tips of the clusters at late third instar and early pupal stages and this accumulation overlapped with the F-actin-rich apical constrictions (Fig. 3E–J). A transient accumulation of *Cdi* in the R8 precursor was also found in late third instar larva and early pupal stages and, as for the other photoreceptors, the subcellular localization was mainly cytoplasmic and apical (Fig. 3K). Moreover, the enhancer trap line *cdi*^{BA01}, which has previously been used to describe the *cdi* expression pattern in CNS midline cells of *Drosophila* embryos (Matthews and Crews, 1999), showed expression in all ommatidial cells of the early pupal eye (Fig. 3L,M).

cdi is required for F-actin organization and apical-basal polarity of the nascent ommatidia

To understand the suppressive effect of *cdi* on *sev*^{S11}, we examined the effects of *cdi* overexpression on actin polymerization. We tested whether the *UAS-cdi* construct was able to inhibit actin depolymerization, a function that has already been described for the mammalian gene TESK1

(Toshima et al., 2001a). To this aim, we stained actin filaments with rhodamine-labeled phalloidin, which specifically binds to F-actin at the junction between subunits. We analyzed overexpression of *cdi* in clones generated with the flip-out technique (Ito et al., 1997) and found ectopic accumulation of F-actin in the cortex of cells overexpressing *cdi* both anterior and posterior to the morphogenetic furrow (Fig. 4A–C). Posterior to the morphogenetic furrow, where the ommatidial clusters are being assembled, F-actin is enriched at the apical tips of presumptive R cells in ommatidial preclusters of wild-type eyes (Pickup et al., 2002), possibly to concentrate signaling components that promote photoreceptor determination and spatial organization (Banerjee et al., 1987; Tomlinson et al., 1987; Van Vactor et al., 1991). In *cdi*-overexpressing cells, ectopic F-actin accumulation was extensive to all cells and even more pronounced at the apical region of the interacting precursors of the photoreceptor cells (Fig. 4D–F).

The apical constrictions of the developing ommatidial clusters are also enriched with junctional complexes, such as adherens junctions (Wolf and Ready, 1993). In *cdi* overexpressing cells, we did not find significant alterations of the concentration of both DE-cadherin and β -catenin, but these junctional proteins were found mislocalized and displaced towards a more basal position. Indeed, the apical areas where F-actin accumulates in the rhabdomere region were extended basally in *cdi*-overexpressing cells concomitantly with β -catenin domain displacement (Fig. 4F–G). In sections along the

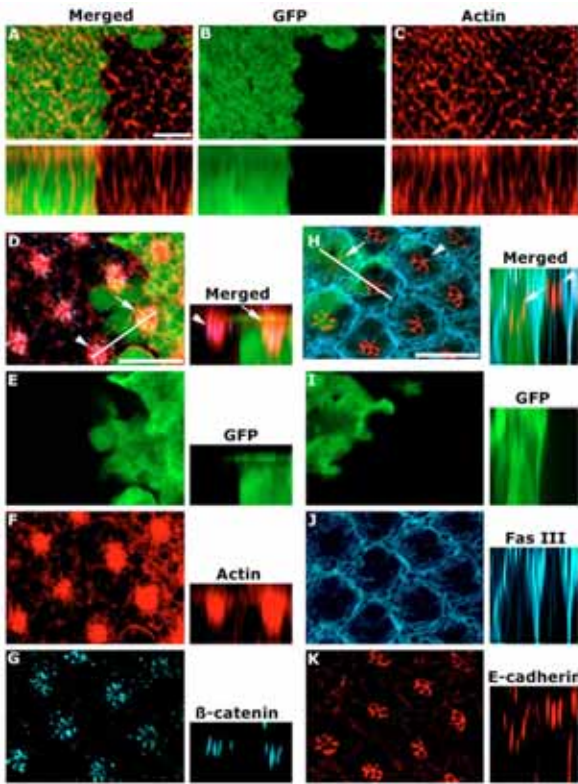


Fig. 4. Overexpression of *cdi* in eye discs. Clones of cells overexpressing *cdi* are labeled with GFP (green). (A-C) Clone anterior to the morphogenetic furrow where cells overexpressing *cdi* concentrate more F-actin (red) in the cell cortex. Upper panels show a cross-section, lower panels a transverse section. (D-G) Detail of a confocal cross-section at the apical region of developing ommatidia posterior to the morphogenetic furrow stained with phalloidin (red) and anti- β -catenin (blue). Note the F-actin accumulation in the *cdi*-overexpressing cells (F). Arrows point to a *cdi*-overexpressing ommatidial cluster and arrowhead to a wild-type cluster. Localization of β -catenin in *cdi*-overexpressing cells is displaced basally (G). Left panels: cross-sections. Right panels: transverse section through a mutant ommatidial cluster adjacent to a wild-type cluster. (H-K) Apical cross-section through ommatidial clusters stained with Fasciclin III (blue) and DE-cadherin (red). Note that the DE-cadherin of the closely apposed photoreceptor membranes in wild-type cells (arrowhead) is absent in the *cdi*-overexpressing ommatidial cluster (arrow). However, in a transverse section containing a *cdi*-overexpression cluster (arrow) next to a wild-type cluster (arrowhead), DE-cadherin is found more basally and in an abnormal arrangement (right panels). Fasciclin III, used to mark the cell contour, denotes that the *cdi*-overexpressing cluster is not shrunk or smaller. Diagonal lines in D and H indicate the region represented in the transverse sections. Bars, 10 μ m.

apical-basal axis (transverse sections), confocal planes of mutant and wild-type ommatidial clusters showed an enlargement of the F-actin-enriched domain of the cluster and the β -catenin zone was displaced to a more basal position. The DE-cadherin in ectopically expressing *cdi* cells was located more basal in comparison to adjacent wild-type cells (Fig. 4H-K).

To further explore the role of *cdi* during eye development, we studied the loss-of-function phenotypes of *cdi* using the *cdi^{R47}* allele (Fig. 1E), which was generated after excision of a P-element insertion (Matthews and Crews, 1999; Raymond et al., 2004). We have molecularly characterized this allele and found that it lacks 2.077 bp uncovering the *mRpL55* gene and the first exon of *cdi*. Homozygous *cdi^{R47}* mutant embryos are lethal at the first larval instar. RT-PCR on these larvae showed that *cdi* and *mRpL55* transcripts were absent, whereas the mRNA of the nearby gene *ATP-syn-d* was present (data not shown). We also found that clones of *cdi^{R47}* cells removed the Cdi protein (Fig. 5A-C).

To avoid side-effects of *mRpL55*, we studied the phenotypes of *cdi* mutant discs with the *cdi^{R47}* mutation in a *GMR-Gal4 UAS-mRpL55* background to complement the loss of *mRpL55*. We first analyzed mutant clones in the eye imaginal disc and observed that F-actin distribution was irregular, granulated and disorganized (Fig. 5D-F). These effects were less evident in ommatidia that were composed of mutant and wild-type cells,

especially when there was a nearby wild-type sector, which suggests a non-autonomous rescue of the overall organization. Conversely, ommatidia located in large mutant areas showed a strong perturbation of the actin network, either when the ommatidia were entirely mutant or when mosaic with few wild-type cells (Fig. 5D-F). To test whether the actin disorganization correlated with an alteration of the apical-basal polarity of the epithelium, we analyzed the localization of markers of the adherens junctions. We found that β -catenin and DE-cadherin in *cdi* mutant cells were displaced to a more basal position (Fig. 5G-J). These results show that the overall regular apical-basal organization of the photoreceptor cells is disrupted in mutant clones. To control whether these phenotypes are due to *cdi* loss-of-function, we generated clones of *cdi^{R47}* in a background overexpressing both *UAS-mRpL55* and *UAS-cdi* transgenes under a *GMR-Gal4* driver and found normal distribution of F-actin and apical localization of adherens junctions proteins (Fig. 5K-O).

Since we were unable to find *cdi^{R47}* mutant clones in adult eyes, we used Flp/FRT-driven mitotic recombination in a *Minute* background to give a proliferative advantage to the mutant cells (Morata and Ripoll, 1975). Even under these conditions, most of the adult eyes did not contain clones, and when they did, the clones were extremely reduced in size. Surviving mutant ommatidia had fewer and smaller photoreceptors than wild-type (Fig. 5P,Q). It could be that the

lethality of *cdi*^{R47} was due to the loss-of-function of *mRpl55* rather than of *cdi*, as it has been shown that *mRpl55* is required for cell viability in early embryos and pupal stages, and for cell cycle progression (Tselykh et al., 2005; Dimova et al., 2003). However, it has been described that mitotic clones of mutant *mRpl55* in the eye disc grow similarly to the corresponding wild-type twin clones, although mutant clones in the adult eye are absent (Tselykh et al., 2005). Thus the effects on viability in the adult eye could also be due to the lack of *mRpl55* during pupal stages, whereas it is likely that *cdi* is required for

viability already at the larval stages. Indeed, clones of *cdi*^{R47} in a *UAS-mRpl55* background resulted in autonomous cell death, as assayed with cleaved caspase-3 antibody (Fig. 5R-T). Together these findings suggest that loss-of-function of *cdi* results in actin depolymerization and alteration of the epithelial condition, as inferred from adherens junctions markers, and that *cdi* mutant cells are eliminated from the epithelium through cell death.

Actin turnover and signaling in ommatidial clusters

As mentioned above, *cdi* and LIMK phosphorylate ADF/cofilin to inactivate it and inhibit actin depolymerization. Conversely, ADF/cofilin is activated by dephosphorylation, which depends on the activity of a family of cofilin phosphatases such as *slingshot* (*ssh*). The loss-of-function of *ssh* causes F-actin accumulation (Niwa et al., 2002). If the gain-of-function of *cdi* is responsible for the perturbation of the signal transduction required for R7 specification, it should

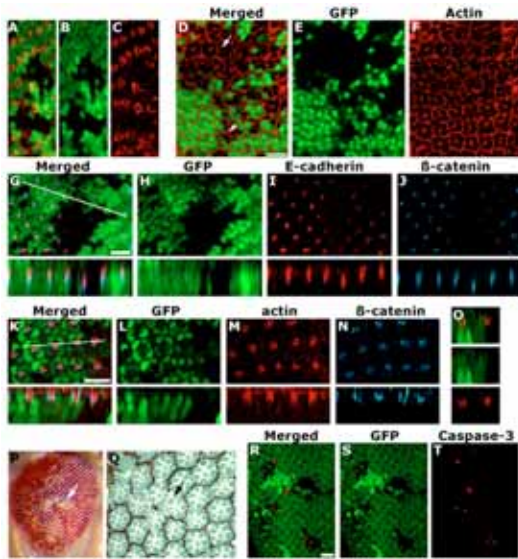


Fig. 5. Loss of *cdi* function in the developing eye. (A-C) Clones of *cdi*^{R47} (lack of GFP in A and B) show a lack of Cdi expression as assayed by anti-Cdi (red in A and C). The confocal image was taken at the level of inner photoreceptors of a late third instar larva where a transient accumulation of Cdi is found. (D-F) Mitotic clones of homozygous *cdi*^{R47} cells (lack of GFP). All these clones were supplied with *UAS-mRpl55* under *GMR-Gal4* driver. Actin organization is severely altered in mutant ommatidia (arrow). Clones containing both wild-type and mutant cells appear normal (arrowhead). (G-J) Clone of *cdi* mutant cells (lack of GFP) counterstained with anti- β -catenin (blue) and anti-DE-cadherin (red). A single confocal cross-section (upper panels) taken at the level of the adherens junctions of the wild-type cells. Note that in this level of the mutant sector, both proteins are absent. Transverse section (lower panels) where β -catenin and DE-cadherin are aberrantly positioned. (K-N) Clones of *cdi*^{R47} cells (lack of GFP) complemented with the double transgene *UAS-mRpl55* and *UAS-cdi* under the *GMR-Gal4* driver and stained for phalloidin (red), and β -catenin (blue). (O) Transverse section of another clone (lack of GFP) as in K stained with DE-cadherin (red). Top, merged; middle, GFP; bottom, DE-cadherin. (P) Eye of a fly showing *cdi*^{R47} mutant clones (white sectors, arrow) in *Minute*⁺ background. (Q) Semi-thin section of a mosaic eye, showing a clone of *cdi*^{R47} mutant ommatidia (absence of inter-ommatidial pigmentation; arrow points to mutant cells). (R-T) Clones of *cdi*^{R47} supplied with *UAS-mRpl55* and stained with anti-caspase-3. Thin lines represent the plane of transverse sectioning. Bars, 10 μ m.

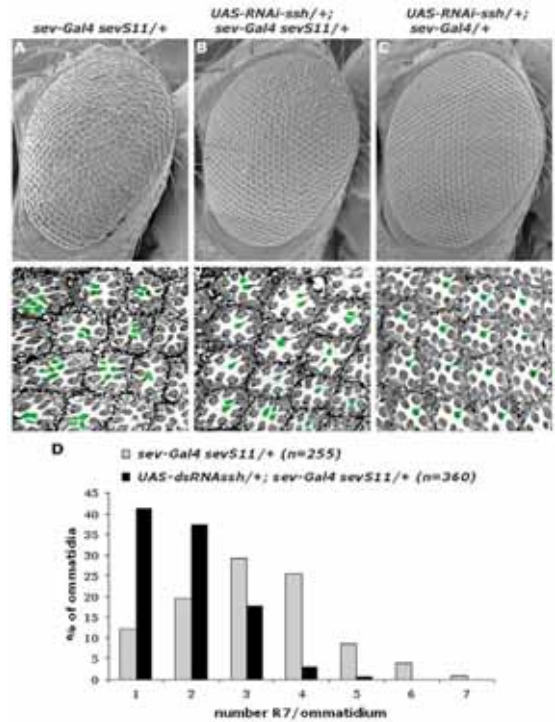


Fig. 6. *ssh* suppression of the activated Sev pathway. (A) Rough eye phenotype due to the *sev*^{S11} construct (*sev-Gal4 sev*^{S11/+}). (B) Suppression of the *sev*^{S11} rough eye phenotype when *UAS-RNAi-ssh* is activated (*UAS-RNAi-ssh/+; sev-Gal4 sev*^{S11/+}). (C) The activation of the transgene (*UAS-RNAi-ssh/+; sevGal4*) does not alter eye morphology. Upper panels: SEM images. Lower panels: tangential semi-thin sections with R7 photoreceptors colored green. (D) The histogram shows distribution profiles of the number of R7 photoreceptors per ommatidium for each genotype represented. The statistical analysis reveals significant differences between the genotypes ($P < 0.001$).

be possible to mimic the suppression of R7 by inhibiting *ssh* function.

Actin turnover mediated by *ssh* seems to be essential for ommatidial assembly and *ssh*-null mosaic clones in the developing ommatidia of the third instar eye disc show apical accumulation of F-actin (Rogers et al., 2005). We tested whether the loss-of-function of *ssh* behaves similar to the gain-of-function of *cdi* in a background of activated Sev signaling. We generated flies containing the activated *sev^{S11}* construct and a *UAS* double-strand *RNAi-ssh* driven by *sev-Gal4*. In contrast to the use of loss-of-function mutants (Rogers et al., 2005), the activation of inducible RNAi did not alter eye morphology on its own (Fig. 6C), possibly due to a partial interference of *ssh* mRNA. In the *sev^{S11}* genetic background, the *sev-Gal4*-driven expression of *UAS-RNAi-ssh* resulted in suppression of the rough eye phenotype and a reduction of the number of extra R7 per ommatidium with an average of 1.8 R7 cells per ommatidium in contrast to 3.1 in controls (*sev-Gal4 sev^{S11}*), recapitulating the effects observed with overexpression of *cdi* (Fig. 6A,B). Similarly, the ADF/cofilin *tsr²/tsr^{mf}* hypomorphic heteroallelic combination also suppressed the *sev^{S11}* rough eye phenotype albeit weakly (2.7 R7 per ommatidium of *tsr²/tsr^{mf}*; *sev^{S11}* eyes; results not shown).

It has been shown that *ssh* co-localizes with the Sev RTK at the apical tips of the *sevenless* equivalence group, and that the distribution of Ssh is controlled by Sev. Interestingly, *ssh* null clones result in some, though slight, effects on the position of Sev in the equivalence group (Rogers et al., 2005). This opens the possibility that the localization of Sev could be fine-tuned by the Ssh and Cdi balance that drives actin organization, and that a shifting of the localization of the receptor could affect the transduction of the signal. The receptor Sev is also tightly localized at the apical tips of the *sevenless* equivalence group (Tomlinson et al., 1987), similarly to Boss in the tips of the R8 cells (Reinke and Zipursky, 1988). We explored whether

alterations of *cdi* expression resulted in mislocalization of Sev RTK. To this aim, we generated gain- and loss-of-function clones of *cdi* and analyzed the distribution of Sev RTK protein along the apical-basal axis of the developing ommatidia. Clones ectopically expressing *cdi* showed an aberrant distribution of Sev, rather than fully apical (Fig. 7A-D). The loss of *cdi* function resulted in more severe defects, such as isolated particle distribution rather than concentrated at the apical tip (Fig. 7E-G) or low Sev RTK concentration, possibly due to cells entering apoptosis (Fig. 5R-T).

Discussion

We have identified *center divider* (*cdi*) in a misexpression screen for genes suppressing the rough eye phenotype induced by the gain-of-function of Sev RTK. The use of a *UAS-cdi* transgene confirmed the involvement of *cdi* in the *sev^{S11}* suppression. Moreover, the suppression of the Sev pathway by *cdi* observed when Boss ligand is overexpressed provides further evidence that *cdi* plays a role in modulating this pathway. *cdi/TESK1* kinases are required for the phosphorylation dependent inhibition of ADF/cofilin, and therefore inhibiting actin filament depolymerization (Toshima et al., 2001a). The results presented here illustrate that alterations of *cdi* expression result in a perturbation of the cortical F-actin network and the adherens junction complex, as DE-cadherin and β -catenin and ultimately the Sev RTK are mislocalized. Both adherens junction proteins are displaced when *cdi* is overexpressed but also when *cdi* is downregulated. This suggests that for the correct positioning of the apical adherens junctions in developing eye cells a balance between actin polymerization and depolymerization is required and that *cdi* is a key player in the regulation of that balance. We have also shown that the loss-of-function of *ssh*, which is the phosphatase responsible for the activation of ADF/cofilin, is suppressing the *sev^{S11}* phenotype.

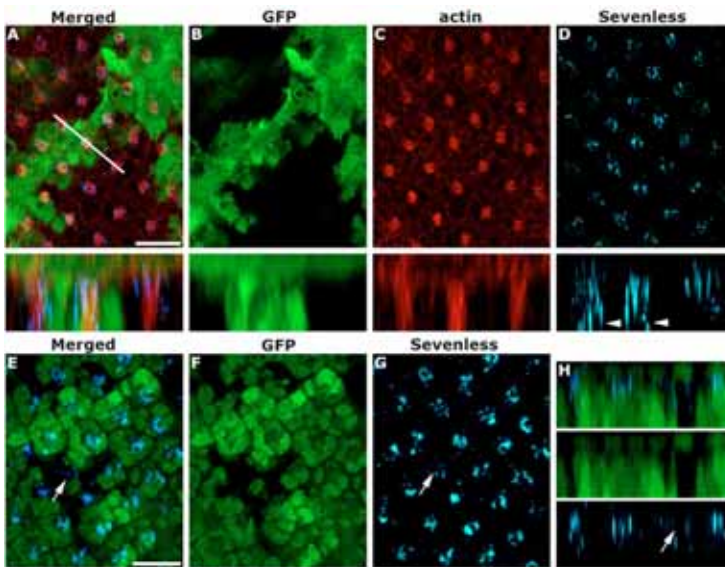


Fig. 7. Sev RTK localization in *cdi* gain- and loss-of-function clones. (A-D) Upper panels show a cross-section confocal image of *cdi* gain-of-function clones labeled with GFP (green) and F-actin (red). Lower panels show a transverse section of the same preparation taken through the region indicated with the white line in A. Sev RTK protein (blue) localization is extended to a more basal position in the mutant ommatidia (arrowheads). (E-G) Loss-of-function clone marked by the absence of GFP. Note that in some mutant ommatidia (arrow) Sev RTK (blue) staining is lower than in the wild-type. (H) Transverse sections of a loss-of-function clone where the Sev RTK staining (blue) of the apical membrane (arrow) is reduced. Bars, 10 μ m.

cdi has been identified in several genetic screens to search for genes involved in neural development and signaling. *cdi* has also been found in an enhancer trap screen undertaken to identify genes involved in the embryonic central nervous system owing to its expression in all CNS midline primordial cells of the young embryo (Matthews and Crews, 1999; Kearney et al., 2004). Also an EP misexpression screen for genes that perturb axon guidance and synaptogenesis has revealed *cdi* as a candidate (Kraut et al., 2001). A screen for modifiers of activated RacGAP(84C) or its GTPase-activating protein (GAP) domain identified *cdi* as an effector of Rac1 (Raymond et al., 2004). The ectopic expression of *cdi* also suppresses the rough eye phenotype caused by the loss of rhabdomeres, abnormal photoreceptor cells and polarity defects, induced by a dominant negative form of the small GTPase Rac1, RacN17 (Raymond et al., 2004). Moreover, the mammalian homolog TESK1 has been shown to be activated upon matrix adhesion and is regulated by binding of 14-3-3 protein and sprouty4 (Toshima et al., 2001b; Tsumura et al., 2005). TESK1 has been isolated in a two-hybrid screen as a partner of sprouty 4, and the TESK1-sprouty4 interaction has been confirmed by co-immunoprecipitation (Leeksa et al., 2002). In *Drosophila* *sprouty* acts as a negative regulator of the Ras/MAPK signaling pathway (Caschi et al., 1999; Reich et al., 1999; Kramer et al., 1999), and it is thought that its mammalian homolog will act similarly (Leeksa et al., 2002). This raises the possibility that *cdi/TESK1* could act as a crosstalk between Ras/MAPK and small GTPase signaling cascades.

The overall organization of the epithelium in the developing eye undergoes cellular rearrangements from late third instar to pupal stages (Cagan and Ready, 1989). This includes cell shape changes that transform the single layered epithelium into the functional assembly of all cells in the adult ommatidia. These rearrangements are tightly associated with an axial actin cytoskeleton in the rhabdomeral microvilli, which extends into the cytoplasm of the photoreceptor cells (Arikawa et al., 1990; Drenckhahn and Dermietzel, 1988). Depletion of F-actin in *hindsight* mutant eyes is associated with abnormal photoreceptor morphology and apical-basal polarity (Pickup et al., 2002). Furthermore, cells mutant for *twinstar*, which encodes the fly homolog of ADF/cofilin, produce planar cell polarity defects in the developing eye (Blair et al., 2006). The link between morphogenesis and cytoskeleton that establishes the regular ommatidial architecture has been thoroughly studied for elements of the adherens junctions. An example is *canoe*, a PDZ-domain protein homologous to the mammalian AF-6/afadin that binds to actin filaments (Yamamoto et al., 1997; Mandai et al., 1997) and is associated with the cytoplasmic side of the adherens junctions (Matsuo et al., 1999). *Canoe* protein is involved in the fine-tuning of Ras1 activity by direct binding to the N-terminus of Ras1 (Matsuo et al., 1997). Adherens junctions are necessary for ommatidial architecture as overexpression of the *canoe* transgene driven by the *sevenless* enhancer causes split or missing photoreceptors (Matsuo et al., 1999), and both loss-of-function and ectopic expression can induce aberrant ommatidial orientation (Gaengel and Mlodzik, 2003). Also β H-spectrin, which tightly co-localizes with DE-cadherin, is essential for the production of R7 (Thomas et al., 1998).

The suppression of the ligand-independent activation of the Sev pathway by *cdi* shown here suggests that cytoarchitecture

rearrangements due to ectopic *cdi* impede the straight intracellular transduction of the signal. The localization of the receptor, or of a downstream transduction protein such as Son of Sevenless (Sos) or Ras, is essential for the reliability of the pathway (reviewed in Ebisuya et al., 2005). Because no obvious suppression of the activated Ras or Raf constructs by *cdi* overexpression was observed (data not shown), we propose that the cytoskeletal organization targets either the anchoring of the receptor or of a protein interacting with the receptor. Recent findings show that glutamate receptors, in the fly neuromuscular junction, are anchored to the actin cytoskeleton by the Coracle protein, as disruption of actin or Coracle results in depletion of A-type receptors (Chen et al., 2005a). Also the multidomain scaffold protein Paxillin facilitates the formation of the Raf-MEK-ERK complex at the focal adhesions, where actin filament ends are anchored, as described for hepatocyte growth factor (HGF)-stimulated epithelial cells (Ishibe et al., 2003). In *Drosophila*, the *paxillin* overexpression phenotype is rescued by ectopic *cdi* and *cdi* has been identified as a target of *paxillin*-mediated Rho GTPase regulation (Chen et al., 2005b). Because Cdi-mediated actin arrangements affect Sev RTK localization and function, we propose that the reliability of the Sev RTK signaling pathway is dependent on cytoskeleton and adherens junctions, illustrating how the truthful integration of cell structure, adhesion and signaling is necessary for normal development.

In wild-type discs, F-actin is enriched at the apical tips of presumptive R cells. This apical F-actin forms part of a tightly localized signaling complex enriched for receptor and ligand molecules, such as Sev RTK (Banerjee et al., 1987; Tomlinson et al., 1987) and Boss (Van Vactor et al., 1991), as well as other interacting molecules such as Delta-Notch (Fehon et al., 1991; Kooh et al., 1993). Interestingly, the ligand-independent activation of Sev RTK *sev^{ST1}* in the subpopulation of ommatidial cells also shows localization of the activated tyrosine kinase domain in the apical region of the cells, similarly to wild-type Sev (Basler et al., 1991). The perturbation of cellular architecture in the apical region of the mutant photoreceptor precursors would have serious consequences on the correct positioning of cells in the epithelium, on the apposition of interacting membranes and on the proper subcellular localization of pathway components, resulting in a disruption of cell fate. In this context, appropriate balance of actin organization by Ssh (Rogers et al., 2005) and Cdi through their regulation of ADF/cofilin will be crucial for Sev localization and transduction. This is strengthened by the observation that the loss of the fly ADF/cofilin *twinstar* reduces, although weakly, the number of R7s in the *sev^{ST1}* eyes. Thus, overexpression of Cdi, by either EP elements or UAS transgenes, results in a mislocalization of Sev, which affects the transduction of the signal. Therefore, we conclude that fine-tuning of the actin turnover is fundamental to execute the program that drives R7 identity.

Materials and Methods

Fly stocks

The activated Sev RTK construct *yw; sev^{ST1}* (Basler et al., 1991) and recombinant flies *sev-Gal4 sev^{ST1}/TM3* were used for the screening and genetic interactions. The EP lines *EP(33-077)*, *EP(34-165)* and *EP(44-004)* were identified among 5000 insertions of a double-headed EP element (Fig. 1C; H.S., D. Nellen, K. Basler and E.H., unpublished). Plasmid rescue revealed that they are inserted 1800 bp, 2045 bp and 2963 bp, respectively, upstream of the predicted ATG of *mRpL55* (GadFly

database). The UAS sites at the 5' end of the EPs were excised by *Cre-loxP*-mediated recombination to yield single-headed EP elements capable of driving *cdi* and *mRpL55*. The following transgenes and mutations were used for interaction studies and expression pattern: *UAS-boss* (a gift of H. Kramer, UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX), *sev-Gal4* (Rintelen et al., 2003); heat shock-Gal4 (*hs-Gal4*), *en-Gal4* (from K. Basler, University of Zürich, Zürich, Switzerland), *GMR-Gal4* (Hay et al., 1994), *UAS-ssh-dsRNA* (Niwa et al., 2002), *tsr²* and *tsr^{pm}/TSSTL* (Chen et al., 2001), *yw hs-Flp 1.22; P[Act5C<FRTy>FRT>Gal4]* (Ito et al., 1997), enhancer trap *cdi^{Ba01}* for *cdi* expression pattern and *cdi^{R47}* for loss-of-function studies (Matthews and Crews, 1999). Fly cultures and crosses were grown on standard fly medium at 25°C, except for the genetic interaction between *twinstar* (*tsr*) and *sev^{d11}* that was carried out at 18°C.

Clonal analysis

cdi loss-of-function clones were generated using the FLP/FRT system (Xu and Rubin, 1993). Flies *yw hs-Flp; FRT82 Ubi-GFP/TM6B* were crossed to *yw; FRT82B cdi^{R47}/TM6B* and clones in the eye discs of the progeny were induced by 20 minutes heat shock at 37°C at 50±4 hours after egg laying (AEL). *UAS-mRpL55¹¹⁴* was used to complement the loss of *mRpL55* of the *cdi^{R47}* mutation using *GMR-Gal4*. To obtain *Minute⁺* clones (Morata and Ripoll, 1975) in the adult eye the marker stock used was *yw hs-Flp; FRT82B M(3) w⁺/TM6B^{y+}* and crossed with the *FRT82B cdi^{R47}/TM6B* flies. The heat shock was carried out for 30 minutes at 37°C (80±5 hours AEL). Control tissue in the adult eye contained pigment granules due to the presence of a functional *w⁺* transgene.

For ectopic expression, clones were generated by means of the 'FLP-out' technique using the line *yw hs-Flp 1.22; P[Act5C<FRTy>FRT>Gal4] P[UAS-GFP]/CyO* crossed to *UAS-cdi* flies. Larvae were heat-shocked at 37°C for 10 minutes at 50±4 hours AEL.

Molecular characterization of the *cdi^{R47}* allele

To generate a sequencing template we used a pair of primers (forward: 5'-gtcgcgtcaataattctctac-3' and reverse: 5'-gctctgcgcaaccaactaca-3') flanking the genetically mapped deletion breakpoints (Matthews and Crews, 1999). We sequenced it using the same primers in order to molecularly define the breakpoints of this 2.077 bp deletion that uncovers the first exon of *cdi* and the *mRpL55* gene.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA from control *EP/hs-Gal4 98±5h* AEL larvae (without heat shock), RNA from the experimental *EP/hs-Gal4 98±5h* AEL larvae (heat shock for 1 hour at 37°C at 96±5 h), and RNA from wild-type and *cdi^{R47}* first instar larvae were extracted using Trizol Reagent (Gibco-BRL). cDNA was synthesized with the MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen) from 1 µg of RNA in order to amplify by PCR, with specific primers, the following transcripts: *cdi* (5'-acgacgcccgcattctcaacag-3' and 5'-gactctgcgcccgcagcactc-3'); *mRpL55* (5'-cagctgcactcctcgtttta-3' and 5'-cgggccccaatctcgtctg-3'); *rp49* as a control (5'-agtatctgtcccacaatcg-3' and 5'-ttccaccaggttaacaagac-3'); *ATP³syn-d* (5'-cggegcctcaagcaacagctg-3' and 5'-ttgggtaattactcaacagcgg-3').

Plasmid construction and transgenic flies generation

The 4.7 kb *cdi* cDNA with the entire open reading frame was obtained from an adult cDNA library in lambdaZap (a gift from S. Ekengren, Stockholm University, Stockholm, Sweden) and sequenced on both strands. The *cdi* cDNA was cloned with *NorI* and *XhoI* restriction enzymes into the pUAST vector (Brand and Perrimon, 1993).

The *UAS-mRpL55* transgene was generated by inserting the full-length *mRpL55* cDNA sequence from a cDNA clone (RH10246; Berkeley *Drosophila* Genome Project) into the pUAST vector. Germ line transformations were carried out using *w¹¹¹⁸* as the host strain.

Scanning electron microscopy and histology

Flies were dehydrated in 25, 50, 75, 95 and 100% ethanol for 24 hours each to prepare samples for scanning electron microscopy (SEM). To get rid of accumulated debris in the eyes, the flies were sonicated for 30 seconds in an ultrasound bath followed by a final change of 100% ethanol. Flies were critical-point dried and coated with gold to be examined in a Leica 360 scanning microscope.

Adult eyes were fixed and embedded in Spurr's medium as previously described (Basler and Hafen, 1988). Semi-thin sections were obtained and stained with methylene blue for analysis under a Leica DMLB microscope. For each genotypic combination, ommatidia from 3 to 5 different eyes were counted. A Chi-square test on contingency tables was performed. This allowed us to see significant differences in number of R7 per ommatidium comparing control versus experimental flies.

Antibodies and immunohistochemistry

Antibody staining on imaginal discs was carried out using a standard protocol. Primary antibodies used in this study were: rabbit anti-Cdi (1:1000, kindly provided by C. Samakovlis, Wenner-Gren Institute, Stockholm, Sweden), rabbit anti-β-galactosidase (1:1000, Cappel), mouse anti-Boss (1:2000, gift from L. Zipursky, University of California, Los Angeles, CA), mouse anti-Prospero (1:4,

Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB), rat anti-DE-cadherin (1:50, DSHB), mouse anti-armadillo (anti-β-catenin) (1:50, DSHB), rabbit anti-cleaved caspase-3 (1:100, Cell Signaling Technologies), mouse anti-Sev (1:5000 a gift of M. Simon, Stanford University, Stanford, CA) and mouse anti-FasciclinIII (1:1000, a gift of D. Brower, University of Arizona, Tucson, AZ). Secondary antibodies were obtained from Jackson Immuno Research and include: donkey anti-rat-Rhodamine Red (1:200), goat anti-mouse-FITC (1:200), goat anti-mouse-Cy5 (1:200) and donkey anti-rabbit-Rhodamine Red (1:200). To stain the actin cytoskeleton, Rhodamine-coupled phalloidin (Molecular Probes) was used at 1:40 dilution for 30 minutes after disc fixation. Nuclei were stained with Sytox-green (1:5000, Molecular Probes).

Imaging

Double and triple fluorochrome-labeled samples were analyzed and captured using Leica TCS and Olympus confocal microscopes. Images were processed using the ImageJ (NIH). Stacks of confocal images were re-sliced to produce digital transverse (XZ) sections. Final artwork was processed by Adobe Photoshop 7.0 software.

We thank D. Nellen and K. Basler for their help and discussions. To M. Simon for providing the anti-Sev. We thank C. Samakovlis, P. Wuestemann and A. Boehne for their help. We are grateful to H. Kramer, T. Uemura, S. Crews, J. F. De Celis, F. Laski, J. Settleman and Bloomington Stock Center for fly stocks. Special thanks to M. Morey for critically reading the manuscript. We also acknowledge Developmental Studies Hybridoma Bank for antibodies requested. M.S. is the recipient of a fellowship from Universitat de Barcelona. This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia and Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) (grant BMC2003-05018 and BFU2004-04732) and an EMBO short term fellowship to F.S.

References

- Arikawa, K., Hicks, J. L. and Williams, D. S. (1990). Identification of actin filaments in the rhabdomeral microvilli of *Drosophila* photoreceptors. *J. Cell. Biol.* **110**, 1993-1998.
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Hinton, D. R., Rabin, B. A. and Benzer, S. (1987). The sevenless+ protein is expressed apically in cell membranes of developing *Drosophila* retina; it is not restricted to cell R7. *Cell* **51**, 151-158.
- Basler, K. and Hafen, E. (1988). Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain. *Cell* **54**, 299-311.
- Basler, K., Christen, B. and Hafen, E. (1991). Ligand-independent activation of the sevenless receptor tyrosine kinase changes the fate of cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **64**, 1069-1081.
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K. C., Goldberg, M. L. and Laski, F. A. (2006). Twinstar, the *Drosophila* homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning. *Development* **133**, 1789-1797.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Cagan, R. L. and Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346-362.
- Casci, T., Vinos, J. and Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* **96**, 655-665.
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. and Laski, F. A. (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 204-209.
- Chen, K., Merino, C., Sigrist, S. J. and Featherstone, D. E. (2005a). The 4.1 protein coracle mediates subunit-selective anchoring of *Drosophila* glutamate receptors to the postsynaptic actin cytoskeleton. *J. Neurosci.* **25**, 6667-6675.
- Chen, G. C., Turano, B., Ruest, P. J., Hagel, M., Settleman, J. and Thomas, S. M. (2005b). Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 979-987.
- DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R. and Condeelis, J. (2005). Cofilin takes the lead. *J. Cell. Sci.* **118**, 19-26.
- Dimova, D. K., Stevaux, O., Frolow, M. V. and Dyson, N. J. (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes. Dev.* **17**, 2308-2320.
- Drenckhahn, D. and Dermietzel, R. (1988). Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J. Cell. Biol.* **107**, 1037-1048.
- Ebisuya, M., Kondoh, K. and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell. Sci.* **118**, 2997-3002.
- Fehon, R. G., Johansen, K., Rebay, I. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for notch function. *J. Cell. Biol.* **113**, 657-669.
- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-660.

- Geangel, K. and Mlodzik, M. (2003). Egrf signaling regulates ommatidial rotation and cell motility in the *Drosophila* eye via MAPK/Pnt signaling and the Ras effector Cnosc/AF6. *Development* **130**, 5413-5423.
- Ghosh, M., Song, X., Mounieime, G., Sidani, M., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743-746.
- Gohla, A., Birkenfeld, J. and Bokoch, G. M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* **7**, 21-29.
- Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E. and Rubin, G. M. (1987). Sevenless, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science* **236**, 55-63.
- Hart, A. C., Kramer, H., Van Vactor, D. L., Jr, Paidhungat, M. and Zipursky, S. L. (1990). Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes. Dev.* **4**, 1835-1847.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.
- Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X. and Cantley, L. G. (2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol. Cell* **12**, 1275-1285.
- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. and Schneuwly, S. (1997). GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell. Tissue. Res.* **290**, 1-10.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178-183.
- Kearney, J. B., Wheeler, S. R., Estes, P., Parente, B. and Crews, S. T. (2004). Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells. *Dev. Biol.* **275**, 473-492.
- Kooh, P. J., Fehon, R. G. and Muskavitch, M. A. (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* **117**, 493-507.
- Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Hiromi, Y. (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* **126**, 2515-2525.
- Kraut, R., Menon, K. and Zinn, K. (2001). A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**, 417-430.
- Leeksa, O. C., Van Achterberg, T. A., Tsumura, Y., Tushima, J., Eldering, E., Kroes, W. G., Mellink, C., Spaargaren, M., Mizuno, K., Pannekoek, H. et al. (2002). Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2546-2556.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T. et al. (1997). Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J. Cell. Biol.* **139**, 517-528.
- Matsuo, T., Takahashi, K., Kondo, S., Kaibuchi, K. and Yamamoto, D. (1997). Regulation of cone cell formation by Cnosc and Ras in the developing *Drosophila* eye. *Development* **124**, 2671-2680.
- Matsuo, T., Takahashi, K., Suzuki, E. and Yamamoto, D. (1999). The Cnosc protein is necessary in adherens junctions for development of ommatidial architecture in the *Drosophila* compound eye. *Cell. Tissue. Res.* **298**, 397-404.
- Matthews, B. B. and Crews, S. T. (1999). *Drosophila* center divider gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA Cell Biol.* **18**, 435-448.
- Morata, G. and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-221.
- Muralidhar, M. G., Callahan, C. A. and Thomas, J. B. (1993). Single-minded regulation of genes in the embryonic midline of the *Drosophila* central nervous system. *Mech. Dev.* **41**, 129-138.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233-246.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-149.
- Pickup, A. T., Lamka, M. L., Sun, Q., Yip, M. L. and Lipshitz, H. D. (2002). Control of photoreceptor cell morphology, planar polarity and epithelial integrity during *Drosophila* eye development. *Development* **129**, 2247-2258.
- Raymond, K., Bergeret, E., Avet-Rochex, A., Griffin-Shea, R. and Fauvarque, M. O. (2004). A screen for modifiers of RacGAP(84C) gain-of-function in the *Drosophila* eye revealed the LIM kinase Cdi/TESK1 as a downstream effector of Rac1 during spermatogenesis. *J. Cell. Sci.* **117**, 2777-2789.
- Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* **53**, 217-240.
- Reich, A., Sapir, A. and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* **126**, 4139-4147.
- Reinke, R. and Zipursky, S. L. (1988). Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* **55**, 321-330.
- Rintelen, F., Hafen, E. and Nairz, K. (2003). The *Drosophila* dual-specificity ERK phosphatase DMKP3 cooperates with the ERK tyrosine phosphatase PTP-ER. *Development* **130**, 3479-3490.
- Rogers, E. M., Hsiung, F., Rodrigues, A. B. and Moses, K. (2005). Slingshot cofilin phosphatase localization is regulated by Receptor Tyrosine Kinases and regulates cytoskeletal structure in the developing *Drosophila* eye. *Mech. Dev.* **122**, 1194-1205.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 747-784.
- Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P. (1998). *Drosophila* betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* **125**, 2125-2134.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F. (1986). Sevenless a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* **231**, 400-402.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F. (1987). Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev. Biol.* **120**, 366-376.
- Tomlinson, A., Bowtell, D. D., Hafen, E. and Rubin, G. M. (1987). Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* **51**, 143-150.
- Toshima, J., Ohashi, K., Okano, I., Nunoue, K., Kishioka, M., Kuma, K., Miyata, T., Hirai, M., Baba, T. and Mizuno, K. (1995). Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31331-31337.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K. (2001a). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1131-1145.
- Toshima, J. Y., Toshima, J., Watanabe, T. and Mizuno, K. (2001b). Binding of 14-3-3beta regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 43471-43481.
- Tselykh, T. V., Roos, C. and Heino, T. I. (2005). The mitochondrial ribosome-specific MrpL55 protein is essential in *Drosophila* and dynamically required during development. *Exp. Cell Res.* **307**, 354-366.
- Tsumura, Y., Toshima, J., Leeksa, O. C., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2005). Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. *Biochem. J.* **387**, 627-637.
- Van Vactor, D. L., Jr, Cagan, R. L., Kramer, H. and Zipursky, S. L. (1991). Induction in the developing compound eye of *Drosophila*: multiple mechanisms restrict R7 induction to a single retinal precursor cell. *Cell* **67**, 1145-1155.
- Wolff, T. and Ready, D. F. (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841-850.
- Wolff, T. and Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 1277-1325. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Woods, D. F., Wu, J. W. and Bryant, P. J. (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev. Genet.* **20**, 111-118.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S., Canaani, E., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Ide, C. and Kaibuchi, K. (1997). The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **139**, 785-795.

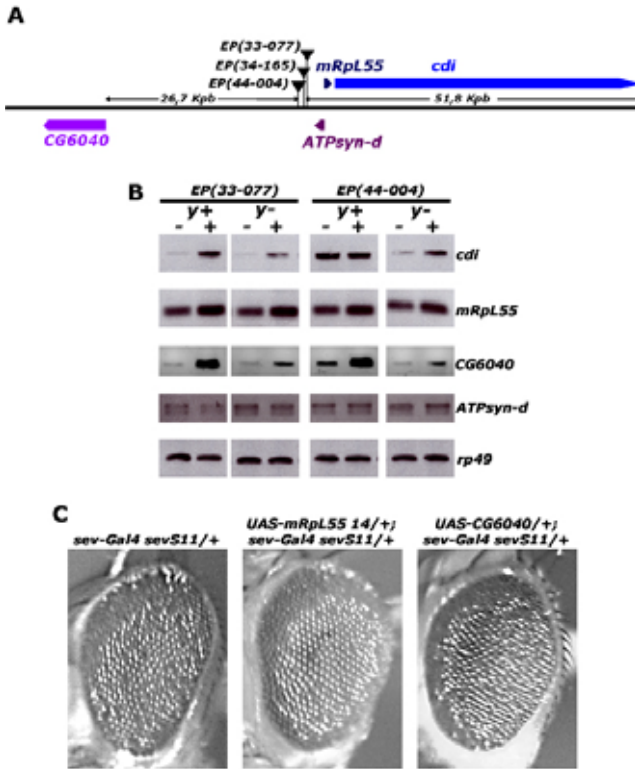
SUPPLEMENTARY DATA

Characterization of the 91F region of the genome

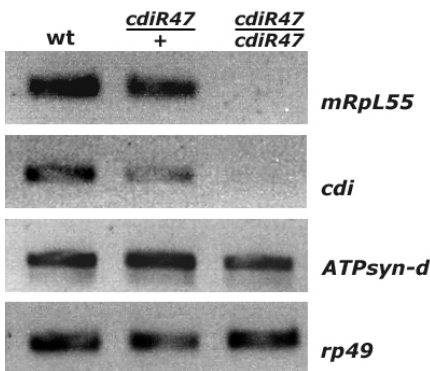
As already mentioned in the article we identified three independent *EP(y+)* lines from the screen inserted at the 5' end of both *mRpL55* and *cdi* genes (Supp. Fig.1A). Using a gain-of-function of *cdi* we demonstrated that this gene is responsible for the *sev^{S11}* suppression (Fig. 2A), and no obvious rescue was observed when *UAS-mRpL55* was overexpressed in a *sev^{S11}* genetic background (Supp. Fig.1C). Nevertheless, there are other genes in this region to be considered. *CG6040* maps 26.140 bp upstream of the 5' end of *EP(44-004)* (Supp. Fig.1A). We tested the EP lines by RT-PCR after activation of a heat shock driven Gal4 and found an increase of the *CG6040* transcript in *EP(y+)*, but we did not observe an increase of the *CG6040* transcript when *EP(y-)* lines were activated (Supp. Fig.1B). In order to discard any contribution of this gene to the suppression we generated transgenic *UAS-CG6040* flies and expressed using the *sev-Gal4* driver in a *sev^{S11}* background. We did not observe a suppression of the *sev^{S11}* rough eye phenotype (Supp. Fig.1C). The *ATPsyn-d* gene is located at the 3' end of the EPs but in the opposite orientation, suggesting that antisense RNA could be induced by the activation of the inserted EP lines. The RT-PCR did not show any alteration of *ATPsyn-d* transcript (Supp. Fig.1B). Altogether, we can discard *ATPsyn-d*, *CG6040* and *mRpL55* as candidates to be negative regulators of the Sev pathway, reinforcing the role of *cdi*.

We also characterized the *cdi^{R47}* allele used for loss-of-function studies of *cdi* (Fig. 1C). We sequenced this deletion and analysis of transcripts involved was carried out by RT-PCR. In mutant larvae for the deletion neither *cdi* nor *mRpL55* transcripts were observed, whereas they were present in wild type larvae (Supp. Fig.2). Instead, the *ATPsyn-d* transcript was intact in all cases, meaning that the expression of this gene was not altered in mutant *cdi^{R47}* individuals (Supp. Fig.2). To analyze the lethality associated to the *cdi^{R47}* allele, we generated *cdi^{R47}* mutant clones in the wing imaginal disc and observed that these clones were smaller than their own twin clones. We counted cells of mutant clones and compared with the number of cells of twin clones (Supp. Fig.3A). A reduction in the number of cells of *cdi^{R47}* clones was observed. *cdi^{R47}* was not affecting proliferation as 3P-histone expressing cells inside mutant clones found (Supp. Fig.3B). However, a Tunel assay in mutant *cdi^{R47}* clone cells and we concluded that this allele was affecting cell viability, since we found higher concentration of dying cells inside mutant clones (Supp. Fig.3C). Finally, in order to investigate the contribution of *cdi* or *mRpL55* in cell viability we generated *cdi^{R47}* mutant clones and rescued by the expression of *UAS-cdi*, *UAS-mRpL55* or both. The transgenes were overexpressed with *nubbin-Gal4* that is expressed in the wing pouch. Areas of mutant (black) and twin (bright green) clones in the wing pouch were measured, and a ratio between

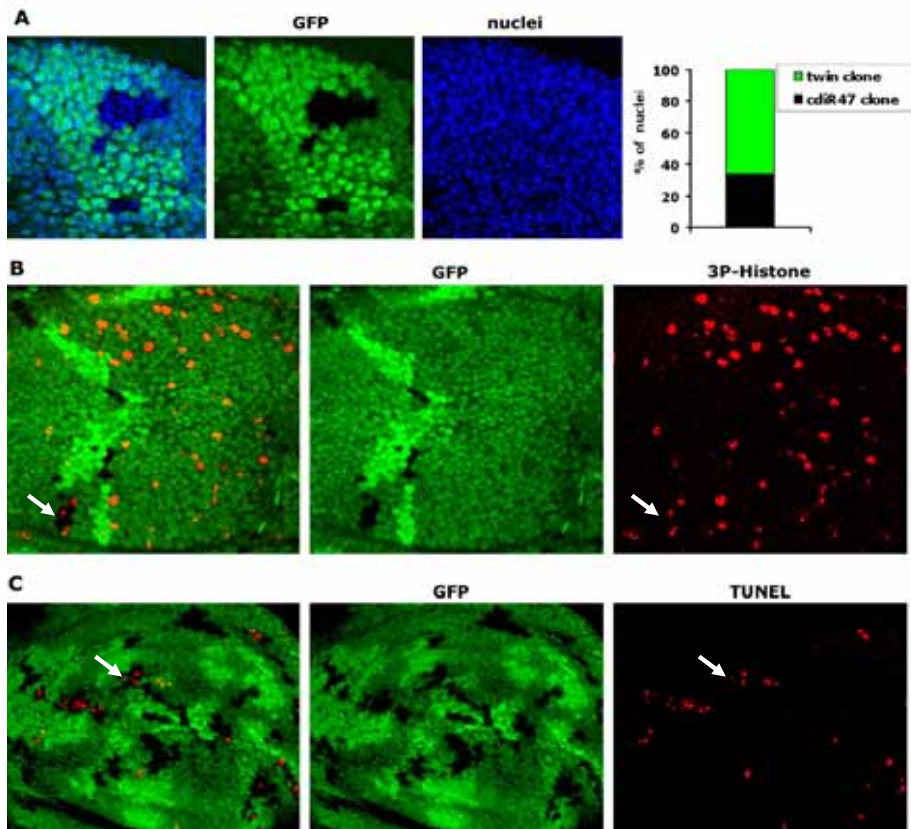
mutant clone area versus twin clone area was established for all genetic backgrounds. We observed that *cdi*^{R47} clones were very small compared with their own twin clones. A notable rescue of mutant clone size was observed in clones supplied with *mRpL55* or *cdi*. A complete rescue of the mutant clone was reached using both transgenes (Supp. Fig.4), demonstrating that *cdi* and *mRpL55* are important for cell viability.



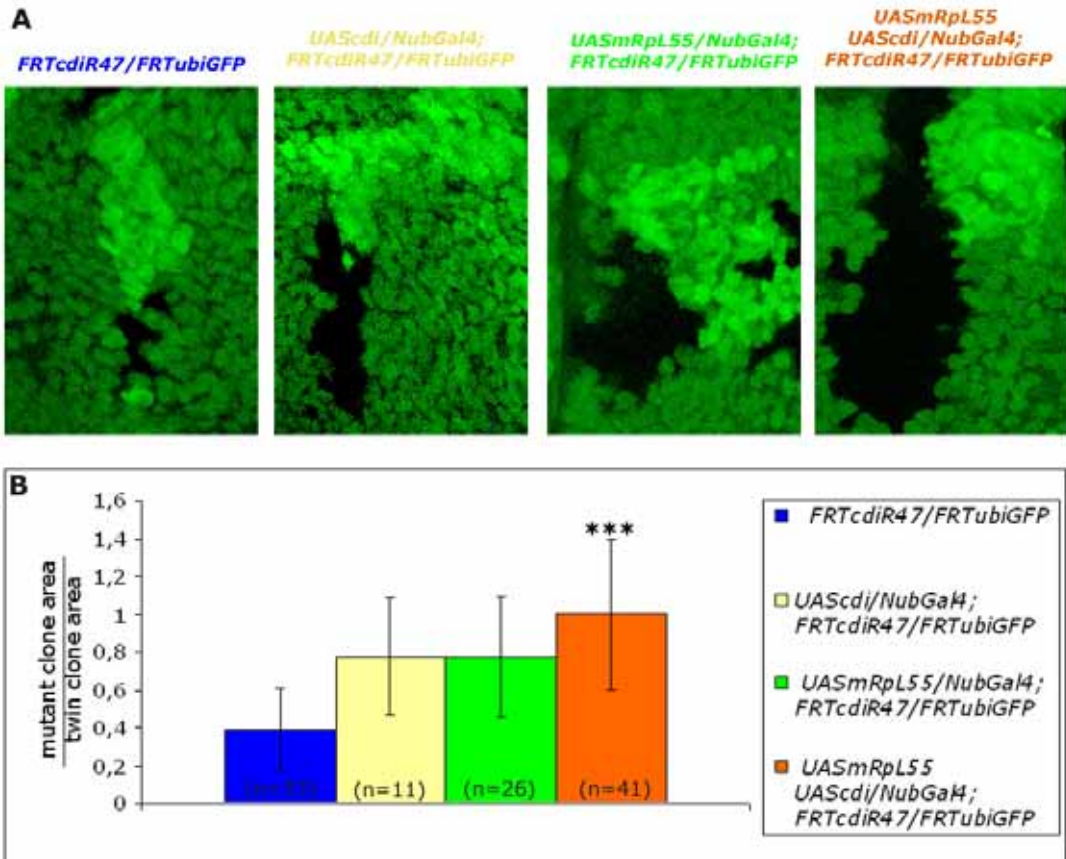
Supp. Fig.1. Neither *mRpL55* nor *CG6040* suppressed the *sev*^{S11} rough eye phenotype. (A) Genomic region and insertion of EP(33-077), EP(44-004) and EP(34-165). There are four genes in this region: *ATPsyn-d*, *mRpL55*, *cdi* at 3' of EPs and *CG6040* at 5' of EPs. (B) Molecular characterization of gene expression induced by the EP lines. RT-PCR from *hs-Gal4* EP larvae before (-) and after (+) heat shock. *cdi* and *mRpL55* transcripts are overexpressed in the EP(y+) and in EP(y-) lines. The gene *CG6040* is overexpressed in EP(y+) but not in EP(y-). And no reduction of *ATPsyn-d* transcript is seen after induction of EP lines. *rp49* expression as a control. (C) Rough eye phenotype caused by the constitutively activated *Sev* receptor (*sev*^{S11/+}). No suppression of rough eye phenotype is observed when *UAS-mRpL55* or *UAS-CG6040* are overexpressed in a *sev*^{S11} background.



Supp. Fig.2. Molecular characterization of *cdi*^{R47} allele. RT-PCR of homozygous, heterozygous and wild-type first instar larvae for *cdi*^{R47} deletion. Note that both *mRpL55* and *cdi* transcripts are absent in homozygous and reduced in heterozygous individuals. *ATPsyn-d* transcript is not affected. *rp49* as control.



Supp. Fig.3. (A-C) Mutant *cdi^{R47}* clones (absence of GFP) in the wing imaginal disc. (A) A nuclear staining reveals that mutant clones have less cells than twin clones. Represented is the percentage in the number of mutant clone cells compared to wild-type clone cells. (B) 3P-Histone labelling shows proliferating cells in the whole disc. Note that there are mitotic cells in the mutant clones (arrow). (C) TUNEL assay shows dying cells within *cdi* mutant clones (arrow).



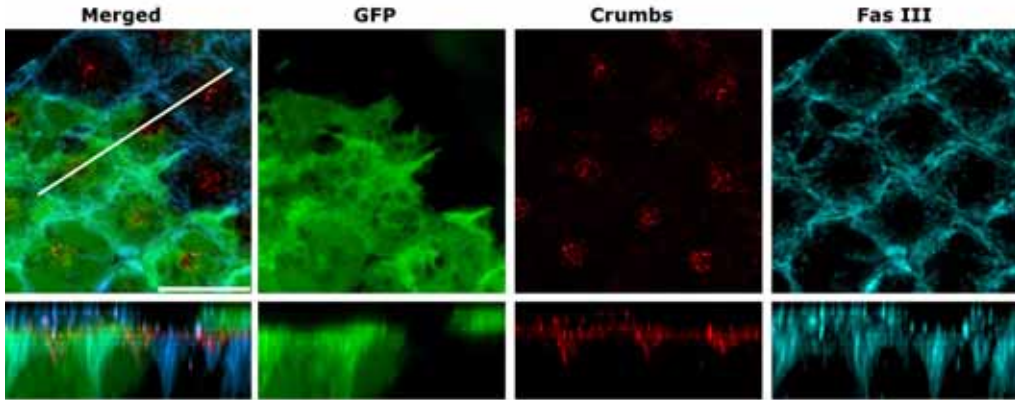
Supp. Fig.4. Rescue of *cdi^{R47}* cell lethality by *UAS-cdi* and *UAS-mRpL55*. (A) Detail of mutant *cdi^{R47}* clone (black) with its own twin clone (bright green) in the wing imaginal disc (left). From left to right it is shown a rescue of the mutant clone size when *UAS-cdi*, *UAS-mRpL55* or both are overexpressed in the wing imaginal disc. Total rescue of the clone size is seen with the addition of both transgenes to the mutant *cdi^{R47}* cells (right). (B) Ratio between mutant *cdi^{R47}* clone and twin clone area. Note that when *UAS-cdi* and *UAS-mRpL55* are overexpressed in the disc (orange), a total rescue of the mutant clone size is evident and significant compared to control *cdi^{R47}* mutant clone size (blue). Bars in the graphic representing \pm SD.

***cdi* function in the eye imaginal disc**

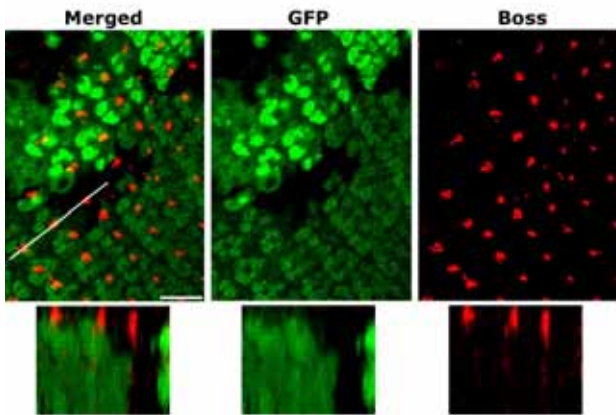
Our previously described results showed that in both gain and loss-of-function of *cdi* the adherens junctions complex was localized basally in *cdi* mutant cells of the eye imaginal disc (Figs. 4-5). The apical-basal polarity is established by the Crumbs complex, which is localized in the most apical domain of the cell, in the marginal zone (reviewed in Tepass et al., 2001). In order to test whether *cdi* could alter the location of other complexes involved in cell polarity we induced gain-of-function clones of *cdi* and labelled with an antibody against the Crumbs protein. We observed that the Crumbs protein remained at the same position in mutant cells as in wild-type cells in the developing eye (Supp. Fig.5). Crumbs is the first cell communication complex to be formed in an epithelial cell and may not be altered by actin polymerization at the cell cortex.

Moreover, all ligands and receptors should be localized in the apical tips of nascent photoreceptor cells to establish correct cell-cell communication. It is known that the ligand of Sev, Boss, is also localized in this apical tip of the R8 photoreceptor cell in the moment of R7 determination (Kramer et al., 1991). We found in this work that the Sev receptor protein is misslocalized in both gain and loss-of-function of *cdi* (Fig. 7). In *cdi^{R47}* loss-of-function clones in a *UAS-mRpl55* background we found Boss protein localized to a more basal position in mutant cells compared with the nearest wild type ommatidia (Supp. Fig.6). This could be due to disorganized actin in mutant *cdi* cells.

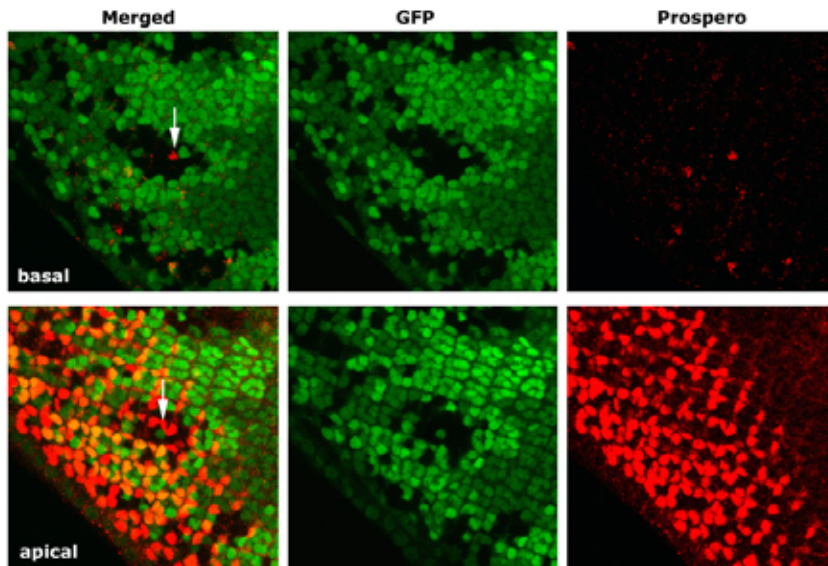
Prospero expression in the developing eye occurs in two phases. The first phase consists of low-level expression in the R7 photoreceptor and cone cells. The establishment of this pattern requires the input of Egfr and the Ras/MAPK decisions. The second phase of expression comes when Sev activation leads to a substantial increase in expression in the R7 cell (reviewed in Simon, 2000). We generated *cdi^{R47}* mutant clones in a *UAS-mRpl55* background in the developing eye and stained with Prospero antibody, which marks a nuclear protein. In these clones appeared some Prospero expressing cells with the nuclei in a more basal position than wild type R7 cell (Supp. Fig.7). This effect could be due to a loss of apical-basal polarity induced by *cdi* loss-of-function.



Supp. Fig.5. Crumbs location in *cdi*-overexpressing cells in the eye imaginal disc. Clones of cells overexpressing *cdi* are labeled with GFP (green). Upper panels show a cross section and lower panels a transverse section at the level of the diagonal bar drawn in white. Normal localization of Crumbs protein (red) in mutant ommatidia (green) is seen compared to wild type ommatidial cells (black). Fasciclin III (blue), used to mark the cell contour, denotes that the *cdi*-overexpressing cluster is not shrunk or smaller. Scale bar, 10 μ m.



Supp. Fig.6. Boss is mislocalized in *cdi* mutant clones. Mitotic *cdi*^{R47} clones in a *UAS-mRpL55* background (lack of GFP) show disrupted Boss localization (red) that moves to a more basal position in the R8 photoreceptor cell. Lower panels are transversal sections at the level of the diagonal white line, Boss is displaced in mutant ommatidia. Scale bar, 10 μ m.

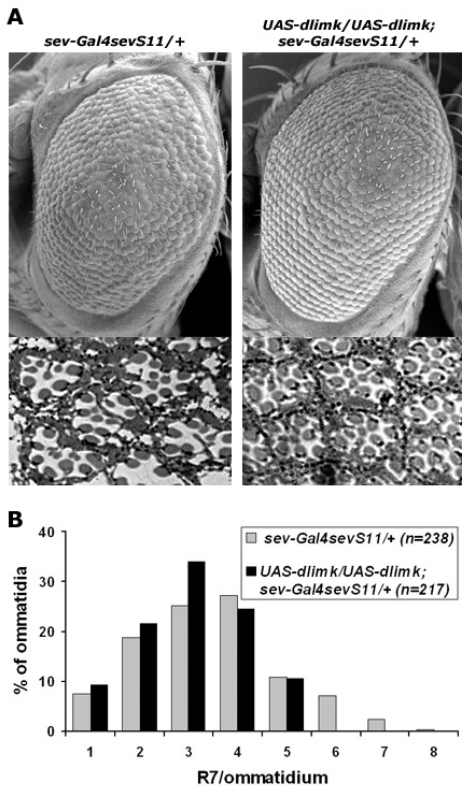


Supp. Fig.7. Expression of Prospero in *cdi* mutant clones. Mitotic clones of homozygous *cdi*^{R47} cells (lack of GFP) were supplied with *UAS-mRpl55* under *GMR-Gal4* driver and labelled with Prospero antibody (red). Eye imaginal discs oriented with posterior part to the left. (B) Upper panels show a basal confocal cross section where nuclei of cells expressing Prospero are evident within the mutant clone (arrowhead). Lower panels display apical cross sections of the same disc where normal nuclei of Prospero positive cells are located.

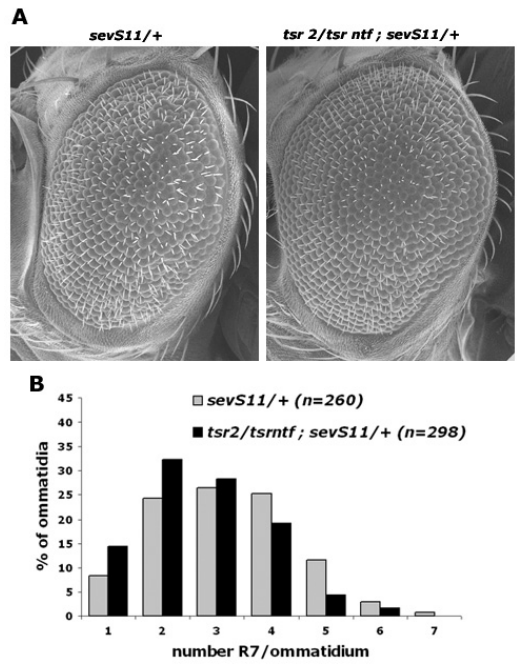
Suppression of the Sev pathway by other members of the actin cytoskeleton turnover

Limk1 is a serine/threonine kinase that, like TESK1, inhibits actin depolymerization through phosphorylation dependent inhibition of ADF/cofilin in mammals (Arber et al., 1998). In flies, the *Drosophila dLimk* also phosphorylates ADF/Cofilin (Ohashi et al., 2000). We tested whether a gain-of function of *dLimk* was able to suppress the activated Sev receptor phenotype. First, we checked for extra R7 cells per ommatidia using one copy of *UAS-dLimk* in a *sev^{S11}* background and no suppression was observed. Then, in order to use two copies of the transgen to perform this genetic interaction, we had to mobilize the *UAS-dLimk* transgene from the third to the second chromosome using a source of $\Delta 2-3$ transposase. Once we had these flies we could use two copies of *UAS-dLimk* transgene to try the *sev^{S11}* rescue. In this genetic condition, the external eye phenotype of *UAS-dLimk/UAS-dLimk; sev^{S11}/+* showed a weak suppression of the roughness (Supp. Fig.8A). But, when we counted the number of R7 per ommatidia we did not find a suppression of the *sev^{S11}* phenotype (Supp. Fig.8B). Thus, we can not conclude that a gain-of-function of the *dLimk* leads to a suppression of the *sev^{S11}*.

twinstar is the *Drosophila* homolog of ADF/Cofilin (Gunsalus et al., 1995). Since *cdi* seemed to inhibit *twinstar*, it is reasonably to think that a loss-of-function of *twinstar* should reproduce the suppression of the *sev^{S11}* phenotype seen with *cdi* overexpression. An heteroallelic combination of *twinstar (tsr²/tsr^{ntf})* was used to test the suppression of the *sev^{S11}*. This interaction was done at 18°C because those flies were lethal at 25°C. The interaction resulted in a reduction of the roughness of the adult eye phenotype, and when we counted the number of R7 cells per ommatidium we determined that, in average there were 2,7 R7s per ommatidium compared to control *sev^{S11}* flies grown at 18°C that showed 3,2. In this case, the suppression was significant ($p < 0,001$) (Supp. Fig.9). We can conclude with this data that F-actin turnover through ADF/Cofilin is important for the transduction of the Sev pathway.



Supp. Fig. 8. *dLimk* does not suppress the *Sev* pathway. (A) SEM images from rough eyes of *sev-Gal4sev^{S11}/+* flies (left) and *UAS-dLimk/UAS-dLimk; sev-Gal4sev^{S11}/+* flies (right) with their correspondent semithin section below. (B) The histogram quantifies the number of R7 per ommatidium with and without *dLimk* overexpression.



Supp. Fig. 9. Suppression of the *sev^{S11}* phenotype by the loss of *tsr* function. (A) SEM images from *sev^{S11}/+* rough eye (left) and from the heteroallelic combination of *tsr* (*tsr²/tsr^{ntf}*) in *sev^{S11}* background where a partial rescue of the roughness is seen (right). (B) The histogram shows distribution profiles of the number of R7 photoreceptors per ommatidium for each genotype represented. The statistical analysis reveals significant differences between the genotypes ($p < 0.001$).

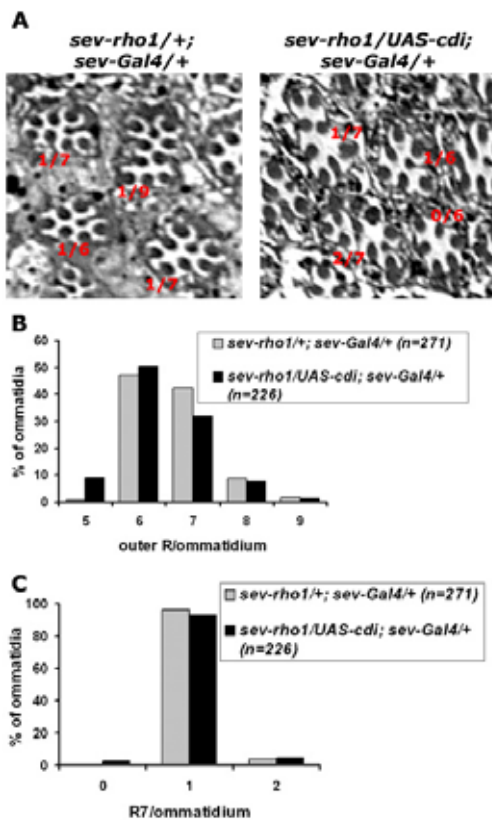
Interaction between *cdi* and the Egfr pathway

Since we already demonstrated that *cdi* acts as a negative regulator of the Sev pathway (Fig. 2), we wanted to explore whether *cdi* was able to suppress other RTK pathways involved in neuronal differentiation during eye development. The recruitment of outer photoreceptor cells (R1-R6) is induced by the activation of the Egfr which is also essential for the determination of the majority of cell types in the eye (Freeman, 1996). Egfr is a RTK activated by the ligand Spitz, which is previously cleaved by Rhomboid protein and secreted to activate the receptor. This activation of the Egfr leads to the activation of the Ras/Raf/MAPK signaling pathway to determine cell fate. When Spitz or Rhomboid are overexpressed there are more photoreceptor cells recruited and determined (Freeman et al., 1992). We used a gain-of-function of *rhomboid* under the *sev* promoter (*sev-rho1*). When we overexpressed *sev-rho1* we counted 6,6 outer R-cells per ommatidium in average, whereas this number was reduced to 6,4 when *UAS-cdi* was expressed in the same genetic background (Supp. Fig.10). The suppression, although was very weak, seemed to be significant. Furthermore, this *sev-rho1* also increased the number of R7 cells per ommatidium, but in this case no suppression was observed when we overexpressed *cdi* in a *sev-rho1* background (Supp. Fig.10). To study at which level of the Ras/MAPK pathway is *cdi* interacting we used a gain-of-function of Ras, *sev-RasV12* that is constitutively activated and gives an external rough eye phenotype. When *EP(33-077)* or *UAS-cdi* were overexpressed in *sev-RasV12* background with a *sev-Gal4* driver no suppression of the phenotype was observed. This could indicate that *cdi* is interacting with the Sev signaling cascade at the level of the receptor, or at least, at the level of the plasma membrane (Supp. Fig.11 and Table In2).

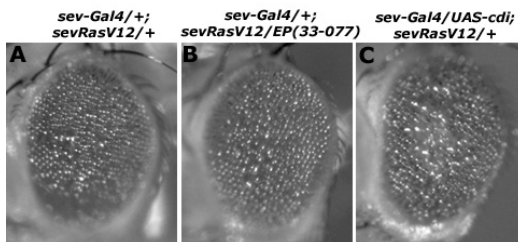
One of the processes in which the Egfr signaling pathway has been extensively studied is cell determination in the *Drosophila* wing. The patterning of veins involves the establishment of proveins and interveins in the wing disc, in a process regulated by the Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways (reviewed in Bier, 2000). Subsequently, the expression of several members of the Egfr and Notch signaling pathways is activated within the proveins, leading to the subdivision of each provein in a central region that will differentiate as vein, where Egfr signaling is active, and two adjacent rows of boundary provein cells where Notch signaling prevents vein differentiation (reviewed in De Celis, 2003). For instance, a gain-of-function of the Egfr pathway in the wing will result in a extravein tissue phenotype whereas a loss-of-function leads to no differentiation of veins in the wing. We first studied the expression of *cdi* in the wing imaginal disc using the enhancer trap line *cdi^{BA01}* (Matthews and Crews, 1999). We observed an expression in all cells of the disc but at higher levels in the peripodial membrane (Supp. Fig.12). We also corroborated that a *UAS-cdi* expression in the wing disc induced F-actin accumulation (Supp. Fig.13).

A gain-of-function of *cdi* in the wing using *MS1096*, that is expressed in the dorsal part of the whole wing resulted in the lost of the anterior crossvein or both, the anterior and the posterior crossveins (Supp. Fig.14A). Then, we tested whether a *cdi* gain-of-function was

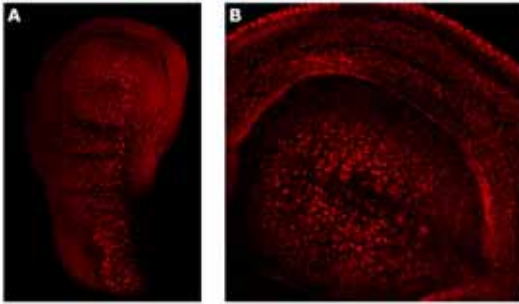
able to rescue phenotypes of the *Egfr* pathway. The *Ellipse* (*Elp^{B1}*) allele is an activated form of *Egfr*. We overexpressed *UAS-cdi* using the *MS1096* driver in a *Elp^{B1}* mutant background and observed a rescue of the *Elp^{B1}* phenotype in 20% of the analyzed wings (Supp. Fig.14A). We next checked whether the loss of *cdi* was able to enhance the *Elp^{B1}* phenotype. We observed that the *Elp^{B1}* phenotype was enhanced in combination with an *cdi^{R47}* mutation in heterozygosis, where we observed an extravein tissue near the L3 in 11% of wings (Supp. Fig.14B). Finally, we used a loss-of-function of *Egfr*, *torpedo* to test if a loss-of-function of *cdi* was able to suppress this phenotype. The heteroallelic combination of *torpedo top¹/top^{3CB1}* showed a partial or complete loss of vein L4 in the *Drosophila*. This phenotype was not rescued by the *cdi* loss-of-function in heterozygosis.



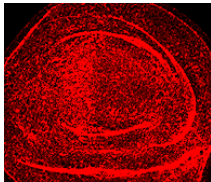
Supp. Fig.10. *cdi* overexpression interfere with *Egfr* signaling. (A) Semithin eye sections of *sev-rho1* flies where *Egfr* signaling is activated (left), and *sev-rho1/UAS-cdi; sev-Gal4/+* flies (right). Represented in red is the number of outer R cells/inner R cells observed for each ommatidia seen in the picture. (B) The histogram shows distribution profiles of the number of outer (R1-R6) photoreceptors per ommatidium for each genotype represented. The statistical analysis reveals significant differences between the genotypes ($p < 0.001$). (C) The histogram shows distribution profiles of the number of R7 photoreceptors per ommatidium for each genotype represented and no differences are seen.



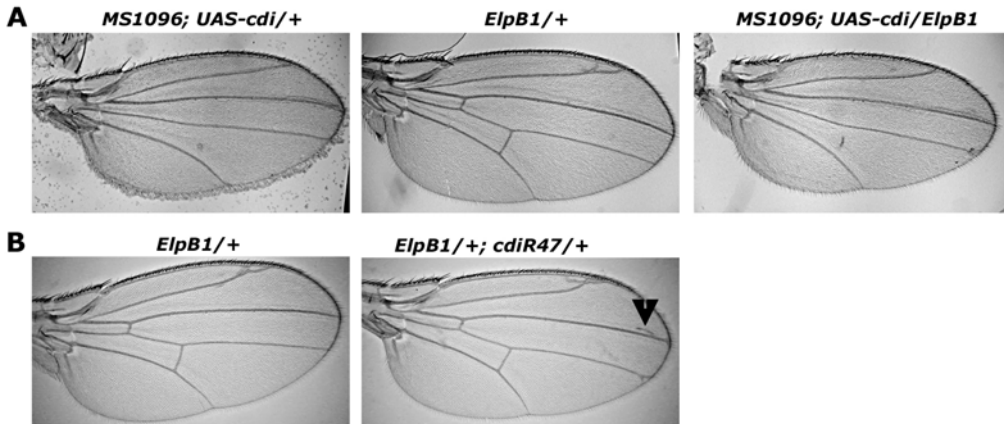
Supp. Fig.11. *cdi* effect on the *Sev* pathway is upstream of *Ras*. (A) Rough eye phenotype of *Ras* constitutively activated (*sev-RasV12/+*). (B-C) No rescue of *RasV12* phenotype is seen when *EP(33-077)* (B) or *UAS-cdi* (C) are overexpressed under *sev-Gal4* driver.



Supp. Fig.12. Pattern of *cdi* expression in the wing imaginal disc of third instar larva. Discs are oriented with the posterior compartment to the left. (A) Nuclear *cdi-LacZ* expression in the peripodial membrane. Note that the bigger nuclei expressed *cdi* at high levels. (B) Detail of wing pouch of the imaginal disc where *cdi* is expressed in all cells.



Supp. Fig.13. Overexpression of *cdi* in the posterior compartment of the wing imaginal disc using *en-Gal4* as a driver. The phalloidin staining reveals F-actin accumulation in this compartment. Posterior to the left.

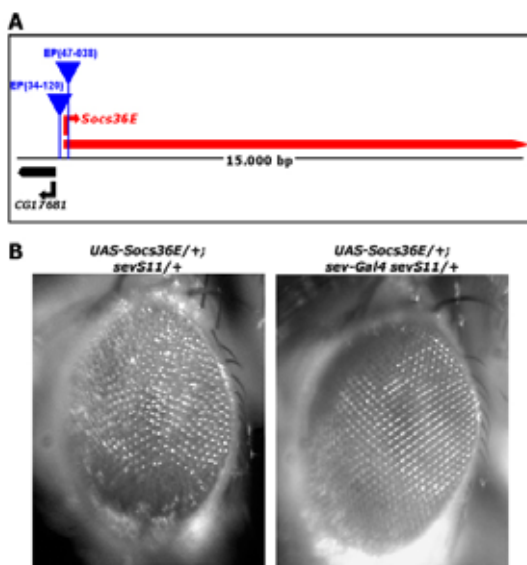


Supp. Fig.14. Genetic interactions between *cdi* and the Egfr pathway. (A) The overexpression of *cdi* in the wing causes loss of posterior crossveins and sometimes the anterior crossvein (left). Wing phenotype of *Elp^{B1}* results in ectopic vein tissue at distal part of L2 (middle). *MS1096; ElpB1/UAS-cdi* individuals show a rescue of the *Elp^{B1}* phenotype (right). (B) *Elp^{B1}* phenotype is enhanced by the *cdi* loss-of-function. Shown are a wing phenotypes of *Elp^{B1}* (left) and an enhanced wing *Elp^{B1}* when combined with *cdi^{R47}/+* (right) where an extra vein tissue at most distal part of vein L3 appears (arrow).

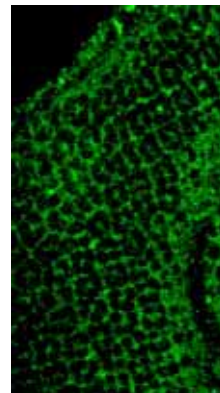
Other negative regulators of the Sev pathway

We identified sixteen EP lines in the screening for negative regulators of the Sev pathway that strongly suppressed the *sev*^{S11} rough eye phenotype (Table In1). The lines *EP(34-120)* and *EP(47-038)* pointed to *Socs36E* gene as candidate for the Sev suppression (Supp. Fig.15A). In *Drosophila*, *Socs36E* has been identified as a suppressor of the JAK/STAT pathway as it has SH2 and SOCS domains homologous to vertebrate SOCS-5 (Callus and Mathey-Prevot, 2002; Karsten et al., 2002). Furthermore, *Socs36E* has been reported to be a negative regulator of the Egfr pathway in the *Drosophila* wing (Callus and Mathey-Prevot, 2002). We expressed the *UAS-Socs36E* with *sev-Gal4* driver in a *sev*^{S11} genetic background and a suppression of the rough eye phenotype was observed (Supp. Fig.15B), corroborating that *Socs36E* is a negative regulator of the Sev pathway.

Moreover, the *EP(44-035)* is inserted in the first non-coding exon of PTP99A (Table In1). This is a phosphatase with functions in the nervous system (reviewed in Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004). Using an antibody against PTP99A we observed expression in the plasma membrane of all cells of the third larval disc (Supp. Fig.16) meaning that PTP99A could have a function in eye development.



Supp. Fig.15. *Socs36E* suppression of the *sev*^{S11} rough eye phenotype. (A) Genomic region and insertion of *EP(47-038)*, *EP(34-120)*. There are two genes in this region: *CG17681* at 5' and *Socs36E* at 3' of EP lines. (B) Rough eye phenotype caused by the constitutively activated Sev receptor when *Socs36E* is not expressed (*UAS-Socs36E/+; sev*^{S11/+}) (left) and suppression of the *sev*^{S11} phenotype due to *Socs36E* overexpression of (*UAS-Socs36E/+; sev-Gal4 sev*^{S11/+}) (right).



Supp. Fig.16. Pattern of PTP99A expression in the eye imaginal disc. PTP99A is localized in the plasma membrane of all cells of the eye disc. Shown is a confocal section at the photoreceptors level.

Materials and methods

Fly stocks

We used the following genetic stocks: *UAS-mRpL55¹⁴*, *cdl^{BA01}* (Matthews and Crews, 1999), *sev-rho1* (Freeman et al., 1992) *UAS-Socs36E-45* (Callus and Mathey-Prevot, 2002); *UAS-dlimk* (Chen et al., 2004); *w*; *Sp / CyO*; *Sb (Δ2-3) / TM6*; *tsr²* and *tsr^{1lf}* (Chen et al., 2001), *en-Gal4*, *Nub-Gal4*, *Elp^{B1}*, *top^{3CB1}*, *top¹*, *MS1096*. Flies were grown at 25°C except for genetic interactions with *tsr* alleles that were grown at 18°C.

Plasmid construction and transgenic flies generation

The full length cDNA predicted for *CG6040* is 5833bp in length. We amplified 901bp from the 5 prime end of the CDS by PCR and inserted the fragment into an incomplete cDNA clone (LP05394; Berkeley Drosophila Genome Project) where 640bp from first ATG were missing. Then, the complete *CG6040* cDNA was inserted into the pUAST vector. Germ line transformation was done using *w¹¹¹⁸* as the host strain.

Antibodies

rat anti-Crumbs (1:500), mouse anti-Boss (1:2000) a gift from L. Zipursky, mouse anti-PTP99A (1:1, DSHB), mouse anti-Prospero (1:4, DSHB). rabbit anti-histone 3P (1:100).

TUNEL assay

After fixation of *yw hsFlp; FRT82 GFP/FRT82 cdl⁴⁷* wing discs, apoptotic cells were detected by labeling the 3'-OH ends of DNA with Chromatide BODIPY® Texas Red-14-dUTP (Molecular Probes, Inc.) for 1 hour 30 minutes at 37°C using terminal deoxynucleotidyl transferase (Roche).

Supplementary bibliography

- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P.** (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-9.
- Bier, E.** (2000). Drawing lines in the Drosophila wing: initiation of wing vein development. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 393-8.
- Callus, B. A. and Mathey-Prevot, B.** (2002). SOCS36E, a novel Drosophila SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene* **21**, 4812-21.
- Chen, G. C., Gajowniczek, P. and Settleman, J.** (2004). Rho-LIM kinase signaling regulates ecdysone-induced gene expression and morphogenesis during Drosophila metamorphosis. *Curr Biol* **14**, 309-13.
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. and Laski, F. A.** (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during Drosophila ovary development and oogenesis. *Nat Cell Biol* **3**, 204-9.
- De Celis, J. F.** (2003). Pattern formation in the Drosophila wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-51.
- Ensslen-Craig, S. E. and Brady-Kalnay, S. M.** (2004). Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Dev Biol* **275**, 12-22.
- Freeman, M.** (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye. *Cell* **87**, 651-60.
- Freeman, M., Kimmel, B. E. and Rubin, G. M.** (1992). Identifying targets of the rough homeobox gene of Drosophila: evidence that rhomboid functions in eye development. *Development* **116**, 335-46.
- Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M. and Goldberg, M. L.** (1995). Mutations in twinstar, a Drosophila gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J Cell Biol* **131**, 1243-59.
- Karsten, P., Hader, S. and Zeidler, M. P.** (2002). Cloning and expression of Drosophila SOCS36E and its potential regulation by the JAK/STAT pathway. *Mech Dev* **117**, 343-6.
- Kramer, H., Cagan, R. L. and Zipursky, S. L.** (1991). Interaction of bride of sevenless membrane-bound ligand and the sevenless tyrosine-kinase receptor. *Nature* **352**, 207-12.
- Matthews, B. B. and Crews, S. T.** (1999). Drosophila center divider gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA Cell Biol* **18**, 435-48.

Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H. and Mizuno, K. (2000). A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 1178-85.

Simon, M. A. (2000). Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* **103**, 13-5.

Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.

CAPÍTOL 2

Article

Sesé, M., Serras, F., Tauler, A. i Corominas, M. *TESK1 inhibits PC12 cell differentiation and interferes with ERK signaling transduction.*

Enviat a *FEBS Letters*

Resum

La regulació de l'organització del citoesquelet d'actina està implicada en molts processos cel·lulars diferents com la diferenciació, proliferació, motilitat i morfogènesi cel·lular. També, l'ensamblatge dels filaments d'actina cortical serveix de suport de moltes vies de transducció de senyal. En el capítol anterior hem descrit que el gen de *Drosophila cdi* regula negativament la via de transducció de senyal de Sevenless, via per la qual es determina el fotoreceptor R7 en l'omatidi. La serina/treonina quinasa de mamífers Testis specific kinase 1 (TESK1) és homòloga a Cdi i pertany a la família de les quinases LIMK, encarregades d'inactivar per fosforilació a la ADF/Cofilina per controlar la reorganització del citoesquelet d'actina. En aquest treball hem demostrat que TSK1 inhibeix la diferenciació neuronal de les cèl·lules PC12 i facilita la progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules de fibroblast NIH3T3. Aquests dos processos estan lligats a l'activació de la via de Ras/MAPK. Finalment, nosaltres també hem observat que TSK1 interfereix amb el perfil d'activació d'ERK quan les cèl·lules s'estimulen amb sèrum. Per tant, els nostres resultats demostren que Cdi/TSK1 participa, de manera més generalitzada, en la modulació de les vies de transducció del senyal de tirosina quinasa.

TESK1 inhibits PC12 cell differentiation and interferes with ERK signaling transduction

Marta Sesé^a, Florenci Serras^a, Albert Tauler^b and Montserrat Corominas^{a,*}

^a *Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.*

^b *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.*

Abstract Turnover of the actin cytoskeleton must be tightly regulated in many cellular processes, including differentiation, proliferation, cell motility, and morphogenesis, as it serves as a support for associated signal transduction cascades. In this study, we describe the role of testis-specific kinase 1 (TESK1), a member of the LIM kinases involved in the control of cytoskeleton dynamics through ADF/Cofilin phosphorylation, in PC12 neuronal cell differentiation and fibroblast proliferation. In addition, we show data indicating that TESK1 interferes with both the magnitude and duration of the ERK activation profile.

Key words: cdi, TESK1, PC12, ERK, differentiation

1. Introduction

It has been shown that reorganization of the actin cytoskeleton is essential for cell differentiation, cell cycle progression, and cell signaling. For all these processes, signal transduction pathways have to be tightly regulated. Various growth factor receptors, as well as their downstream substrates, are associated with the cytoskeleton, which serves as a support for signaling transduction pathways [1-4]. For instance, the epidermal growth factor receptor (EGFR) has an actin-binding domain [1]. Furthermore, disruption of cortical actin filaments interferes with signal transduction events such as activation of ERK1/2 [5].

Receptor tyrosine kinase (RTK) pathways play a role in various cellular processes, such as

apoptosis, proliferation, and cell differentiation [6]. These RTKs signal through the Ras/MAP kinase pathway, which elicits different biological responses according to the duration of activation of the pathway [7,8]. One well characterized example of an RTK involved in cell differentiation in *Drosophila* is the Sevenless (Sev) receptor, the activation of which leads to R7 photoreceptor determination [9]. In a misexpression screen, we recently identified *center divider* (*cdi*) as a negative regulator of the Sev pathway [10]. *cdi* encodes a serine/threonine kinase orthologous to mammalian testis-specific kinase 1 (TESK1) [11]. The protein kinase domain of TESK1 is structurally similar to domains of LIMK1 [12], which regulates polymerized actin turnover through phosphorylation and inactivation of the F-actin depolymerizing factor ADF/cofilin [13]. TESK1 is expressed in a large number of cell lines [13,14], and when overexpressed, induces the formation of stress fibers and focal adhesions, processes that are dependent on its kinase activity [13].

In mammalian cells, one of the best studied model systems to address the cellular differentiation response through the Ras/Raf/ERK pathway is the acquisition of a neuronal cell fate in the rat pheochromocytoma cell line PC12. The decision to proliferate or differentiate in PC12 cells depends on whether activation of ERK signaling is transient or sustained, respectively [15]. PC12 cells respond to epidermal growth factor (EGF) treatment by increasing proliferation [15,16]. In contrast, nerve growth factor (NGF) stimulation of PC12 cells causes them to differentiate and display a neuron-like phenotype due to a sustained activation of the ERK signaling pathway [15]. The time-course of ERK signaling is also involved in G1 cell cycle progression in NIH3T3 fibroblasts, where sustained ERK

* Corresponding author. Fax: (34)

E-mail address: mcorominas@ub.edu

activation is necessary [8]. In fact, a number of studies have shown a correlation between sustained ERK activation and successful S phase entry in various cell lines [17-20].

In the present work we induced transient expression of TESK1 in PC12 and NIH3T3 cells and found that it inhibited cell differentiation in NGF-stimulated PC12 cells and promoted S-phase entry in NIH3T3 fibroblasts. We also provide evidence that TESK1 interferes with transient ERK activation but sustains ERK signaling over extended periods, an observation that may explain the phenotypes observed in cells overexpressing TESK1.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transfection

HEK 293T and NIH 3T3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% donor calf serum (DCS) (Gibco, Invitrogen), respectively, at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. The following plasmids and expression constructs were used in transfections: rat pCAG-TESK1 and pCAG-TESK1(D170A) [13]; pDEFL-HA-Erk1, a gift from C. Caelles (IRB-UB, Barcelona, Spain); and pEGFP-C1 and pCDNA3.1 (Invitrogen). Transfection was performed with Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PC12 cells were cultured in DMEM supplemented with 6% FBS and 6% heat inactivated horse serum (HS). PC12 cells (1x10⁶) were transfected with 10µg of plasmid by electroporation at 975 volts and plated on 35-mm tissue culture dishes containing sterile glass poly ornithine-coated coverslips. PC12 cells were treated with NGF at 100 ng/mL (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) for eight days in medium containing 0.6% serum.

2.2. Cell staining and detection of PC12 cell differentiation

Cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Then, cells were permeabilized with 0.1% triton X100 and blocked with 1% bovine serum albumin. Cells were incubated for 1 h with mouse anti-c-myc primary antibody (1:500, Santa Cruz) at 37°C. Then, the cells were washed with PBS 0.1% triton X100 and incubated with Cy5-conjugated secondary anti-mouse antibody (1:500, Jackson Immuno Research, Suffolk, England) and rhodamine-conjugated phalloidin (1:40,

Molecular Probes Inc., Eugene, OR) for 45 min at 37°C. Nuclei were stained with DAPI (0.4 ng/µL, Molecular Probes). Differentiated cells were counted and digital images obtained on a Leica epifluorescent microscope equipped with a Leica DCF-300 digital camera. Detailed confocal images to study neurite morphology were captured on an Olympus confocal microscope.

2.3. Western blot analysis

Lysis buffer contained 50 mM Tris-HCL pH 8.0, 120 mM NaCl, 1% Nonidet p40, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 10 mM β-glycerolphosphate, 1 mM benzamidine, 0.1 mM PMSF, 15 mM sodium pyrophosphate, 1 mM DTT, 1 mM orthovanadate, and protein inhibitors. The protein content of cell extracts was quantified by Bradford assay [21]. For Western blot experiments, 20 µg of protein were loaded on 12.5% SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes were incubated with the antibodies at the indicated concentrations and developed using the enhanced chemiluminescence reagent (ECL) (Biological Industries, Beth-Haemek, Israel). The following primary antibodies were used: mouse anti-c-myc (1:1000), mouse anti-phospho-ERK1/2 (1:500), and rabbit anti-Erk-1(1:1000), all from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and mouse anti-pan-Ras (1:400) from Oncogene Research Products (Calbiochem, Darmstadt, Germany). HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology; both were used at a dilution of 1:5000.

2.4. Measurement of Ras activation

The ability of Ras-GTP to bind the Ras-binding domain (RBD) of Raf-1 was used to analyze the amount of active Ras [22]. Cell lysates were incubated with 75 µg of GST-RBD bound to glutathione-Sepharose beads for 2 h at 4°C. Beads were washed four times with REB buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM NaF, 10% (v/v) glycerol, and 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol). Bound proteins were eluted by addition of 40 µL of Laemmli loading buffer and immunoblotting was performed with pan-Ras antibody, as described above. Cell lysates (30 µL) were also analyzed to ensure equal quantities of Ras in the assay.

2.5. Cell-cycle analysis

Transfected NIH 3T3 cells were plated in 35-mm culture dishes and serum deprived after transfection for 36 h with medium containing 0.5% FBS. Then, cells were treated with medium containing serum, fixed with 70% ethanol before staining with PI

(Molecular probes) to analyze cell cycle distribution by fluorescence activated cell sorting (FACS).

3. Results and discussion

3.1. *TESK1* inhibits PC12 cell differentiation

TESK1 is expressed in various tissues and cell lines [13], and its ability to inhibit the effect of cofilin on actin polymerization leads to accumulation of polymerized actin and induces the formation of stress fibers and focal adhesions in COS-7 and HeLa cells [13]. We transfected PC12 cells with a TESK1 expression construct and observed that F-actin staining was stronger than in control, untransfected cells (Fig. 1A). Accumulation of actin filaments was more evident in the cell cortex than in the cytoplasm, especially in the growth cones at the tips of the nascent neurites (Fig. 1A). Growth cones serve as contacts to the substrate for PC12 cells and they are able to accumulate receptors in their tips for guidance and growth. Actin filaments are the major cytoskeletal elements that determine the structure of growth cones [23,24] and accurate pathfinding by axonal growth cones depends on continuous reorganization of their cytoskeletal structures in response to guidance cues [25]. These observations, together with our previous work with *cdi* in *Drosophila* [10], suggest that an excess of polymerized actin in the growth cone could interfere with cell differentiation or axonal outgrowth.

Some evidence is available to suggest that actin remodeling is necessary to promote neuronal differentiation [26]. It has been reported, for example, that while overexpression of LIMK1 on its own does not have any effect on PC12 cells, when it is expressed in both Ras and MAPKK-activated PC12 cells, neuronal differentiation is reduced [27]. In addition, it has recently been shown that overexpression of profilin reduces PC12 cell differentiation [28]. In contrast to ADF/cofilin, profilin is an actin polymerization factor and acts by adding monomers of G-actin to the leading edge of actin filaments [29]. Taken together, these findings suggest that an excess of polymerized actin interferes with PC12 cell differentiation.

We next investigated the ability of TESK1 to inhibit cell differentiation in NGF-stimulated

PC12 cells. PC12 cells were cotransfected with a GFP expression construct in combination with an expression vector containing wild-type TESK1 protein or a kinase-inactive mutant form of TESK1, TESK1(D170A), which does not induce stress fibers because of its inability to phosphorylate the ADF/cofilin [13]; co-transfection of the empty expression vector was used as a control. To determine the percentage of differentiated cells following TESK1 overexpression compared with control cells, we counted cells that had at least one neurite larger than the diameter of the cell body after eight days of NGF treatment in each condition. In control cells, we observed that around 60% of the cells were differentiated on the basis of having at least one neurite longer than the diameter of the cell. Similar results were obtained in cells transfected with the inactive TESK1(D170A). However, when cells were transfected with TESK1, only 45% were differentiated (Fig. 1B,C). This suggests that TESK1 inhibits PC12 cell differentiation via inactivation of ADF/cofilin, since the mutant form TESK1(D170A) did not reduce the percentage of differentiated cells.

We also investigated the effect of TESK1 on neuritogenesis by analyzing the length of the neurites of differentiated cells in relation to the diameter of the cell body. We observed that the neurites of differentiated cells following TESK1 overexpression were longer than those of differentiated cells under control conditions. Nearly 25% of the differentiated cells had neurites that were more than 10 times longer than the diameter of the cell body (Fig. 1D). This effect is also seen in PC12 cells expressing profilin I [28], suggesting that once a neurite is established, increased accumulation of F-actin accumulation enhances neurite length.

The mechanism through which TESK1 inhibits differentiation of PC12 cells remains to be elucidated. However, based on the two hybrid interaction described between TESK1 and mSprouty-4 (m-Spry-4) [30], it is tempting to speculate that TESK1 modulates the Ras/Raf/MAPK pathway to suppress cell differentiation, as Spry proteins act as general inhibitors of this pathway [31]. In *Drosophila*, a single Spry protein negatively regulates both FGF and EGF receptor signaling upstream of Ras in

the eye and downstream of Ras in the wing [32-34]. There are four mammalian genes that encode protein homologues of dSpry; the proteins differ in their N-terminal sequences and are known to act as conserved inhibitors of RTK signaling in higher eukaryotes [31]. Notably, hSpry2 inhibits NGF-induced differentiation in PC12 cells, but

when these cells are stimulated with EGF, sustained ERK activation is evident and permits neurite outgrowth and differentiation [35]. Taken together, these results may suggest that inhibition of PC12 cell differentiation by overexpression of TESK1 is due to interference with an activated Ras/Raf/ERK pathway downstream of an RTK.

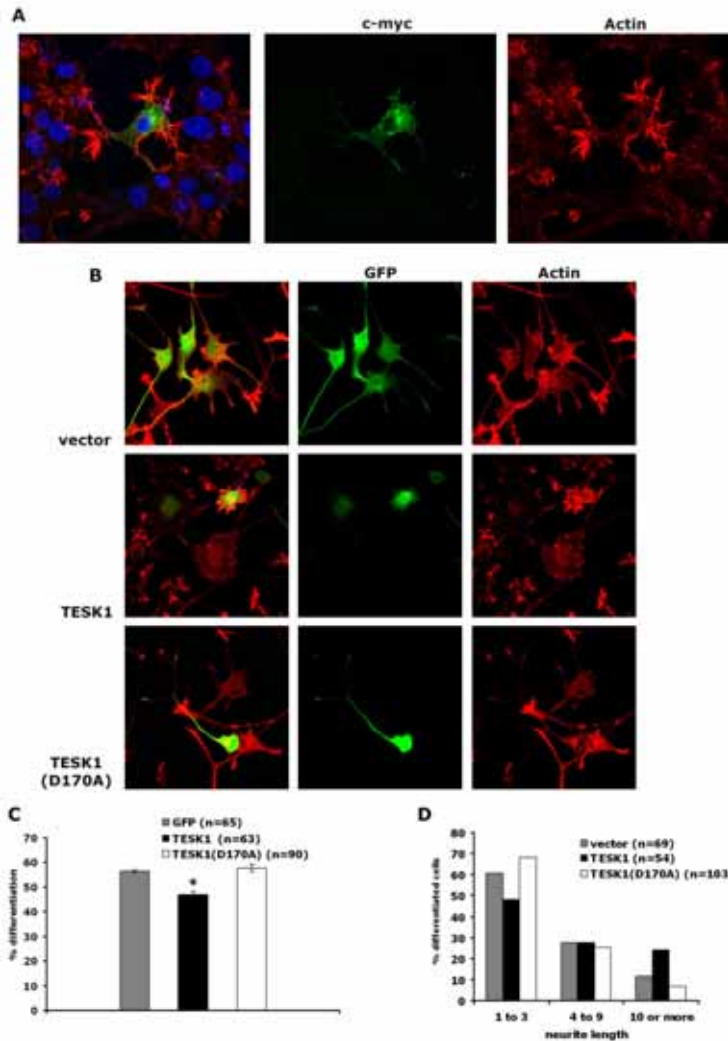


Fig. 1. Effect of TESK1 on PC12 cell differentiation. (A) Phenotype of PC12 cells overexpressing TESK1. Confocal image of a cell transfected with TESK1 (c-myc is shown in green) shows accumulation of actin (red) in the neurites. Nuclei are labeled with DAPI (blue). (B) PC12 cells were transfected with GFP alone, TESK1 + GFP, or TESK1(D170A) + GFP and treated with NGF for 8 days. Then, cells were labeled with phalloidin to reveal the actin cytoskeleton as an indicator of cell differentiation. (C) Percentage of differentiated PC12 cells in cells transfected with TESK1, TESK1(D170A), or a control plasmid. Bars show the mean of three independent experiments. Whiskers indicate standard deviation. (D) Neurite length and percentage of differentiated cells under different differentiation conditions.

3.2. *TESK1* inhibits high levels of ERK-activated signaling but leads to sustained ERK activation

To study the effects of *TESK1* in terms of the activation profile of ERK1/2, we used HEK293T cells because of the high transfection rate shown in that cell line. ERK1 was overexpressed in 293T cells in combination with wild-type *TESK1* protein or the kinase-inactive mutant form of *TESK1*, *TESK1(D170A)*, as a control. Transfected cells were serum deprived for 24 h and then serum was added to the medium. ERK1/2 activity was then analyzed in cell lysates obtained at different time points following serum addition (Fig. 2A). Maximum levels of phosphorylated ERK1/2 were observed after 15 min of serum activation in cells cotransfected with the *TESK1(D170A)* expression construct, whereas cells expressing *TESK1* displayed lower levels of ERK1/2 phosphorylation at the same time point. In contrast, *TESK1*-expressing cells displayed sustained phosphorylation of ERK1/2, since after 60 min of activation the protein was still phosphorylated (Fig. 2A,B), as has been described with 293T cells expressing hSpry2- [35].

The lower ERK activation observed after 15 min of stimulation when cells expressed *TESK1* could be due to interference upstream of Ras activation. To analyze this possibility, we performed a pull-down assay in 293T cells expressing *TESK1* or *TESK1(D170A)*. We observed maximum Ras activation in control cells at 10 min of treatment with serum, whereas in *TESK1*-expressing cells increased Ras activation was observed at 20 min (Fig. 2C). Overexpression of *cdi* in *Drosophila* causes mislocalization of some proteins of the adherens junctional complex, together with altered apical localization of the Sev receptor [10]. This raises the possibility that changes in the position of signal transduction factors in *TESK1*-expressing cells could also occur and interfere with the proper progression of the signal. Signal transduction through the Ras/MAPK pathway has generally been considered to occur at the plasma membrane but it does not represent the only platform for Ras activation [36]. In addition to the plasma membrane, Ras and/or MAPK signaling has now been observed on endosomes, the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus,

and the mitochondria, and it is thought that this compartmentalization provides an explanation for signaling outputs [36]. As an example, the input sensitivity of the Ras/MAPK cascade has been suggested to be determined by subcellular localization of MAPK [37]. It is possible, therefore, that the excess actin polymerization in the cell cortex could be responsible for the failure to transduce the signal due to a mislocalization of certain pathway components.

Recent experiments provide additional evidence for a link between *TESK1* and the signaling cascade. The multidomain scaffold protein paxillin has been reported to facilitate the formation of the Raf/MEK/ERK complex at focal adhesions, where actin filament ends are anchored [38]. It is also known that phosphorylation of paxillin is involved in neurite extension in PC12 cells, as expression of a form of paxillin carrying a mutation in its phosphorylation domain can inhibit PC12 cell differentiation through disruption of focal adhesion complexes involved in recruiting signal transduction factors [39]. In *Drosophila*, the *paxillin* overexpression phenotype is rescued by ectopic *cdi*, and *cdi* has been identified as a target of *paxillin*-mediated Rho GTPase regulation [40]. Altogether, these results support the possibility that cellular architecture is important for correct transduction of signals from the plasma membrane to the cytoplasm.

3.3. *TESK1* promotes S-phase entry in fibroblasts

In order to study the effect of *TESK1* on cell proliferation, we used NIH3T3 fibroblasts since they are more easily synchronized and transfected than other cell models. In a quiescent NIH3T3 culture stimulated with serum-containing media, cells will enter S-phase. These cells require sustained ERK activation for cell cycle progression [8]. NIH3T3 cells were cotransfected with a GFP expression construct in combination with an empty vector or an expression vector containing either wild type *TESK1* protein or *TESK1(D170A)* mutant protein. After serum deprivation, quiescent cells were treated with serum-containing medium and the cell cycle profile was analyzed by FACS. The proportion of cells in S-phase was higher in *TESK1*-expressing cells than in control cells after 15 h serum-

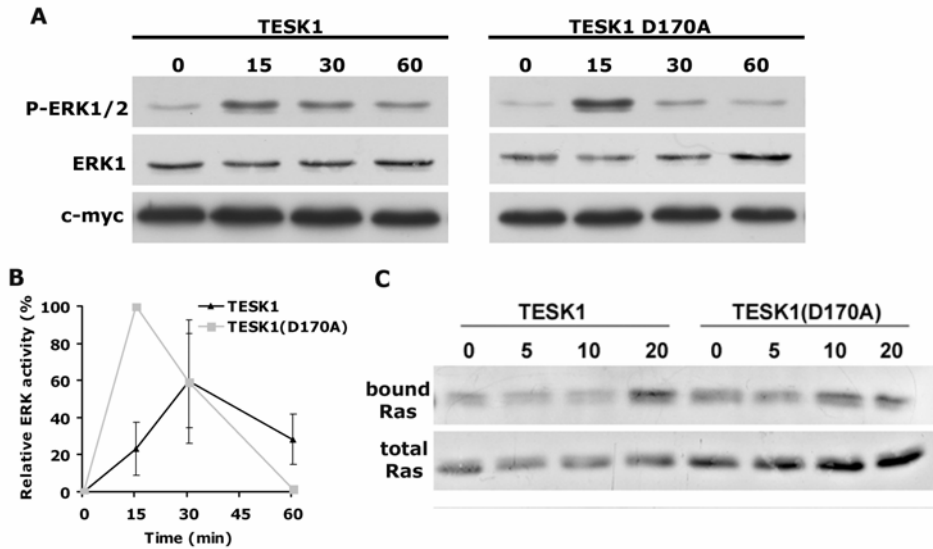


Fig. 2. TESK1 inhibits rapid ERK activation but leads to sustained ERK activation in response to serum induction. (A) 293T cells were cotransfected with an expression construct containing ERK1 and either wild type TESK1 (left panels) or the inactive TESK1(D170A) (right panels). They were then serum starved for 24 h and treated with serum for the indicated time periods. Immunoblotting was performed with total cell extracts using anti-phospho-ERK1/2 to detect activated ERK levels, anti-ERK1 to ensure equivalent transfected protein for each condition, and anti-c-myc to confirm transfection with the TESK1 and TESK1(D170A) constructs. (B) Western blot bands for phospho-ERK were quantified, normalized for the total ERK1 protein, and represented as a percentage of maximal ERK activity (ERK activation for TESK1(D170A) at 15 min stimulation treated as 100%). The graph shows the averages of two separate experiments. Whiskers indicate standard deviation. (C) Pull-down assay to detect the activation profile of Ras in 293T cells transfected with TESK1 or TESK1(D170A).

stimulation (Fig. 3). No changes were observed in G2-M transition (data not shown). These results show that TESK1 facilitates S-phase entry and cell cycle progression. Given that in this study TESK1 overexpression, while preventing high level ERK signaling, led to sustained ERK phosphorylation (Fig.2A), our results are consistent with those of a number of studies showing that sustained ERK activation, and therefore sequential induction of gene expression, correlates with successful S phase entry [8].

G1 cell cycle progression is also regulated by small GTPases such as Rac and Cdc42 through their control of actin cytoskeleton organization [41]. Various growth factor receptors and their downstream substrates are associated with the cytoskeleton and disruption of actin filaments has been reported to interfere with growth factor-induced activation of ERK1/2 or their translocation to the nucleus and the

induction of c-fos expression [42]. This highlights the importance of the actin cytoskeleton for cell cycle progression, perhaps through a role in supporting the signaling transduction complex at the plasma membrane.

4. Concluding remarks

Our results demonstrate that TESK1 is able to suppress a neuronal cell fate in mammalian cells, a finding which is consistent with the effect of its homologous gene *cdi* in *Drosophila*. TESK1 is also able to promote cell cycle progression in fibroblasts and interfere with both the magnitude and duration of ERK activation profile. All of these processes are tightly regulated by actin cytoskeleton turnover and the activation of an RTK pathway, supporting a link between cell shape and signal transduction.

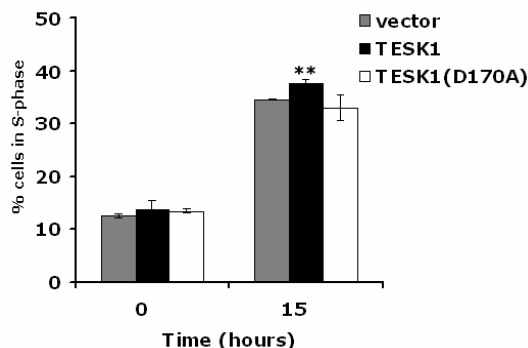


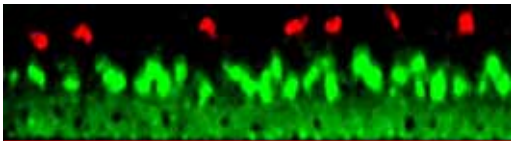
Fig. 3. TESK1 promotes cell cycle progression in NIH 3T3 fibroblasts. The bar chart shows the percentage of cells in S-phase after 36 h serum deprivation (0h) and at 15 h following addition of serum to the medium (15h). Note that more cells entered S-phase at 15 h when overexpressing TESK1 than in control conditions (**). Bars show the mean of three independent experiments. Whiskers indicate standard deviation.

Acknowledgments; We thank K. Mizuno for providing us with the TESK1 and TESK1(D170A) constructs and C. Caelles for the ERK1 construct. We also acknowledge N. Agell and B. Alvarez-Moya for help with the Ras activation experiments and J. Esquerda for comments on PC12 phenotypes. M. S. is the recipient of a fellowship from the Universitat de Barcelona, Spain. This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia and Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (grants BMC2003-05018 and BFU2004-04732).

References

- [1] den Hartigh, J.C., van Bergen en Henegouwen, P.M., Verkleij, A.J. and Boonstra, J.(1992). The EGF receptor is an actin-binding protein. *J Cell Biol.* 119, 349-55.
- [2] Diakonova, M., Payrastra, B., van Velzen, A.G., Hage, W.J., van Bergen en Henegouwen, P.M., Boonstra, J., Cremers, F.F. and Humbel, B.M.(1995). Epidermal growth factor induces rapid and transient association of phospholipase C-gamma 1 with EGF-receptor and filamentous actin at membrane ruffles of A431 cells. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2499-509.
- [3] Fincham, V.J., Unlu, M., Brunton, V.G., Pitts, J.D., Wyke, J.A. and Frame, M.C.(1996). Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J Cell Biol.* 135, 1551-64.
- [4] Payrastra, B., van Bergen en Henegouwen, P.M., Breton, M., den Hartigh, J.C., Plantavid, M., Verkleij, A.J. and Boonstra, J.(1991). Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J Cell Biol.* 115, 121-8.
- [5] Aplin, A.E. and Juliano, R.L.(1999). Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci.* 112 (Pt 5), 695-706.
- [6] Schlessinger, J.(2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103, 211-25.
- [7] Murphy, L.O. and Blenis, J.(2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 31, 268-75.
- [8] Sharrocks, A.D.(2006). Cell cycle: sustained ERK signalling represses the inhibitors. *Curr Biol.* 16, R540-2.
- [9] Raabe, T.(2000). The sevenless signaling pathway: variations of a common theme. *Biochim Biophys Acta.* 1496, 151-63.
- [10] Sesé, M., Corominas, M., Stocker, H., Heino, T.I., Hafen, E. and Serras, F.(2006). The Cdi/TESK1 kinase is required for Sevenless signaling and epithelial organization in the Drosophila eye. *J Cell Sci.* In Press.
- [11] Matthews, B.B. and Crews, S.T.(1999). Drosophila center divider gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA Cell Biol.* 18, 435-48.
- [12] Toshima, J. et al.(1995). Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J Biol Chem.* 270, 31331-7.
- [13] Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K.(2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell.* 12, 1131-45.
- [14] Toshima, J., Tanaka, T. and Mizuno, K.(1999). Dual specificity protein kinase activity of testis-specific protein kinase 1 and its regulation by autophosphorylation of serine-215 within the activation loop. *J Biol Chem.* 274, 12171-6.
- [15] Marshall, C.J.(1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80, 179-85.
- [16] Huff, K., End, D. and Guroff, G.(1981). Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *J Cell Biol.* 88, 189-98.
- [17] Cook, S.J. and McCormick, F.(1996). Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J.* 320 (Pt 1), 237-45.
- [18] Meloche, S., Seuwen, K., Pages, G. and Pouyssegur, J.(1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors:

- correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol.* 6, 845-54.
- [19] Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M.E. and Assoian, R.K.(1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell.* 10, 3197-204.
- [20] Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S. and Nishida, E.(2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol.* 16, 1171-82.
- [21] Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- [22] de Rooij, J. and Bos, J.L.(1997). Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene.* 14, 623-5.
- [23] Gordon-Weeks, P.R.(1987). The cytoskeletons of isolated, neuronal growth cones. *Neuroscience.* 21, 977-89.
- [24] Letourneau, P.C.(1983). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. *J Cell Biol.* 97, 963-73.
- [25] Tanaka, E. and Sabry, J.(1995). Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell.* 83, 171-6.
- [26] da Silva, J.S. and Dotti, C.G.(2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 3, 694-704.
- [27] Higuchi, O., Amano, T., Yang, N. and Mizuno, K.(1997). Inhibition of activated Ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells by the LIM domain of LIM-kinase 1. *Oncogene.* 14, 1819-25.
- [28] Lambrechts, A., Jonckheere, V., Peleman, C., Polet, D., De Vos, W., Vandekerckhove, J. and Ampe, C.(2006). Profilin-I-ligand interactions influence various aspects of neuronal differentiation. *J Cell Sci.* 119, 1570-8.
- [29] Witke, W.(2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14, 461-9.
- [30] Leeksa, O.C. et al.(2002). Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur J Biochem.* 269, 2546-56.
- [31] Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A. and Licht, J.D.(2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol.* 16, 45-54.
- [32] Casci, T., Vinos, J. and Freeman, M.(1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell.* 96, 655-65.
- [33] Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M.A. and Hiromi, Y.(1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development.* 126, 2515-25.
- [34] Reich, A., Sapir, A. and Shilo, B.(1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development.* 126, 4139-47.
- [35] Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Langdon, W.Y. and Guy, G.R.(2002). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *Embo J.* 21, 4796-808.
- [36] Mor, A. and Philips, M.R.(2006). Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol.* 24, 771-800.
- [37] Harding, A., Tian, T., Westbury, E., Frische, E. and Hancock, J.F.(2005). Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol.* 15, 869-73.
- [38] Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X. and Cantley, L.G.(2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell.* 12, 1275-85.
- [39] Huang, C., Borchers, C.H., Schaller, M.D. and Jacobson, K.(2004). Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol.* 164, 593-602.
- [40] Chen, G.C., Turano, B., Ruest, P.J., Hagel, M., Settleman, J. and Thomas, S.M.(2005). Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol.* 25, 979-87.
- [41] Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J. and Hall, A.(1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell.* 87, 519-29.
- [42] van Opstal, A., Bijvelt, J.J., Margadant, C. and Boonstra, J.(2005). Role of signal transduction and actin in G1 phase progression. *Adv Enzyme Regul.* 45, 186-200.



DISCUSSION

Un dels grans reptes en biologia del desenvolupament és entendre com s'integren els senyals intercel·lulars per fer que una cèl·lula adopti un destí específic. L'ull de *Drosophila* és un bon model per analitzar els mecanismes que condueixen a la diferenciació cel·lular. Les vint cèl·lules que constitueixen un ommatidi es determinen per l'activació de l'Egfr, però només vuit d'elles (R1-R8) adquireixen un destí neuronal. Una particularitat d'aquest model és el cas de l'especificació del fotoreceptor R7 que requereix de l'activació d'un altre RTK, Sev (Basler and Hafen, 1988). Sev s'expressa a diverses cèl·lules de l'ommatidi (Banerjee et al., 1987a; Tomlinson et al., 1987) tot i que només aquella cèl·lula que contacta amb el lligand Boss del R8 adoptarà aquest destí neuronal, un procés altament controlat en l'espai i en el temps. Per tant, estudiar els mecanismes que operen en aquesta transducció de senyal pot ajudar a esbrinar les causes per les quals una cèl·lula desencadena una determinada resposta de diferenciació neuronal.

El gen *cdi* va ser identificat en un *screening* genètic de guany de funció per la cerca de reguladors negatius implicats en la via de Sev. *cdi* regula negativament la via mitjançant reorganitzacions del citoesquelet d'actina que generen canvis en l'arquitectura i polaritat apico-basal de la cèl·lula. A més, a través d'alterar l'expressió de *cdi* en un disc imaginal d'ull, s'ha vist que la localització de factors integrals de la via com el receptor Sev queda pertorbada, suggerint un impediment en la comunicació entre lligand i receptor.

Anàlisi de l'*screening*

Des del moment en que la via de Sev es va postular necessària per especificar un sol tipus cel·lular del conjunt de cèl·lules de l'ommatidi s'han fet diversos *screenings* per identificar al·lels que suprimeixin o potenciessin un fenotip de guany o de pèrdua de funció de sev (Dickson et al., 1992; Rogge et al., 1991; Simon et al., 1991). Realitzar *screenings* en fons genètics sensibilitzats permet detectar factors que modulen una via de forma menys dominant. Aquesta Tesi parteix d'un *screening* de guany de funció en un fons genètic *sev*^{S11}. Amb aquest *screening* s'identifiquen gens que suprimeixen la via de Sev activada constitutivament, fet que permet identificar modulacions més refinades sobre aquesta via. És un sistema molt sensible en que s'indueix l'expressió de gens només en el grup d'equivalència de sev, i el fenotip de rescat d'ull rugós per identificar possibles candidats és fàcilment detectable.

De totes les línies EP que es van analitzar, setze d'elles suprimien fortament el fenotip de sev^{S11} (Taula In1). D'entre els resultats obtinguts s'han identificat diversos factors que ens han validat aquest *screening* genètic. Primerament, un dels gens identificat és *yan*, conegut inhibidor transcripcional de la pròpia via de Sev (Lai and

Rubin, 1992; Rebay and Rubin, 1995). Aquest resultat per tant, corrobora que el disseny de l'*screening* és adequat per cercar nous reguladors de la via de Sev.

En segon lloc, hi ha dues fosfatases amb funcions en el sistema nerviós (revisat a Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004), candidates a ser reguladores negatives de la via de Sev: PTP99A i PTP52F. La via de Ras/MAPK activada per Sev és una cascada de fosforilacions que podria ser modulada per alguna d'aquestes proteïnes. S'ha vist per exemple, que la PTP99A s'expressa en totes les cèl·lules del disc imaginal d'ull (Supp. Fig.16), cosa que fa pensar que aquesta fosfatasa té un paper durant el desenvolupament de l'ull.

En tercer lloc es va identificar el gen *Socs36E*. Un transgènic *UAS-Socs36E* recapitula la supressió del fenotip d'ull rugós de *sev*^{S11} observada amb les línies *EP(34-120)* i *EP(47-038)* (Supp. Fig.15). Aquest resultat ens confirma que aquest gen actua com a supressor de la via de Sev. *Socs36E*, per homologia al gen d'humans SOCS-5, és un regulador negatiu de la via de JAK/STAT (Callus and Mathey-Prevot, 2002; Karsten et al., 2002) que està implicada en múltiples esdeveniments durant el desenvolupament. També és sabut que *Socs36E* interacciona amb la via de l'Egfr a l'ala de *Drosophila* (Callus and Mathey-Prevot, 2002), cosa que suggereix que estem davant d'un regulador negatiu més general de les vies RTK.

Finalment, es detecten dues serina/treonina quinases que podrien estar regulant la via de Sev com: *Cyclin-dependent kinase 9 (cdk9)* que codifica per una quinasa nuclear amb funcions en l'elongació transcripcional (Marshall and Price, 1995) i el gen *cdi*.

***cdi* com a supressor de la via de Sev**

D'entre les setze línies que fortament suprimeixen el fenotip de *sev*^{S11} n'hi ha tres que estan inserides a la mateixa regió del genoma, *EP(44-004)*, *EP(33-077)* i *EP(34-165)*. *cdi* és un dels gens flanquejant al punt d'inserció d'aquestes línies. Era ja conegut que *cdi* codifica per una serina/treonina quinasa amb expressió a la línia mitja del sistema nerviós central de l'embrió (Matthews and Crews, 1999). A més, *cdi* havia estat identificat en d'altres *screenings* per la cerca de factors implicats en el desenvolupament neuronal i la guia axonal (Kraut et al., 2001; Muralidhar et al., 1993; Nambu et al., 1990). Per tot això, *cdi* va ser considerat des del primer moment com a principal candidat per a la regulació de la via de Sev d'aquesta regió. Amb la sobreexpressió per *UAS-cdi* a les cèl·lules del grup d'equivalència de *sev* s'observa una reducció en el nombre de R7s per omatidi característic de *sev*^{S11} (Fig. 2, capítol1). Aquest és el resultat que ens confirma que el gen *cdi* és un supressor de la via de Sev.

No obstant això, flanquejant les línies EP d'aquesta regió del genoma hi havia altres gens a considerar com a candidats. Primerament, a 5' de *cdi* hi ha el gen *mRpl55* que va ser localitzat en el genoma per homologia a MRPL55 de mamífers

(Koc et al., 2001) i confirmat com a gen codificant a *Drosophila* (Dimova et al., 2003) després de l'obtenció dels resultats del present *screening*. *mRpL55* codifica per una proteïna ribosomal molt petita amb funcions en la biogènesi mitocondrial i en la progressió G2/M del cicle cel·lular (Tselykh et al., 2005). Per tant, vàrem fer un transgènic *UAS-mRpL55* per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'aquest gen en la via de Sev. El resultat d'activar *UAS-mRpL55* en un fons genètic *sev^{S11}* no evidencia un rescat del fenotip d'ull rugós i per tant, es descarta *mRpL55* com a candidat a la supressió (Supp. Fig.1C).

Segonament, el gen *CG6040* inserit a 5' de les línies EP va ser considerat candidat degut a que la seva transcripció s'indueix quan s'activen les línies EP (Supp. Fig.1B). *CG6040* és un gen sense cap domini predit. Vàrem generar un transgènic *UAS-CG6040* per tal de descartar una contribució d'aquest gen a la supressió de *sev^{S11}*, i es va comprovar que l'expressió d'aquest transgen no manifestava cap rescat en la rugositat (Supp. Fig.1C).

En tercer lloc, una complexitat que presentava aquesta zona era la presència del gen *ATPsyn-d* inserit a 3' de les línies EP però orientat en sentit contrari. Així, en induir l'activació transcripcional de les línies EP es podria generar un RNA anti-sentit causant una pèrdua de funció d'aquest gen. Amb l'experiment de la caracterització molecular per RT-PCR de les línies EP es comprova que la quantitat de transcrit *ATPsyn-d* no varia (Supp. Fig.1B). Això vol dir que no s'està generant cap mutant hipomorf d'aquest gen que pugui causar la supressió de la via de Sev.

En resum, hem demostrat que *cdi* és un regulador negatiu de la via de Sev. La seva implicació en modular aquesta via queda corroborada quan s'activa *UAS-cdi* en un fons genètic en que el lligand de la via, *boss*, està sobreexpressat (Fig. 2, capítol1). A part, sabem que l'activació de *UAS-cdi* o de les línies EP d'aquesta zona no suprimeixen un guany de funció de la proteïna Ras ni del seu efector Raf (Supp. Fig.11 i Taula-In2). Per tant, la supressió de *cdi* a la via de Sev s'efectua a nivell de membrana plasmàtica per sobre de Ras.

***cdi* com a modulador en altres sistemes**

Havent identificat *cdi* com a regulador negatiu d'una via Ras/MAPK vàrem decidir analitzar la funció d'aquest gen en altres sistemes. Per fer això, es van escollir dos models diferents: l'ala de *Drosophila* i el sistema de cèl·lules en cultiu de mamífer.

En analitzar el patró d'expressió de *cdi* en el disc imaginal d'ala s'observa una expressió per totes les cèl·lules d'aquest epiteli (Supp. Fig.12), suggerint que *cdi* té una funció durant el desenvolupament d'aquesta estructura. La diferenciació cel·lular de les venes longitudinals de l'ala de *Drosophila* ve determinada per l'activació de les vies de l'Egfr i Decapentaplegic a les regions específiques de provena (revisat a De Celis, 2003). Així doncs, un al·lel de guany de funció de l'Egfr (*Elp^{B1}*) resulta en l'aparició de

teixit venós ectòpic (Supp. Fig.14A). En canvi, una pèrdua de funció de l'Egfr (top^1/top^{3C81}) presenta un fenotip de venes truncades. Per tant, la nostra hipòtesi és que si *cdi* suprimeix la via de Sev activada, també serà capaç de regular negativament la via de l'Egfr durant la determinació de les venes de l'ala. En aquest sentit, s'ha observat que la sobreexpressió de *cdi* a l'ala suprimeix en un 20% dels casos el fenotip associat a l'al·lel *Elp^{B1}* (Supp. Fig.14A). Per altra banda, la pèrdua de funció de *cdi* en heterozigosi ($cdi^{R47/+}$) provoca un potenciament en un 11% dels casos del fenotip *Elp^{B1}* (Supp. Fig.14B). En base a aquests resultats, es conclou que *cdi* també actua com un modulador de la via de l'Egfr durant el desenvolupament de l'ala. Així, es podria pensar que la pèrdua de funció de *cdi* rescataria una pèrdua de funció de l'Egfr, però no hem observat un rescat del fenotip associat a la combinació heteroal·lèlica top^1/top^{3C81} . Això possiblement és degut a que els efectes de *cdi* es manifesten quan una via RTK està hiperactivada, però en canvi no es veu una interacció quan la via està disminuïda. Relacionat amb això, s'ha observat que una sobreexpressió de *cdi* a l'ala provoca la desaparició de les venes transversals, però en cap cas desapareixen les venes longitudinals (Supp. Fig.14A). També, una sobreexpressió de *cdi* a l'ull només afecta la desaparició del R7 en menys d'un 5% dels omatidis (Fig. 2, capítol1). Per tant, aquestes observacions suggereixen que *cdi* modula la via de Ras/MAPK, tot i que els seus efectes són més evidents en un fons genètic sensibilitzat. És per això que *cdi* s'ha identificat a partir d'un *screening* de guany de funció quan la via està sobreactivada amb l'al·lel *sev^{S11}*. Cal esmentar en aquest punt que un guany de funció d'un regulador negatiu de les vies RTK tant conegut i estudiat com és *sprouty* provoca la desaparició del R7 en només un 11% dels omatidis (Kramer et al., 1999), tot i així, en un fons sensibilitzat per un guany de funció de l'Egfr, aquest gen es manifesta com un potent regulador negatiu (Casici et al., 1999; Kramer et al., 1999).

Una altra aproximació per estudiar l'efecte de *cdi* sobre una activació de la via Ras/MAPK és analitzar la funció del seu homòleg, TESK1, en el model de cèl·lules en cultiu de mamífer. S'ha vist que la sobreexpressió de TESK1 en cèl·lules HEK293 provoca una disminució en la magnitud de l'activació de ERK (o MAPK) (Fig.2, capítol2). A part, TESK1 també provoca un retard en l'activació de la GTPasa Ras (Fig.2, capítol2). D'aquests resultats deduïm que TESK1, tal i com ho fa *cdi* a *Drosophila*, interacciona amb la via de Ras/MAPK i que a més ho fa a nivell de membrana plasmàtica. A part, TESK1 també promou una resposta sostinguda de l'activació de ERK (Fig. 2, capítol2). És sabut que per la progressió G1/S del cycle cel·lular en cèl·lules de fibroblasts NIH3T3 es requereix una activació de ERK sostinguda per promoure la transcripció dels gens primerencs encarregats del cycle cel·lular, com la ciclinaD1 o c-fos (Meloche et al., 1992; Roovers et al., 1999; Yamamoto et al., 2006). En testar l'efecte de TESK1 en el cycle cel·lular d'aquesta línia veiem que hi ha una entrada a la fase S més ràpida que en cèl·lules control (Fig. 3,

capítol2). Està clar que no podem assegurar que aquest resultat sigui efecte directe de la interacció entre TESK1 i la via Ras/MAPK. No obstant, és ben sabut que el citoesquelet d'actina està implicat en processos de cycle cel·lular, i quan aquest està desestructurat la progressió G1/S no es dona correctament (revisat a van Opstal et al., 2005). Un exemple en aquest sentit és el cas de la *small GTPasa* RhoE que inhibeix la progressió del cycle cel·lular en cèl·lules NIH3T3 (Villalonga et al., 2004). Aquest és un efecte contrari al que observem amb TESK1, i és que sembla que les funcions de les dues proteïnes serien antagòniques: mentre que TESK1 s'encarrega de formar adhesions focals i fibres d'estrés a les cèl·lules en cultiu (Toshima et al., 2001a), RhoE provoca un desensamblatge d'aquestes estructures ja que és un inhibidor de la quinasa ROCK (Villalonga et al., 2004), que és un típic efector de les *small GTPases* com RhoA (revisat a BurrIDGE and Wennerberg, 2004).

En resum, ha quedat demostrada la capacitat de TESK1 i de *cdi* en regular altres vies RTKs que propaguen la transducció de senyal de Ras/MAPK.

***cdi* en la reorganització del citoesquelet d'actina**

TESK1 té la funció de fosforilar per tal d'inactivar la ADF/Cofilina a mamífers (Toshima et al., 2001a) (Fig. Dis1). Això provoca un acúmul d'actina polimeritzada acompanyat de la formació de fibres d'estrés i adhesions focals (Toshima et al., 2001a). En el segon capítol d'aquesta Tesi s'ha demostrat que cèl·lules PC12 que sobreexpressen TESK1 acumulen filaments d'actina, sobretot als cons de creixement de les neurites (Fig.1, capítol2). A part, una sobreexpressió de TESK1 provoca una inhibició de la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12 induïdes amb NGF (Fig. 1, capítol2). Aquest resultat concorda molt bé amb el fet que *cdi* és supressor de la via de Sev, via encarregada de determinar la cèl·lula neuronal R7 en l'omatidi de *Drosophila*. Per altra banda, una sobreexpressió de la construcció TESK1(D170A), incapaç de fosforilar la ADF/Cofilina, no afecta a la diferenciació de cèl·lules PC12 (Fig. 1, capítol2). Per tant, es suggereix que la supressió que TESK1 i *cdi* efectuen sobre una via de determinació cel·lular és impulsada per les reorganitzacions del citoesquelet d'actina mitjançant la inhibició de la ADF/Cofilina.

Els dominis quinasa dels gens *cdi* i TESK1 comparteixen un 61% d'homologia (Matthews and Crews, 1999) (Fig. In6), però encara ningú havia demostrat que *cdi* fa la mateixa funció que TESK1 en quan a la reorganització del citoesquelet d'actina a *Drosophila*. Amb l'activació d'un transgènic *UAS-cdi* en el compartiment posterior del disc imaginal d'ala s'observa una acumulació d'actina polimeritzada en aquest compartiment (Supp. Fig.13), fet que suggereix que *cdi* funciona igual que TESK1 de mamífers fosforilant a *twinstar*, l'homòleg a *Drosophila* de ADF/Cofilina. Si més no, un guany de funció de *cdi* es manifesta en un augment de F-actina a la cèl·lula.

Així, un dels propòsits d'aquest treball era analitzar si l'efecte de *cdi* sobre la regulació de la via de Sev és o no independent de la seva implicació sobre la regulació del citoesquelet d'actina. Cal recordar que ADF/Cofilina, el factor despolimeritzador de l'actina, s'activa per les fosfatases Chronophin i SSH (Gohla et al., 2005; Niwa et al., 2002), i s'inhibeix per les quinases TESK1 i LIMK (Arber et al., 1998; Toshima et al., 2001a) (Fig. Dis1). Primerament, una combinació heteroal·lèlica de mutants hipomorfs de *twinstar* (tsr^2/tsr^{nff}) en combinació amb *sev*^{S11} mostra un rescat significatiu en quan a nombre de R7s per omatidi (Supp. Fig.9). En segon lloc, una pèrdua de funció per RNA d'interferència de la proteïna que desfosforila la ADF/Cofilina, Ssh, suprimeix el fenotip de *sev*^{S11} d'una manera evident (Fig. 6, capítol1). Així doncs, la modulació de la via de Sev per part de *cdi* es deu al seu efecte sobre la inhibició de la ADF/Cofilina, i per tant a la seva funció en l'ensamblatge/desensamblatge del citoesquelet d'actina.

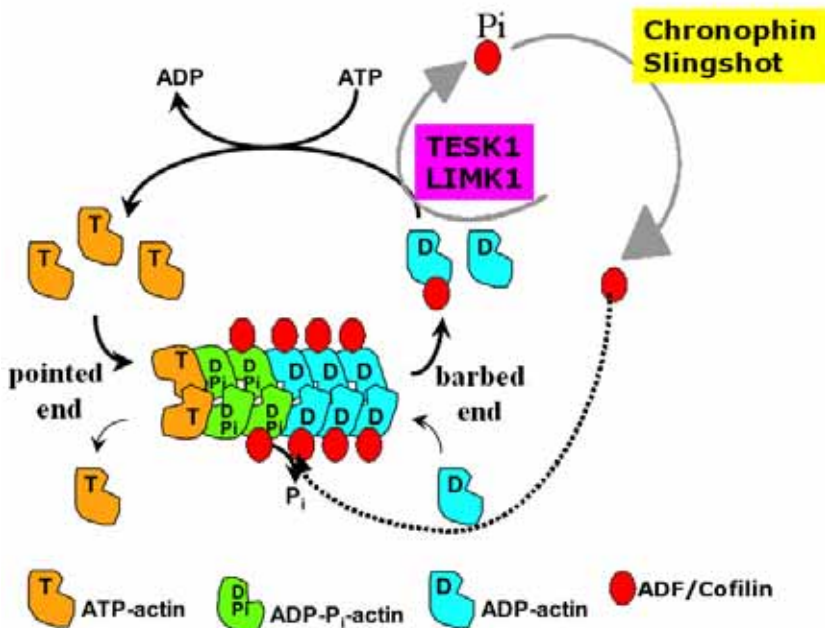


Fig. Dis1. Regulació de ADF/Cofilina en la seva funció de despolimeritzar els filaments d'actina. Ssh i de Chronophin són les fosfatases que activen la ADF/Cofilina. TESK1 i LIMK fosforilen la ADF/Cofilina per inactivar-la (adaptat de Gungabissoon and Bamberg, 2003).

En el disc imaginal d'ull la pèrdua de funció de la fosfatasa Ssh provoca un acúmulo d'actina polimeritzada (Niwa et al., 2002), i cèl·lules que sobreexpressen *cdi* també tenen més F-actina, sobretot a la part apical dels omatidis en desenvolupament (Fig. 4, capítol1). Recentment s'ha publicat que la proteïna Ssh colocalitza amb el receptor Sev a la part apical dels fotoreceptors en desenvolupament (Fig. Dis2A), i que

aquesta localització de Ssh depèn de l'activació dels RTKs Egfr i Sev en aquestes cèl·lules (Rogers et al., 2005) (Fig. Dis2C). Cdi, tot i que s'expressa al citoplasma de totes les cèl·lules del disc, també s'acumula en aquest mateix domini apical dels fotoreceptors (Fig. 3, capítol1). A més és sabut que en un context de cèl·lules en cultiu de mamífer, SSH té la capacitat de revertir l'acumulació d'actina que produeix una sobreexpressió de TESK1 (Niwa et al., 2002). Amb tot això es proposa que Cdi i Ssh són les proteïnes que treballen conjuntament per controlar les reorganitzacions del citoesquelet d'actina necessàries per una correcta determinació dels fotoreceptors en el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*.

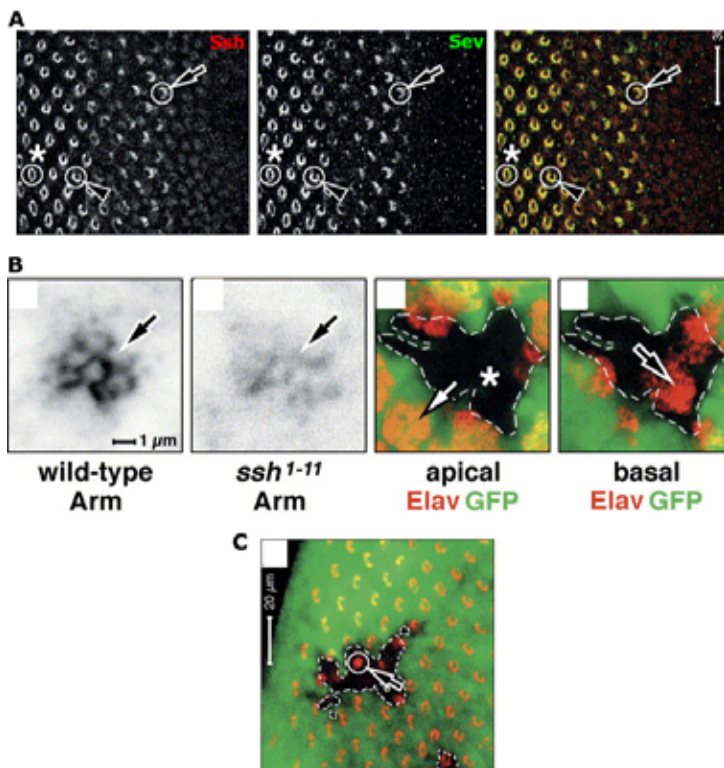


Fig. Dis2. (A) Patró d'expressió de Ssh en el disc d'ull (vermell). Aquesta proteïna col-localitza amb Sev (verd). (B) Clons de pèrdua de funció de *ssh* mostren que la β -catenina (Arm) està difosa (esquerra) i que els nuclis dels fotoreceptors marcats amb Elav ocupen una posició basal en cèl·lules mutants (dreta). (C) Clons de pèrdua de funció de *ssh* (en negre) mostren que la localització de Sev està alterada (fletxa) (adaptat de Rogers et al., 2005).

Per altra banda, no s'ha pogut demostrar que una sobreexpressió de *dLimk* en el grup d'equivalència de *sev* suprimeixi el fenotip de *sev*^{S11} (Supp. Fig.8). Això suggereix que *dLimk* no es requereix pel correcte funcionament de la via de Sev. *dLimk* s'expressa uniformement per tot el disc imaginal d'ull però no es coneix la seva

localització subcel·lular en aquest teixit (Chen et al., 2004). S'ha descrit que *dLimk* està implicada en la correcta organització i orientació dels pèls en l'ala, és a dir que té una funció en l'establiment de la polaritat planar (Blair et al., 2006). Això concorda amb que formes dominant negatives de les *small GTPases* Rho i Rac no afecten al nombre de fotoreceptors, sinó que afecten més a la orientació dels omatidis en l'ull adult, és a dir, s'encarreguen també d'establir i preservar la polaritat planar (Fanto et al., 2000). A mamífers s'han descrit les diferències entre LIMK1 i TESK1 pel que fa a la seva activació. Mentre que la LIMK1 s'activaria per la via de les *small GTPases* Rac i Rho, TESK1 seria un efector de la via de les integrines (Toshima et al., 2001a) (Fig. Dis3). A part, l'estructura proteica del domini extracatalític és diferent entre ambdues proteïnes (Toshima et al., 1995) indicant que es requereixen per funcions diferents (Fig. Dis3). El domini ric en prolines de TESK1 és susceptible d'unir-se a proteïnes amb dominis SH3. Són varis els factors implicats en vies de senyalització que tenen dominis SH3 d'unió proteïna-proteïna com Src, Abl, Grb2 (revisat a Cohen et al., 1995). Es pot especular que aquest seria un domini important per la regulació de la via de Sev observada amb *cdi*, ja que el domini de prolines podria segrestar factors importants per la transducció del senyal impedit-ne l'activació.

Per tant, durant el desenvolupament de l'ull el factor dLimk s'encarregaria de preservar l'orientació dels omatidis, mentre que les proteïnes Cdi i Ssh es requeririen per les reorganitzacions del citoesquelet d'actina a la part apical dels fotoreceptors necessàries per regular la via de Sev.

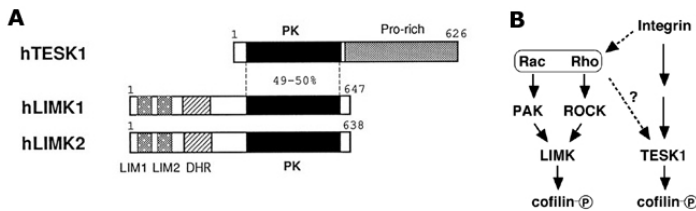


Fig. Dis3. (A) Respresentació dels dominis proteics de les proteïnes d'humans TESK1, LIMK1 i LIMK2 (Toshima et al., 1995). Aquestes proteïnes comparteixen el domini quinasa però difereixen en els seus dominis extracatalítics (B) Vies per les quals es suggereix que s'activen les proteïnes TESK1 i LIMK a mamífers (Toshima et al., 2001a).

***cdi* en el disc imaginal d'ull. Efecte en la polaritat apico-basal**

L'al·lel *cdi^{R47}* utilitzat per estudis de pèrdua de funció de *cdi* és letal durant el primer estadi larvari (Matthews and Crews, 1999). És una deleció seqüenciada en el nostre laboratori i caracteritzada molecularment, on vàrem veure que afectava a la transcripció de dos gens: *cdi* i *mRpL55* (Supp. Fig. 2). Durant aquesta Tesi Doctoral s'han seguit varies estratègies per disposar d'una mutació puntual de *cdi*. Els elements-P inserits en

la seqüència genòmica de *cdi* descrits a l'inici d'aquest treball estaven localitzats a la regió 5' no codificant del gen, i tenint en compte que *mRpL55* està situat només 34bp a 5' de *cdi*, no vàrem considerar la possibilitat de fer escissions imprecises d'aquests elements-P per obtenir una mutació en el gen *cdi*, degut a la dificultat d'aconseguir mutants que no afectessin també a la proteïna ribosomal. Per altra banda es va idear un mecanisme per generar mutacions puntuals per EMS. Es van mutagenitzar les mosques *EP(33-077)* que es van encreuar amb *sev^{S11}*. En analitzar la descendència, si s'hagués produït una mutació en el gen *cdi*, mosques *EP(33-077)* mutades ja no suprimirien el fenotip d'ull rugós de *sev^{S11}*. Es van cribrar 2.550 mascles de la descendència i dos d'ells no suprimien l'ull rugós de *sev^{S11}*. Malgrat això, es va descartar que fossin mutants de *cdi* ja que eren letals entre ells però complementaven tant amb la deleció *cdi^{R47}* com amb una altra de més gran que cobreix tota la zona, la deleció de *DrosDel ED2*. Per tant, es va decidir tenir l'al·lel *cdi^{R47}* ben caracteritzat i tots els estudis fets en disc imaginal s'han suplementat amb un *UAS-mRpL55* que en restaura la funció.

Una anàlisi clonal realitzada en disc imaginal d'ala revela que *cdi* afecta a la mida dels clons, que són més petits que els seus clons germans (Supp. Fig.3). Un estudi més detallat mostra que *cdi* no afecta a la proliferació però en canvi, un marcatge amb la tècnica de Tunel evidencia que hi ha mort cel·lular associada al clon de cèl·lules mutants (Supp. Fig.3). Recentment s'ha publicat que *mRpL55* està implicat en la progressió del cicle cel·lular durant estadis pupals (Tselykh et al., 2005). Estudis en disc imaginal d'ala mostren que tant *cdi* com *mRpL55* són necessaris per la viabilitat cel·lular durant l'estadi larvari, ja que la mida dels clons mutants *cdi^{R47}* només es pot restaurar en la seva totalitat quan s'hi sobreexpressen *UAS-cdi* i *UAS-mRpL55* conjuntament (Supp. Fig. 4). Així, una de les primeres evidències en quan a la funció de *cdi* és que és un gen important per mantenir la viabilitat cel·lular.

Estudis en disc imaginal d'ull mostren que la pèrdua de funció de *cdi* provoca una desestructuració del citoesquelet d'actina cortical a les cèl·lules mutants (Fig. 5, capítol1). Contràriament, la sobreexpressió de *cdi* promou un augment d'actina polimeritzada, sobretot a la part apical del disc (Fig.4, capítol1). Aquests resultats, juntament amb el fet que la proteïna Cdi s'acumula a les puntes apicals dels fotoreceptors, indiquen que l'alteració de l'expressió de *cdi* generarà defectes en aquest domini apical de les cèl·lules.

El disc imaginal d'ull és un epitelí on les cèl·lules s'organitzen amb la finalitat d'integrar correctament els senyals que reben per dur a terme la seva determinació. El grup de precursors neuronals canvia la seva polaritat en l'eix apico-basal, de manera que els nuclis dels fotoreceptors que s'han d'anar reclutant s'ubiquen a la cara apical del disc (revisat a Wolff and Ready, 1993) (Fig. Dis5A). Aquests canvis en la polaritat són els responsables que el receptor Sev de la cèl·lula precursora R7 i el lligand Boss

de la cèl·lula R8 es trobin i es transdueixi el senyal. És en aquesta zona més apical on s'estableixen les unions adherents, que de forma mecànica mantenen les cèl·lules en contacte. Els nostres resultats mostren que, tant amb el guany com amb la pèrdua de funció de *cdi* el complex de les unions adherents es veu desplaçat vers una posició més basal en l'epiteli (Fig. 4 i 5, capítol 1). Aquesta conclusió s'extreu del fet que, en ambdues situacions les proteïnes E-cadherina i β -catenina queden desplaçades cap a una posició més basal en omatidis mutants (Fig. 4 i 5, article 1). En aquest sentit, s'ha vist que una pèrdua de funció de *ssh* també provoca una alteració en la localització de la β -catenina que es veu difosa (Rogers et al., 2005) (Fig. Dis2B). A més, els nuclis dels fotoreceptors mutants *ssh* també es desplacen a una posició més basal en el disc (Rogers et al., 2005) (Fig. Dis2B). Nosaltres hem observat que els nuclis dels fotoreceptors R7 marcats amb Prospero en omatidis mutants per *cdi* també es localitzen a una posició més basal del disc d'ull (Supp. Fig.7). Tot això suggereix que Cdi és responsable de mantenir els contactes cèl·lula-cèl·lula íntegres juntament amb Ssh, i que canvis en la l'estructura de l'actina cortical generen alteracions en la polaritat apico-basal dels fotoreceptors en desenvolupament.

Per altra banda, s'ha vist que la proteïna Crumbs no es desplaça en l'eix apico-basal en un guany de funció de *cdi* (Supp. Fig.5). El complex de Crumbs es localitza a la part més apical de les cèl·lules de l'omatidi (revisat a Tepass et al., 2001) i estimula la formació i manteniment de les unions adherents en els fotoreceptors (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002) (Fig. Dis4). S'ha estudiat que Crumbs és necessari per l'elongació del rabdòmer dels fotoreceptors durant la pupació i en l'adult (Fig. Dis4), però no afecta al nombre de fotoreceptors en l'omatidi (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002). Se sap, per altra banda, que la β H-spectrin, proteïna encarregada de la

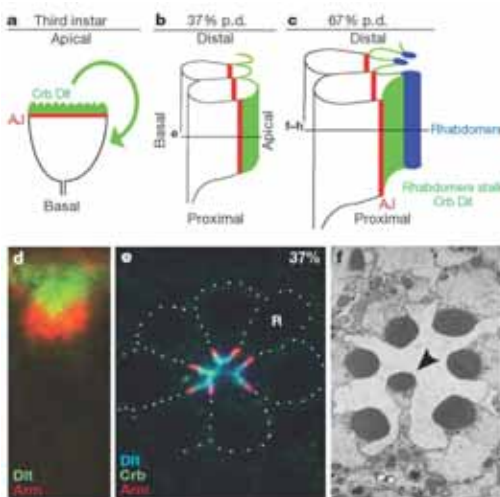


Fig. Dis4. (a i d) Localització de la proteïna Crumbs (verd) comparat amb la posició de β -catenina (Arm, vermell) en el disc imaginal d'ull. (b i e) Esquema d'un fotoreceptor durant l'estadi pupal en que la cèl·lula gira 90° i la part apical ara queda lateral. (c i f) La part apical del fotoreceptor és el que formarà el rabdòmer d'un fotoreceptor en l'ull adult (blau) (adaptat de Izaddoost et al., 2002).

formació dels complexos d'adhesió i que colocalitza amb la E-cadherina en el disc imaginal d'ull, presenta un fenotip de pèrdua de R7 per omatidi (Thomas et al., 1998). També s'ha estudiat que *Crumbs* és capaç de alterar la localització de la β_H -spectrin durant el procés d'elongació del rabdòmer però en el disc imaginal de larva III, una pèrdua de funció de *crumbs* no altera la posició a la part apical de la β_H -spectrin (Pellikka et al., 2002). Amb aquestes dades es pot pensar que la sobreexpressió de *cdi* altera la localització de les unions adherents independentment de la posició de *Crumbs*. Per altra banda, *cdi* a part de modificar la posició de les proteïnes encarregades de la comunicació cel·lular, també podria afectar a la localització d'altres factors lligats a la membrana. Un altre gen involucrat en la formació de patró del grup de cèl·lules de l'omatidi, *hindsight*, s'encarrega de mantenir correctament les proteïnes de la part apical dels fotoreceptors ja que en mutants *hindsight* el lligand Boss s'acumula menys a la part apical del R8 (Pickup et al., 2002). En el present treball es mostra que en una pèrdua de funció de *cdi*, Boss es localitza a una posició més basal del disc (Supp. Fig. 6). Aquest conjunt d'evidències suggereixen que el manteniment i localització de la unions adherents són importants per la posició dels factors de membrana implicats en la via de transducció.

Un dels resultats més informatiu obtingut en aquest treball és que la localització del receptor Sev també canvia vers una posició més basal en l'eix apico-basal de les cèl·lules del grup d'equivalència de *sev* (Fig. 7, capítol1). Això succeeix tant en un guany com en una pèrdua de funció de *cdi*. A part, la pèrdua de funció de *cdi* també fa disminuir la quantitat de proteïna Sev a la membrana, possiblement degut a la mort cel·lular que s'indueix en aquests clons mutants. Nombrosos estudis han anat dirigits a estudiar l'expressió i localització del receptor Sev (Tomlinson et al., 1987) (Fig. Dis5C) i del seu lligand Boss (Kramer et al., 1991) per tal d'arribar a la conclusió que la posició que ocupen aquests dos factors és essencial per tal que entrin en contacte en el moment de la determinació del R7. A part, se sap que quan el receptor Sev truncat *sev^{S11}* s'expressa en una cèl·lula també es localitza polaritzat a la part apical de la cèl·lula (Basler et al., 1991), perquè és on es diposita i s'aguanta tota la maquinària de transducció que requereix. Així que en absència de lligand, per tal que la via de la determinació del R7 funcioni acuradament el receptor (*sev^{S11}*) s'ha de localitzar prop de les unions adherents igualment. Per tant, tot això suggereix que *cdi* suprimeix el fenotip *sev^{S11}* mitjançant un canvi en la localització subcel·lular del receptor, cosa que pot estar impedit que la via de transducció de Ras/MAPK no es desencadeni a un llinar d'activació prou elevat com per fer que un R7 es determini.

En resum, reorganitzacions del citoesquelet d'actina cortical promogudes per la sobreexpressió de *cdi* generen canvis en la localització dels factors encarregats de la transducció del senyal de Sev, en especial el propi receptor que es localitza a una posició més basal en la cèl·lula receptora del senyal. Aquestes variacions en

l'arquitectura cel·lular poden dificultar que receptor i lligand es trobin en l'espai i en el temps idoni per la determinació del fotoreceptor R7 (Fig. Dis5D). També, un acúmulo d'actina cortical podria fins i tot impedir el correcte ensamblatge a la membrana de tota la maquinària transduccional (Fig. Dis5D). El conjunt d'aquests defectes en l'estructura cel·lular dins l'omatidi en desenvolupament fan que no sigui suficient el llinard d'activació de la via Ras/Raf/MAPK necessari per determinar un fotoreceptor R7.

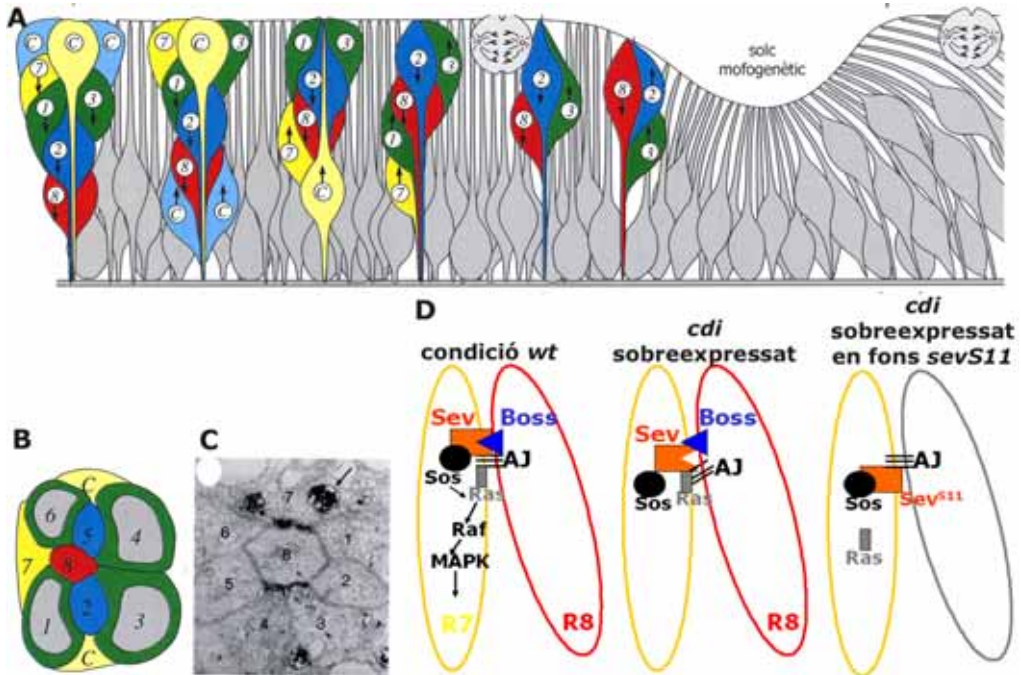


Fig Dis5. (A) Esquema d'un tall longitudinal d'un disc en d'ull en desenvolupament (posterior a l'esquerra). Es representen diferents estadis de la determinació dels fotoreceptors. Els nuclis d'aquestes cèl·lules migren cap a una posició més apical del disc quan han de ser especificats (adaptat de Wolff and Ready, 1993). (B) Tall transversal d'un ommatidi en el moment de la determinació del R7. Les membranes de les cèl·lules R7 i R8 entren en contacte per tal que lligand i receptor es comuniquin (adaptat de Wolff and Ready, 1993). (C) Imatge de microscopia electrònica d'un ommatidi en desenvolupament marcat amb un anticòs contra la proteïna Sev. Es pot veure que Sev es localitza a les membranes dels R3, R4 i R7 (Tomlinson et al., 1987). (D) Model proposat que explica la supressió de la via de Sev per part de *cdi*. En la condició control (*wt*) es veu com Sev i Boss entren en contacte per desencadenar la transducció del senyal. Quan se sobreexpressa *cdi* al precursor del R7 pot ocórrer una alteració en la localització del receptor i provocar que Sev, que ha d'estar a la mateixa posició que les unions adherents (AJ), no faci contacte amb Boss i per tant, que el R7 no es determini. En una condició en fons genètic *sev^{S11}* i *cdi* sobreexpressat el receptor pot estar erròniament localitzat a la membrana de manera que no tota la maquinària de transducció es podrà reclutar amb el receptor activat. Pot succeir també que un excés d'actina polimeritzada en el córtex de la cèl·lula que sobreexpressa *cdi* pugui causar un impediment per tal que proteïnes com Ras es localitzin a la membrana per tal de ser activades. Així, una sobreexpressió de *cdi* modula la via de Sev provocant que no es transdueixi el senyal a un llinard apropiat per la determinació d'un R7.

***cdi*: consideracions globals**

Tots els factors descrits que interaccionen amb *cdi* a *Drosophila* o bé que inhibeixen el domini tirosina quinasa de TESK1 a mamífers es relacionen amb les vies de transducció de Ras/MAPK. En primer lloc, la proteïna de mamífers Paxillin té la funció de reclutar a membrana adaptadors i altres molècules de senyalització que permeten propagar els senyals. La via de Ras/Raf/MAPK és una d'elles, i així es facilita l'activació de ERK quan Paxillin ho recluta tot en un mateix complexe (revisat a Yoon and Seger, 2006). A *Drosophila*, un guany de funció de *paxillin* es manifesta en un fenotip de teixit venós extra a les ales (Chen et al., 2005), contrari a l'observat per *cdi* en aquest sistema (Supp. Fig. 14). Més interessant és el fet que un guany de funció de *cdi* suprimeix el fenotip del guany de funció de *paxillin* (Chen et al., 2005). Per tant, *cdi* pot funcionar regulant el reclutament a membrana de la maquinària transduccional.

En segon lloc, s'ha descrit una interacció per *two hybrids* d'embrió de *Drosophila* entre Cdi i Merlin (<http://pim.hybrigenics.com>). Merlin forma part d'un complexe d'adhesió cel·lular necessari per integrar senyals estimuladores o inhibidores del creixement, a través de receptors com l'Egfr o de molècules d'adhesió com les cadherines (revisat a Edgar, 2006). Curiosament, Merlin es localitza en els dominis apicals dels fotoreceptors en el disc imaginal d'ull (McCartney and Fehon, 1996) (Fig. Dis6), domini on també s'expressa Cdi (Fig. 3, capítol2). Merlin actua promovent l'endocitosi de receptors (Maitra et al., 2006) i Cdi podria estar ajudant al reciclatge dels RTKs, conegut mecanisme per fer minvar una via de transducció de senyal.

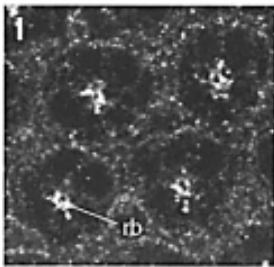


Fig. Dis6. Patró d'expressió de Merlin en el disc imaginal d'ull. Un anticòs contra aquesta proteïna revela que la seva expressió és a la part apical per on els fotoreceptors s'uneixen (McCartney and Fehon, 1996).

En tercer lloc, és sabut que les proteïnes 14-3-3 són adaptadores de moltes vies de senyalització modulant l'activitat, estabilitat i localització subcel·lular dels seus components (revisat a Muslin and Xing, 2000). Aquestes proteïnes s'han vist associades a les integrines en els complexos de les adhesions focals. A part, es coneix que hi ha proteïnes 14-3-3 que poden interaccionar amb la quinasa Raf1 (revisat a Muslin and Xing, 2000). Un estudi revela que 14-3-3 β s'uneix a TESK1 en mamífers amb funcions de reclutar-lo a la perifèria cel·lular, prop del complexe de les integrines on TESK1 es pot activar (Toshima et al., 2001c). Per altra banda, 14-3-3 β és capaç d'inhibir l'activitat quinasa de TESK1 (Toshima et al., 2001c). Es pot hipotetitzar que 14-

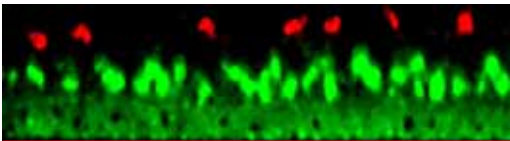
3-3 inhibeix TESK1 al córtex cel·lular per ajudar a que l'actina es despolimeritzi en aquestes zones i facilitar el reclutament a membrana dels components d'una via de senyalització.

L'activitat quinasa de TESK1 també es regula per mSprouty-4 (Tsumura et al., 2005). Les proteïnes Sprouty són supressores de les vies RTK tot i que el seu mecanisme d'acció és controversial, degut a que es coneix que Sprouty pot estar actuant a varis nivells de la via Ras/MAPK ja que se li coneixen diversos *partners* (revisat a Mason et al., 2006). No obstant, en interaccions genètiques realitzades en ala de *Drosophila* no hem vist interacció entre *sty* i *cdi* a *Drosophila*.

Totes aquestes evidències fan pensar que *cdi*, a part de controlar la localització de Sev, també actua regulant la localització de factors que integren la via de transducció de senyal. Per tal que es doni una resposta cel·lular concreta dependrà de la magnitud i durada de la via Ras/MAPK, controlades per la posició i reclutament del complexe de transducció a un compartiment cel·lular concret (revisat a Ebisuya et al., 2005) En aquest sentit, experiments fets en fibroblasts de mamífer mostren que Ras activat a la membrana plasmàtica genera una resposta d'activació d'ERK ràpida i transitòria, mentre que una activació a golgi de Ras provoca una resposta més sostinguda (revisat a Quatela and Philips, 2006). La compartimentalització del senyal de Ras està molt regulada, com també ho està la dels altres factors que integren la via. Un segon exemple és el cas de SOS, un dels factors essencials per la transducció de senyal de Sev, i extensible a la dels RTKs en general. Aquesta proteïna s'encarrega d'activar a Ras i també Rac a la membrana. Per tal de fer-ho, SOS s'uneix als filaments d'actina mitjançant una interacció amb el domini SH3 de la proteïna ABI-1 que té capacitat d'unir-se als filaments d'actina formant un complexe amb EPS-8 (Innocenti et al., 2002). Aquest complexe seria el necessari per activar a Rac, mentre que per activar a Ras cal que es formi un complexe SOS-Gbr2 que s'uneixi al RTK activat. Pel simple fet d'unir-se prop de la membrana, SOS ja té la capacitat d'activar a Ras i així es transdueix el senyal (revisat a Scita et al., 2000). La idea que en sorgeix és que es fa imprescindible que receptors i maquinària transduccional estiguin reclutats juntament per una adequada transducció del senyal segons quina sigui la resposta cel·lular que s'hagi d'executar.

Per últim, cal esmentar que a banda del model de la determinació de l'R7 en l'ull de *Drosophila* existeixen altres models a la natura que funcionen en el mateix sentit, com és el cas del desenvolupament de la vulva de *Caenorhabditis elegans*, l'òrgan hermafrodita per dipositar els ous que és un excel·lent sistema per a l'estudi de senyals intracel·lulars que controlen l'especificació del destí cel·lular (revisat a Sternberg and Han, 1998; Sundaram, 2005). Durant el desenvolupament de la vulva de *C.elegans*, la *anchor cell* (AC) secreta LIN-3 a la gònada somàtica, que és el factor de creixement tipus EGF i que activa l'homòleg del receptor de l'Egfr, LET-23 a la cèl·lula adjacent

precursora de la vulva (VPC) per especificar la cèl·lula vulval primària. Per tal de rebre el senyal de la AC, l'Egfr ha d'estar a la superfície baso-lateral de la VPC. Quan l'Egfr es localitza erròniament a la part apical de la cèl·lula, aquest no s'activa eficientment i l'especificació de la VPC no es dona. Hi ha molts components involucrats en mantenir la posició correcta de l'Egfr, com per exemple recentment s'ha trobat EPS-8 (Stetak et al., 2006) que en mamífers inhibeix l'endocitosi del receptor i s'uneix al citoesquelet d'actina. Per tant en el cas de la vulva, de manera anàloga al que hem vist amb la formació del R7, es tractaria d'una activació depenent de la posició i de la polaritat en que es troba la cèl·lula, juntament amb la localització dels components que integren el senyal.



CONCLUSIONS

La **conclusió principal** d'aquesta Tesi Doctoral és: la quinasa Cdi/TESK1 es requereix en la via de transducció del senyal del receptor Sevenless i en l'organització epitelial durant el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*. De manera més específica, altres conclusions que se'n deriven són:

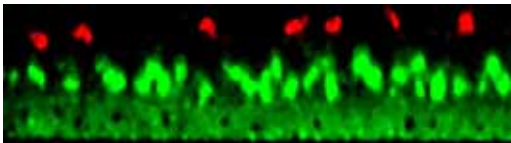
1- La sobreexpressió de *cdi* en "el grup d'equivalència de *sev*" actua com a regulador negatiu de la via de transducció de Sev activada constitutivament.

2- Cdi és una proteïna citoplasmàtica que s'expressa a totes les cèl·lules del disc imaginal d'ull, i en particular es concentra a la part apical dels fotoreceptors. És important per mantenir la viabilitat cel·lular i la seva sobreexpressió provoca un acúmulo de filaments d'actina especialment a la part apical de les cèl·lules de l'epiteli de l'ull.

3- Alteracions en l'expressió de *cdi* provoquen modificacions en la localització de factors integrals de les unions adherents (DE-cadherina i β -catenina) i pertorbacions en la polaritat de les cèl·lules epitelials del disc imaginal d'ull. Aquestes alteracions també modifiquen la localització en l'eix apico-basal del receptor Sevenless, cosa que suggereix un possible obstacle pel correcte contacte entre lligand i receptor necessari per transduir el senyal.

4- Tant la pèrdua de funció de la fosfatasa Slingshot (Ssh) com de la ADF/Cofilina Twinstar suprimeixen el fenotip associat al Sevenless activat. Això indica que la regulació de l'ensamblatge/desensamblatge dels filaments d'actina a la superfície apical dels fotoreceptors, a través de les funcions de Cdi i Ssh, és un element clau en la via de transducció del senyal.

5- TESK1 inhibeix la diferenciació de cèl·lules PC12 induïdes amb NGF i també modifica el perfil d'activació d'ERK quan s'activa la via de Ras/MAPK. Això suggereix que ambdós homòlegs, TESK1 i *cdi*, tenen funcions similars en regular l'especificació d'un destí cel·lular i en modular la via de transducció de senyal de Ras/MAPK. Per tant, la funció de la quinasa TESK1 és important en la transducció del senyal d'altres proteïnes receptores amb activitat tirosina quinasa.



BIBLIOGRAFIA

A

- Allard, J. D., Chang, H. C., Herbst, R., McNeill, H. and Simon, M. A.** (1996). The SH2-containing tyrosine phosphatase corkscrew is required during signaling by sevenless, Ras1 and Raf. *Development* **122**, 1137-46.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P.** (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-9.

B

- Bai, J., Chiu, W., Wang, J., Tzeng, T., Perrimon, N. and Hsu, J.** (2001). The cell adhesion molecule Echinoid defines a new pathway that antagonizes the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway. *Development* **128**, 591-601.
- Bamburg, J. R.** (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 185-230.
- Bamburg, J. R., McGough, A. and Ono, S.** (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* **9**, 364-70.
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Hinton, D. R., Rabin, B. A. and Benzer, S.** (1987a). The sevenless+ protein is expressed apically in cell membranes of developing *Drosophila* retina; it is not restricted to cell R7. *Cell* **51**, 151-8.
- Banerjee, U., Renfranz, P. J., Pollock, J. A. and Benzer, S.** (1987b). Molecular characterization and expression of *sevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. *Cell* **49**, 281-91.
- Basler, K., Christen, B. and Hafen, E.** (1991). Ligand-independent activation of the sevenless receptor tyrosine kinase changes the fate of cells in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **64**, 1069-81.
- Basler, K. and Hafen, E.** (1988). Sevenless and *Drosophila* eye development: a tyrosine kinase controls cell fate. *Trends Genet* **4**, 74-9.
- Benzer, S.** (1971). From the gene to behavior. *Jama* **218**, 1015-22.
- Bernard, O., Ganiatsas, S., Kannourakis, G. and Dringen, R.** (1994). Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons. *Cell Growth Differ* **5**, 1159-71.
- Biggs, W. H., 3rd, Zavitz, K. H., Dickson, B., van der Straten, A., Brunner, D., Hafen, E. and Zipursky, S. L.** (1994). The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *Embo J* **13**, 1628-35.
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K. C., Goldberg, M. L. and Laski, F. A.** (2006). Twinstar, the *Drosophila* homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning. *Development* **133**, 1789-97.

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

Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klambt, C. (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* **370**, 386-9.

Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-79.

C

Cagan, R. L., Kramer, H., Hart, A. C. and Zipursky, S. L. (1992). The bride of sevenless and sevenless interaction: internalization of a transmembrane ligand. *Cell* **69**, 393-9.

Callus, B. A. and Mathey-Prevot, B. (2002). SOCS36E, a novel *Drosophila* SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene* **21**, 4812-21.

Casci, T., Vinos, J. and Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* **96**, 655-65.

Cohen, G. B., Ren, R. and Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-48.

Crews, S., Franks, R., Hu, S., Matthews, B. and Nambu, J. (1992). *Drosophila* single-minded gene and the molecular genetics of CNS midline development. *J Exp Zool* **261**, 234-44.

Ch

Chang, H. C., Solomon, N. M., Wassarman, D. A., Karim, F. D., Therrien, M., Rubin, G. M. and Wolff, T. (1995). phyllopod functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in *Drosophila*. *Cell* **80**, 463-72.

Chen, G. C., Gajowniczek, P. and Settleman, J. (2004). Rho-LIM kinase signaling regulates ecdysone-induced gene expression and morphogenesis during *Drosophila* metamorphosis. *Curr Biol* **14**, 309-13.

Chen, G. C., Turano, B., Ruest, P. J., Hagel, M., Settleman, J. and Thomas, S. M. (2005). Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* **25**, 979-87.

Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. and Laski, F. A. (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nat Cell Biol* **3**, 204-9.

Cheng, A. K. and Robertson, E. J. (1995). The murine LIM-kinase gene (*limk*) encodes a novel serine threonine kinase expressed predominantly in trophoblast giant cells and the developing nervous system. *Mech Dev* **52**, 187-97.

Chernoff, J. (1999). Close encounters of the LIM-kinase. *Nat Cell Biol* **1**, E115-7.

D

- De Celis, J. F.** (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-51.
- de Nooij, J. C. and Hariharan, I. K.** (1995). Uncoupling cell fate determination from patterned cell division in the *Drosophila* eye. *Science* **270**, 983-5.
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D. and Hafen, E.** (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* **360**, 600-3.
- Dickson, B. J., Dominguez, M., van der Straten, A. and Hafen, E.** (1995). Control of *Drosophila* photoreceptor cell fates by phyllopod, a novel nuclear protein acting downstream of the Raf kinase. *Cell* **80**, 453-62.
- Dickson, B. J., van der Straten, A., Dominguez, M. and Hafen, E.** (1996). Mutations Modulating Raf signaling in *Drosophila* eye development. *Genetics* **142**, 163-71.
- Dimova, D. K., Stevaux, O., Frolov, M. V. and Dyson, N. J.** (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes Dev* **17**, 2308-20.
- Dominguez, M. and Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* **11**, 3254-64.

E

- Ebisuya, M., Kondoh, K. and Nishida, E.** (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* **118**, 2997-3002.
- Edgar, B. A.** (2006). From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* **124**, 267-73.
- Edwards, K. A., Montague, R. A., Shepard, S., Edgar, B. A., Erikson, R. L. and Kiehart, D. P.** (1994). Identification of *Drosophila* cytoskeletal proteins by induction of abnormal cell shape in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4589-93.
- Ensslen-Craig, S. E. and Brady-Kalnay, S. M.** (2004). Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Dev Biol* **275**, 12-22.

F

- Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I. and Mlodzik, M.** (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **10**, 979-88.
- Freeman, M.** (1994). The *spitz* gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech Dev* **48**, 25-33.

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

Freeman, M. (1997). Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* **124**, 261-70.

G

Gaul, U., Mardon, G. and Rubin, G. M. (1992). A putative Ras GTPase activating protein acts as a negative regulator of signaling by the Sevenless receptor tyrosine kinase. *Cell* **68**, 1007-19.

Ghiglione, C., Carraway, K. L., 3rd, Amundadottir, L. T., Boswell, R. E., Perrimon, N. and Duffy, J. B. (1999). The transmembrane molecule kekkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* **96**, 847-56.

Gohla, A., Birkenfeld, J. and Bokoch, G. M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* **7**, 21-9.

Gungabissoon, R. A. and Bamberg, J. R. (2003). Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* **51**, 411-20.

Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M. and Goldberg, M. L. (1995). Mutations in *twinstar*, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J Cell Biol* **131**, 1243-59.

H

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**, 253-63.

Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E. and Rubin, G. M. (1987). Sevenless, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science* **236**, 55-63.

Hart, A. C., Kramer, H., Van Vactor, D. L., Jr., Paidhungat, M. and Zipursky, S. L. (1990). Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes Dev* **4**, 1835-47.

Heberlein, U., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1993). The TGF beta homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* **75**, 913-26.

Hime, G. R., Dhungat, M. P., Ng, A. and Bowtell, D. D. (1997). D-Cbl, the *Drosophila* homologue of the c-Cbl proto-oncogene, interacts with the *Drosophila* EGF receptor in vivo, despite lacking C-terminal adaptor binding sites. *Oncogene* **14**, 2709-19.

I

Innocenti, M., Tenca, P., Frittoli, E., Faretta, M., Tocchetti, A., Di Fiore, P. P. and Scita, G. (2002). Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol* **156**, 125-36.

Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178-83.

J

Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). *Atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**, 398-400.

Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* **121**, 2019-30.

Jin, M. H., Sawamoto, K., Ito, M. and Okano, H. (2000). The interaction between the *Drosophila* secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 2098-107.

K

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

Karim, F. D. and Rubin, G. M. (1999). PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during *Drosophila* eye development. *Mol Cell* **3**, 741-50.

Karsten, P., Hader, S. and Zeidler, M. P. (2002). Cloning and expression of *Drosophila* SOCS36E and its potential regulation by the JAK/STAT pathway. *Mech Dev* **117**, 343-6.

Kearney, J. B., Wheeler, S. R., Estes, P., Parente, B. and Crews, S. T. (2004). Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells. *Dev Biol* **275**, 473-92.

Klambt, C. (1993). The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**, 163-76.

Koc, E. C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M. B., Schlatzer, D. M., Moseley, A. and Spremulli, L. L. (2001). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**, 43958-69.

Kramer, H., Cagan, R. L. and Zipursky, S. L. (1991). Interaction of bride of sevenless membrane-bound ligand and the sevenless tyrosine-kinase receptor. *Nature* **352**, 207-12.

Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Hiromi, Y. (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* **126**, 2515-25.

Kraut, R., Menon, K. and Zinn, K. (2001). A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 417-30.

Kumar, J. P., Tio, M., Hsiung, F., Akopyan, S., Gabay, L., Seger, R., Shilo, B. Z. and Moses, K. (1998). Dissecting the roles of the *Drosophila* EGF receptor in eye development and MAP kinase activation. *Development* **125**, 3875-85.

L

Lai, Z. C. and Rubin, G. M. (1992). Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the *yan* gene, an ETS domain protein. *Cell* **70**, 609-20.

LaLonde, D. P., Brown, M. C., Bouverat, B. P. and Turner, C. E. (2005). Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem* **280**, 21680-8.

M

Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A. and Moses, K. (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **75**, 927-38.

Maitra, S., Kulikaukas, R. M., Gavilan, H. and Fehon, R. G. (2006). The tumor suppressors Merlin and Expanded function cooperatively to modulate receptor endocytosis and signaling. *Curr Biol* **16**, 702-9.

Marshall, N. F. and Price, D. H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* **270**, 12335-8.

Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A. and Licht, J. D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* **16**, 45-54.

Matthews, B. B. and Crews, S. T. (1999). *Drosophila center divider* gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA Cell Biol* **18**, 435-48.

McCartney, B. M. and Fehon, R. G. (1996). Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol* **133**, 843-52.

Meisner, H., Daga, A., Buxton, J., Fernandez, B., Chawla, A., Banerjee, U. and Czech, M. P. (1997). Interactions of *Drosophila* Cbl with epidermal growth factor receptors and role of Cbl in R7 photoreceptor cell development. *Mol Cell Biol* **17**, 2217-25.

- Meloche, S., Seuwen, K., Pages, G. and Pouyssegur, J.** (1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* **6**, 845-54.
- Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T. and Nakamura, T.** (1994). Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* **9**, 1605-12.
- Moon, A. and Drubin, D. G.** (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell* **6**, 1423-31.
- Morrison, D. K. and Cutler, R. E.** (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 174-9.
- Muralidhar, M. G., Callahan, C. A. and Thomas, J. B.** (1993). Single-minded regulation of genes in the embryonic midline of the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **41**, 129-38.
- Muslin, A. J. and Xing, H.** (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* **12**, 703-9.

N

- 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**, 63-75.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T.** (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233-46.
- Norga, K. K., Gurganus, M. C., Dilda, C. L., Yamamoto, A., Lyman, R. F., Patel, P. H., Rubin, G. M., Hoskins, R. A., Mackay, T. F. and Bellen, H. J.** (2003). Quantitative analysis of bristle number in *Drosophila* mutants identifies genes involved in neural development. *Curr Biol* **13**, 1388-96.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.

O

- Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H. and Mizuno, K.** (2000). A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 1178-85.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. and Pawson, T.** (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179-91.

P

Pai, L. M., Barcelo, G. and Schupbach, T. (2000). D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* **103**, 51-61.

Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* **416**, 143-9.

Pickup, A. T., Lamka, M. L., Sun, Q., Yip, M. L. and Lipshitz, H. D. (2002). Control of photoreceptor cell morphology, planar polarity and epithelial integrity during *Drosophila* eye development. *Development* **129**, 2247-58.

Proschel, C., Blouin, M. J., Gutowski, N. J., Ludwig, R. and Noble, M. (1995). Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene* **11**, 1271-81.

Q

Quatela, S. E. and Philips, M. R. (2006). Ras signaling on the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 162-7.

R

Raabe, T. (2000). The sevenless signaling pathway: variations of a common theme. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 151-63.

Raymond, K., Bergeret, E., Avet-Rochex, A., Griffin-Shea, R. and Fauvarque, M. O. (2004). A screen for modifiers of RacGAP(84C) gain-of-function in the *Drosophila* eye revealed the LIM kinase Cdi/TESK1 as a downstream effector of Rac1 during spermatogenesis. *J Cell Sci* **117**, 2777-89.

Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* **53**, 217-40.

Rebay, I. (2002). Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*. *Dev Biol* **251**, 1-17.

Rebay, I. and Rubin, G. M. (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* **81**, 857-66.

Reich, A., Sapir, A. and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* **126**, 4139-47.

Reinke, R. and Zipursky, S. L. (1988). Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina: the *bride of sevenless* gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* **55**, 321-30.

Rogers, E. M., Hsiung, F., Rodrigues, A. B. and Moses, K. (2005). Slingshot cofillin phosphatase localization is regulated by Receptor Tyrosine Kinases and regulates cytoskeletal structure in the developing *Drosophila* eye. *Mech Dev* **122**, 1194-205.

- Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurman, N. and Vale, R. D.** (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* **162**, 1079-88.
- Rogge, R. D., Karlovich, C. A. and Banerjee, U.** (1991). Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* **64**, 39-48.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E. and Assoian, R. K.** (1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell* **10**, 3197-204.
- Rorth, P.** (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12418-22.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansoorge, W. et al.** (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.

S

- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G. and Di Fiore, P. P.** (2000). Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *Embo J* **19**, 2393-8.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25.
- Schock, F. and Perrimon, N.** (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 463-93.
- Shilo, B. Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* **284**, 140-9.
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Lavery, T. R. and Rubin, G. M.** (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-16.
- Simon, M. A., Dodson, G. S. and Rubin, G. M.** (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* **73**, 169-77.
- Somma, M. P., Fasulo, B., Cenci, G., Cundari, E. and Gatti, M.** (2002). Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in *Drosophila* cultured cells. *Mol Biol Cell* **13**, 2448-60.
- Spencer, S. A. and Cagan, R. L.** (2003). Echinoid is essential for regulation of Egfr signaling and R8 formation during *Drosophila* eye development. *Development* **130**, 3725-33.
- Sternberg, P. W. and Han, M.** (1998). Genetics of RAS signaling in *C. elegans*. *Trends Genet* **14**, 466-72.
- Stetak, A., Hoier, E. F., Croce, A., Cassata, G., Di Fiore, P. P. and Hajnal, A.** (2006). Cell fate-specific regulation of EGF receptor trafficking during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Embo J* **25**, 2347-57.
- Sundaram, M. V.** (2005). The love-hate relationship between Ras and Notch. *Genes Dev* **19**, 1825-39.

T

- Taguchi, A., Sawamoto, K. and Okano, H.** (2000). Mutations modulating the Argos-regulated signaling pathway in *Drosophila* eye development. *Genetics* **154**, 1639-48.
- Tei, H., Nihonmatsu, I., Yokokura, T., Ueda, R., Sano, Y., Okuda, T., Sato, K., Hirata, K., Fujita, S. C. and Yamamoto, D.** (1992). *pokkuri*, a *Drosophila* gene encoding an E-26-specific (Ets) domain protein, prevents overproduction of the R7 photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6856-60.
- Tepass, U.** (2002). Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* **24**, 690-5.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
- Therrien, M., Wong, A. M. and Rubin, G. M.** (1998). CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell* **95**, 343-53.
- Thomas, G. H., Zarnescu, D. C., Juedes, A. E., Bales, M. A., Londergan, A., Korte, C. C. and Kiehart, D. P.** (1998). *Drosophila* betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* **125**, 2125-34.
- Tio, M., Ma, C. and Moses, K.** (1994). *spitz*, a *Drosophila* homolog of transforming growth factor-alpha, is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets. *Mech Dev* **48**, 13-23.
- Tio, M. and Moses, K.** (1997). The *Drosophila* TGF alpha homolog Spitz acts in photoreceptor recruitment in the developing retina. *Development* **124**, 343-51.
- Tomlinson, A., Bowtell, D. D., Hafen, E. and Rubin, G. M.** (1987). Localization of the sevenless protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* **51**, 143-50.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F.** (1986). Sevenless a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* **231**, 400-402.
- Toshima, J., Ohashi, K., Okano, I., Nunoue, K., Kishioka, M., Kuma, K., Miyata, T., Hirai, M., Baba, T. and Mizuno, K.** (1995). Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J Biol Chem* **270**, 31331-7.
- Toshima, J., Tanaka, T. and Mizuno, K.** (1999). Dual specificity protein kinase activity of testis-specific protein kinase 1 and its regulation by autophosphorylation of serine-215 within the activation loop. *J Biol Chem* **274**, 12171-6.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2001a). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* **12**, 1131-45.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R. and Mizuno, K.** (2001b). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* **276**, 31449-58.
- Toshima, J. Y., Toshima, J., Watanabe, T. and Mizuno, K.** (2001c). Binding of 14-3-3beta regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J Biol Chem* **276**, 43471-81.

Tselykh, T. V., Roos, C. and Heino, T. I. (2005). The mitochondrial ribosome-specific MrpL55 protein is essential in *Drosophila* and dynamically required during development. *Exp Cell Res* **307**, 354-66.

Tsumura, Y., Toshima, J., Leeksa, O. C., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2005). Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. *Biochem J* **387**, 627-37.

U

Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**, 173-82.

V

van Opstal, A., Bijvelt, J. J., Margadant, C. and Boonstra, J. (2005). Role of signal transduction and actin in G1 phase progression. *Adv Enzyme Regul* **45**, 186-200.

Van Vactor, D. L., Jr., Cagan, R. L., Kramer, H. and Zipursky, S. L. (1991). Induction in the developing compound eye of *Drosophila*: multiple mechanisms restrict R7 induction to a single retinal precursor cell. *Cell* **67**, 1145-55.

Villalonga, P., Guasch, R. M., Riento, K. and Ridley, A. J. (2004). RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol* **24**, 7829-40.

W

Wasserman, J. D., Urban, S. and Freeman, M. (2000). A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev* **14**, 1651-63.

Welch, M. D. and Mullins, R. D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 247-88.

Wiggin, O., Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R. (2005). A phosphatase for cofilin to be HAD. *Nat Cell Biol* **7**, 8-9.

Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* **14**, 461-9.

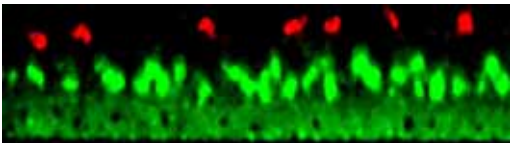
Wolff, T. and Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 1277-1325.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Y

Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S. and Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* **16**, 1171-82.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-12.

Yoon, S. and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.



AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta Tesi Doctoral no hagués estat possible sense el suport i l'ajut de tots els que m'heu acompanyat durant aquests prop de cinc anys. Gràcies a vosaltres he après moltíssim sobre la ciència, la vida i sobre mi mateixa.

A la meva família, pel seu suport incondicional i per estar sempre al meu costat. En especial vull donar mil gràcies a la meva mare, Anna, i al Fede, per la comprensió i la paciència que han tingut, però per sobre de tot perquè han sigut els primers en creure en mi.

Al meu pare, Josep, per preocupar-se de mi i del meu futur.

Als meus germans, Eli, Sara, Fede i Albert, pels petits detalls del dia a dia. Perquè els estimo i m'estimen. Perquè m'animen quan tinc dies fluixos i són els primers a alegrar-se quan les coses em van bé.

Als meus "jefes", per ser els primers responsables d'aquest treball. A en Florenci, pel seu entusiasme, la seva dedicació, per donar-me una mica de "canya" (com diu ell) quan he estat encallada, i també pel seu suport en els meus moments més crítics. A la Montse, pels seus consells i per tenir aquesta visió tant directa i clara que tant m'ha ajudat alhora de tirar endavant el projecte.

A les *Epidd people!!!*, pel seu companyerisme i també per tants moments divertits que fan que el dia a dia sigui més agradable. A en Manel, per estar sempre disposat a escoltar amb "paper i llapis" en mà, i també per uns bombons boníssims que em regala cada cop que li canvio els seus stocks. A en Sergi, per ajudar-me amb l'anglès d'aquesta Tesi però també per tants i tants riures i alguna que altra escapadeta a França. També a la Mire, companya de viatges, festes i a qui admiro per la manera de treballar en el laboratori, excepte pel tema de la neteja!!. A la Cris, per la seva predisposició a ajudar sempre i per un inoblidable viatge a Cuba, que tant em va marcar. A la Isabel, la meva "alumna preferida", per ajudar-me a entendre més coses sobre *Socs36E* i també sobre els homes!!!!. A l'Adrià, per ser un *lab manager* tan eficient, no entenc encara com funcionava aquest lab sense ell. Al Miguel pel seu inestimable ajut en el món de la informàtica i també de l'estadística. A l'Albert, el nostre "ou", per la portada tant xula que m'ha quedat. A la Marta Morey, exemple dedicació i tenacitat en el treball. A l'Astrid, pel seu ajut en el meu projecte de *cdi* en l'ala.

A tota la gent del departament de genètica amb qui he compartit uns moments genials. A tothom, moltes gràcies. A la Mette, per preocupar-se per mi, disposada sempre a

escoltar, i per haver compartit un dels moments més tensos de la meua vida, “el barranquismo” (jeje). Igualment a la Juani, que també hi era i ens ho vam passar súper bé. A la Èlia, a qui admiro per la seva dedicació al treball i perquè sempre està de bon humor. A la Cris González, per haver-me ensenyat a clonar en el meu primer any, però també per tantes festes que ens hem “pegat”. A la Maria, perquè sap escoltar i animar quan més ho necessito. A en Miquel, per les sortidetes al cine i altres festetes. A en Jon, pels meus primers “pinitos” amb les PCRs. A en Pep, per estar sempre disposat a arreglar-me l’ordinador. I en general, gràcies a TOTHOM del primer pis, del pis de dalt i del de més a dalt.

Als meus companys de farmàcia, per haver-me introduït en el meravellós món del cultiu cel·lular. A l’Albert, per haver-me guiat en aquest projecte. Al Seba, la Lilia i el Basu, per haver estat tan pendents de mi i dels meus experiments. Moltes gràcies. També a la Blanca i a la Neus per haver-me ajudat en l’experiment de l’activació de Ras.

A les “nenes” del servei de reconeixement molecular *in situ*, per haver-se posat al meu ritme i aconseguir que pogués arribar a temps amb els meus experiments per l’article. En especial a la Carmen López, pels seus consells i per haver-se preocupat del meu projecte. A la Gema, per tantes i tantes seccions d’ull que m’ha fet, i també per haver-me ensenyat a tallar-los jo mateixa. A la Sònia i la Marta, per preocupar-se de buscar solucions a les dificultats que vaig tenir en els meus últims experiments.

I en el terreny més personal, agraeixo a tota la gent que també m’ha fet costat fora del laboratori. Als meus amics, milers de gràcies. En especial a la Marta, simplement per “estar” de manera incondicional, amigues per sempre, i també per haver-me introduït en el fantàstic món de la salsa i la bachata. Marteta, de veritat, gràcies per tot. Al Dani, que em va aguantar durant el meu primer any de Tesi. A la M^a de Mar, per ser una amiga de sempre i per sempre. Al Joan Marc, per fer feliç a la xurri i per fer-me contenta a mi cada cop que us vinc a veure. A l’Aïda, pels esmorzars a primera hora del matí que senten tant bé. A la Ruth, per haver compartit amb mi els meus moments Manaus i per estar sempre disposada a animar-me. A la Susana, companya de carrera i amiga, divertida i alegre, amb ella he passat uns dels moments més divertits de la meua vida, per ser com és. A la Paula, “mi neneta preferida”, perquè es preocupa molt per mi i sempre podré comptar amb ella. Finalment, també dono les gràcies a tots aquells que heu ajudat, d’una o altra manera, a que no m’hagin faltat els moments especials.

En últim terme, i perquè no? Un profund agraïment al meu company inseparable, *cdí*. Amb ell he après tot el que sé. Hem passat moments d’amor i d’odi, d’eufòria i de desesperació, i al final hem guanyat tots dos.

Moltes gràcies