

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de nuevos elementos implicados en la
regulación de la apoptosis y la morfogénesis de las
articulaciones distales de *Drosophila***

Memoria presentada por

Ana Guarner Peralta

para optar al grado de Doctor en Ciencias por

la Universidad Autónoma de Madrid

Julio de 2012

Director de Tesis:

Ernesto Sánchez-Herrero Arbide

INDICE

Resumen	13
Summary	17
Abreviaturas	21
Introducción	
La biología del desarrollo y <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Breve descripción del desarrollo de <i>Drosophila</i>	25
La información posicional a lo largo del desarrollo	26
La apoptosis en el desarrollo de <i>Drosophila</i>	28
Mecanismo molecular de la apoptosis en <i>Drosophila</i>	30
Morfogénesis de las patas de <i>Drosophila</i>	32
Desarrollo embrionario del primordio de pata	32
Desarrollo del eje Proximo-Distal de pata	34
Morfogénesis de las articulaciones distales en la pata de <i>Drosophila</i>	36
Función de Notch, Dpp y la apoptosis en el desarrollo de las articulaciones	37
Papel de <i>zfh-2</i> en la formación de las uniones tarsales	39
La formación de pliegues como un mecanismo morfogénico en el desarrollo	40
Objetivos	47
Material y Métodos	
Medios de cultivo	51
Cepas de moscas	51
Líneas Gal4	51
Líneas UAS	52
Inactivación de genes: silenciamiento con cepas RNAi	53
Líneas mutantes	53
Líneas LacZ	53
Monitorización de proteínas fluorescentes: cepas " <i>protein-trap</i> "	53
Experimentos de cambio de temperatura	53
Análisis clonal	53
Construcción de la sonda de RNA de <i>dAP2</i>	54

Hibridación <i>in situ</i>	54
Inmunohistoquímica	54
Cultivo <i>ex vivo</i> de discos imaginales de pata	55
Adquisición de imágenes	56
Preparación de cutículas adultas	56

Resultados

1. PAPEL DE LA GTP-ASA RHO1 EN LA MORFOGÉNESIS DE LAS ARTICULACIONES DE LOS TARSOS

La GTPasa Rho1 y su factor activador RhoGEF2 presentan un patrón dinámico durante	
La formación de las uniones tarsales presuntivas	61
La acumulación de la proteína Rho1 tiene lugar en la región distal de cada tarso	63
La construcción UAS-RBD permite caracterizar <i>in vivo</i> los territorios celulares	
donde se encuentra activa la GTPasa Rho1	64
La miosina II no muscular se acumula en las uniones presuntivas	65
Sqh1P y Sqh2P tienen diferente localización durante la formación de las uniones	66
La acumulación de Sqh1P está asociada a las células apoptóticas	69
La función de la vía de la GTPasa Rho1 es necesaria para formar las uniones entre los tarsos	70
Elevados niveles de RhoGEF2 impiden la formación de las articulaciones	70
La fosforilación de la miosina II no muscular es necesaria para la morfogénesis de las	
articulaciones tarsales	71
La GTPasa Rho1 y la correcta activación de la miosina II son necesarias para la	
formación del pliegue en las uniones presuntivas	73

2. RELACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS Y LA GTP-ASA RHO1 DURANTE LA FORMACIÓN DE LAS UNIONES TARSALES

La falta de función de Rho1 o de la miosina II modifican la activación del	
programa apoptótico	74
La inhibición de la apoptosis producida al expresar la proteína P35 aumenta	
la actividad de Rho1 y de la miosina II no muscular	76
La inducción de muerte es suficiente para promover acumulaciones locales de	

Sqh1P en las células apoptóticas	79
Altos niveles de la GTPasa Rho1 inducen acumulación de Sqh1P	79
3. ESTUDIO DE NUEVAS FUNCIONES DEL GEN ZFH-2 EN LA MORFOGÉNESIS DE LOS SEGMENTOS TARSALES	
<i>zfh-2</i> afecta únicamente al crecimiento y a la formación de los tarsos	81
<i>zfh-2</i> es necesario para la expresión de genes diana de N exclusivamente en los tarsos	82
Regulación entre <i>dAP-2</i> y <i>zfh-2</i> en las uniones tarsales	83
<i>zfh-2</i> se activa ectópicamente en mutantes de polaridad planar <i>prickle spiny leg</i>	84
La expresión de <i>zfh-2</i> solapa parcialmente con la expresión de <i>hid</i>	85
<i>zfh-2</i> reprime la expresión de <i>hid</i>	86
Elevados niveles de <i>Zfh-2</i> suprimen las uniones de los tarsos y disminuyen la actividad de genes diana de la vía de Notch	87
La sobreexpresión de <i>zfh-2</i> promueve muerte celular y pliegues ectópicos en el disco de pata	89
<i>zfh-2</i> se requiere para mantener altos niveles de miosina II en las uniones presuntivas de los tarsos	91
Discusión	
1. MODELO DE ACTIVACIÓN DE LA GTPASA RHO1, LA MIOSINA II Y LA APOPTOSIS EN LA FORMACIÓN DE LAS UNIONES	
Fase 1: Activación de la apoptosis	95
Fase 2: Inicio del pliegue y extrusión de las células apoptóticas	95
Fase 3: Modelado del pliegue	97
2. RELACIÓN ENTRE RHO1, LA MIOSINA II Y LA APOPTOSIS	
Activación de la miosina II y de la muerte celular	97
Apoptosis y activación de Sqh1P	97
La cascada apoptótica promueve la activación de Rho1 y la presencia de Sqh1P	98
La actividad de Rho1 es suficiente para activar la miosina II y el programa apoptótico	99
3. <i>zfh-2</i>: NUEVAS FUNCIONES EN LA FORMACION DE LAS UNIONES	
<i>zfh-2</i> y crecimiento	102
<i>zfh-2</i> y muerte celular	103

<i>zfh-2</i> en el eje PD: algunos aspectos evolutivos	104
<i>zfh-2</i> y morfogénesis	104
Conclusiones	109
Bibliografía	113
Anexo	129
Agradecimientos	133

RESUMEN

La eliminación selectiva de células por muerte celular programada es un mecanismo fundamental en multitud de procesos morfogénéticos que precisan de reajustes en el número celular para el modelado de los tejidos. Uno de estos procesos es la morfogénesis de las uniones de los tarsos de la pata de *Drosophila*. La formación de estas articulaciones es un modelo interesante para estudiar cómo una cascada de regulación génica controla diversos procesos relacionados con el papel de la apoptosis y la actividad de los motores celulares en la organización del epitelio.

En nuestro trabajo hemos encontrado que, tras la activación inicial de la muerte celular, tanto la GTPasa Rho1 como su factor activador RhoGEF2 se expresan a niveles altos en la región donde se forma el pliegue que prefigura la articulación. La cascada génica desencadenada por la activación de Rho1 lleva a la fosforilación de la miosina II en su estado monofosforilado. Ambas proteínas se encuentran activas tanto en las células apoptóticas que delaminan y se extruyen en la parte basal del epitelio como tras esta extrusión. En esta última fase, parece que podría ser crucial para el mantenimiento del pliegue que la miosina II se encuentre en su estado difosforilado.

Los dos procesos principales descritos, apoptosis y activación de miosina II, están íntimamente asociados durante la formación del pliegue: por una parte, mostramos que la activación de la GTPasa Rho1 y la miosina II son necesarios para que la muerte celular se produzca en dominios específicos. Por otra parte, hemos visto que si se impide la apoptosis, la distribución y los niveles de expresión de miosina II se ven alterados. La interrelación de estos dos mecanismos, por tanto, es crucial para un desarrollo correcto de la unión intertarsal.

En este trabajo estudiamos también el papel en estos procesos del gen *zinc finger homeodomain-2* (*zfh-2*), un gen diana de *Notch* (*N*) que codifica un factor de transcripción y se expresa y requiere en las uniones tarsales. Hemos descubierto que este gen tiene un papel determinante en la regulación de la muerte celular, ya que su falta de función promueve la expresión del gen proapoptótico *head involution defective* (*hid*) y la activación de la caspasa-3 en los tarsos. *zfh-2* también modula la actividad de genes diana de la vía de *N* como *Enhancer of split* o *big brain*, situándose probablemente al final de esta ruta activadora. Además, tanto su ausencia como su presencia en exceso impiden la morfogénesis de los tarsos a varios niveles: regulación génica (vías de *N* y genes proapoptóticos), control del tamaño (efectos en el crecimiento), y morfología tisular (maquinaria involucrada en el esculpido del pliegue). Por lo tanto, *zfh-2* es un intermediario entre la vía de *N* y los procesos de activación de muerte celular y activación de miosina II.

Estos resultados han sido obtenidos tanto en tejido imaginal de disco de pata fijado como en películas que muestran expresión génica y morfogénesis *in vivo*. Nuestro trabajo describe una red génica que coordina las propiedades mecánicas necesarias para la eliminación de células por apoptosis, dirigiendo los cambios de morfología celular necesarios para el desarrollo de las uniones tarsales.

SUMMARY

The specific elimination of cells by programmed cell death is a fundamental mechanism in many morphogenetic processes that require changes in cell number to shape tissues. One of such processes is the morphogenesis of *Drosophila* tarsal joints. The formation of such structures is an interesting model to study how a genetic cascade controls several processes related to the role of apoptosis and the activity of cellular motors in the organization of the epithelium.

In our work we have found that, after the initial activation of cell death, both Rho1 GTPase and its activating factor RhoGEF2 are expressed at high levels at the position where the fold that precedes the joint develops. The activation of Rho1 leads to the monophosphorylation of myosin II, and these two proteins are active during and after the apoptotic cell delamination and extrusion at the basal region of the epithelium. In the final part of the process that maintains the fold, it seems that myosin II is in its diphosphorylated state.

The two processes described, apoptosis and myosin II activation, are closely related during fold formation: on one hand, we show that the activation of myosin II and Rho1 are necessary for apoptosis to occur in specific domains. On the other hand, we have seen that if apoptosis is prevented myosin distribution and expression levels are altered. The interaction between the two mechanisms, therefore, is crucial for the correct development of the joint.

We have also studied the role in tarsal joints development of the *zinc finger homeodomain 2 (zfh-2)* gene, which is a target of *Notch (N)* signaling, codes for a transcription factor, and is expressed and required in the region where joints will develop. This gene has an important role in regulating cell death because when it is absent there is increased expression of the proapoptotic gene *head involution defective (hid)* and of activated caspase-3. Zfh-2 is also required for the expression of the *Enhancer of split* and *big brain* N targets, acting probably at the end of the N regulatory pathway. In addition, we have found that both the absence and the over-expression of *zfh-2* prevents several processes needed for tarsal segment morphogenesis: gene regulation (Notch signaling pathway and proapoptotic genes), size control (effects on growth) and tissue morphology (cell machinery involved in fold sculpting). Therefore, *zfh-2* is an intermediate between N signaling, cell death and myosin II activation.

These results have been obtained both in fixed leg disc as in time-lapse movies that allow seeing gene expression and morphogenesis *in vivo*. Our work describes a gene network that coordinates mechanical properties required to eliminate apoptotic cells, directing the morphological changes needed for the development of tarsal joints.

ABREVIATURAS

A/P: antero-posterior	<i>rpr</i> : reaper
<i>ap</i> : apterous	t: tarso
BMP: bone morphogenetic proteins	TGF-B: Transforming Growth Factor B
°C: grado centígrado	<i>tkv</i> : thick veins
D/V: dorso-ventral	TS: termosensible
<i>Dll</i> : distalless	<i>tub</i> : tubulina
<i>dpp</i> : Decapentaplegic	UAS: upstream activating sequence
DNA: ácido desoxirribnucleico	<i>wg</i> : wingless
<i>EGFR</i> : epidermal growth factor receptor	
<i>en</i> : engrailed	
enhancer: región reguladora de un gen	
<i>flp</i> : flipasa	
FRT: Flipase recombination target	
GAP: GTPase activating proteína, promueve hidrólisis de GTP.	
GEF: guanine exchange factor	
GTP, GDP: guanosina tri- y di- fosfato	
<i>hh</i> : hedgehog	
HRE: high conserved regulatory element	
hs: heat-shock	
min: minutos	
mRNA: RNA mensajero	
N: Notch	
P/D: proximo-distal	
PCP: planar cell polarity	
p-mad: Mad fosforilado	
<i>ptc</i> : patched	
RBD: Rho Binding Domain	
RNA: ácido ribonucleico	
RHG: reaper, hid y grim.	

INTRODUCCIÓN

La biología del desarrollo y *Drosophila melanogaster*

La biología del desarrollo busca entender los mecanismos morfogenéticos que permiten a un organismo alcanzar su forma definitiva desde el estado de una única célula indiferenciada, el cigoto. La proliferación y la diferenciación son los dos procesos morfogenéticos que principalmente dirigen el desarrollo de un ser vivo.

La biología del desarrollo estudia, en primer lugar, cómo se regulan ambos procesos. Esta regulación engloba un delicado control que ocurre a varios niveles: genético, celular y tisular. En segundo lugar, estudia las diferencias y similitudes que presentan estos procesos y su regulación durante el desarrollo de diversos organismos, ayudando a entender la diversidad biológica existente. Así, la biología de desarrollo desde sus comienzos nos explica que, a escala molecular y celular, estos mecanismos morfogenéticos son herramientas esenciales que son compartidas por organismos aparentemente muy diferentes. Uno de los organismos modelo mejor conocidos, y que más ha contribuido a entender las claves de los procesos fundamentales del desarrollo es la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*.

La secuenciación del genoma de diferentes organismos modelo como el nematodo *C. elegans*, la mosca del vinagre *D. melanogaster*, el pez cebra, *Danio rerio*, o el hombre *H. Sapiens*, permite identificar cuál es el grado de homología que poseemos en común. En el caso del hombre y la mosca, se conoce que comparten al menos el 68% de homología en los genes responsables de enfermedades humanas (Fortini et al., 2000; St Johnston, 2002; Bier, 2005). Así, es importante entender cómo se desarrollan los organismos modelo en particular como una contribución a un modelo general de desarrollo.

Desde hace más de un siglo, la genética de *Drosophila* ha avanzado a tal velocidad que permite utilizar metodologías no disponibles en otros organismos modelo como el ratón o el pollo. Fue Thomas Hunt Morgan (Universidad de Columbia, Estados Unidos) quien a principios del siglo XX descubrió las ventajas de este insecto como organismo modelo. La mosca del vinagre posee unas características idóneas para su estudio experimental en el laboratorio, entre ellas:

1. Pequeño tamaño, fácil manejo y cultivo en el laboratorio.
2. Corto ciclo biológico, de unos 10 días a 25° C.
3. Elevada fertilidad, cada hembra puede poner hasta 100 en un día.
4. Sencillo complemento genético de 4 pares de cromosomas ($2n = 8$).
5. Su exoesqueleto proporciona numerosos marcadores morfológicos que permiten seguir los cambios genéticos fácilmente.
6. Posee además unos cromosomas gigantes o politénicos en las glándulas salivares de la larva que han sido de gran utilidad para estudios citogenéticos (St Johnston, 2002).
7. La presencia de cromosomas balanceadores, en los cuales la recombinación está impedida, permiten mantener indefinidamente a lo largo de las sucesivas generaciones cualquier modificación genética.

Breve descripción del desarrollo de *Drosophila*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo y como tal sufre una metamorfosis completa. La etapa embrionaria abarca las primeras 24h de desarrollo. A continuación, el huevo eclosiona y da lugar a una larva que se desarrolla en tres estadios larvarios, larva I, larva II y larva

III. Durante esta fase proliferan unas estructuras llamadas discos imaginales que darán lugar a la mayor parte del exoesqueleto de la mosca. En el quinto día del desarrollo, la larva ha aumentado considerablemente de tamaño, deja de comer y busca un lugar seco para iniciar la pupación. Durante la fase de pupa, la cutícula externa se endurece, haciendo del pupario una estructura rígida y robusta donde tendrá lugar la metamorfosis. Durante ésta, la mayoría de los tejidos son eliminados o histolizados, y se forman los tejidos adultos a partir de los tejidos imaginales. Una vez completada la metamorfosis, la mosca adulta emerge del pupario. Unas 8 horas más tarde, la mosca adulta es fértil y el ciclo vital se inicia de nuevo (Figura I-1).

A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, la mosca adulta no se forma como resultado del desarrollo embrionario completo. Al contrario, la mayoría de sus estructuras derivan de los discos imaginales, tejidos de origen policlonal en forma de saco derivados de la epidermis

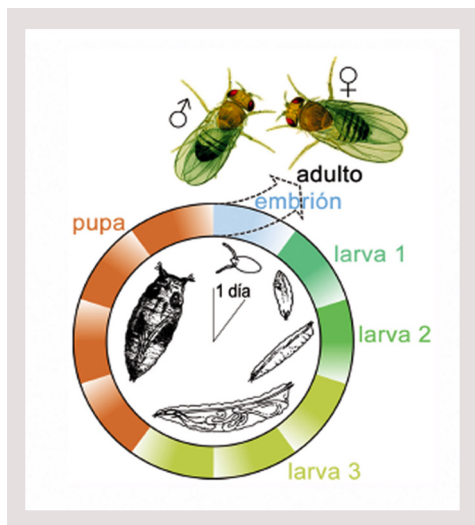


Figura I-1: El ciclo vital de *Drosophila*. Cedido por J. Navascués.

del embrión. Los discos comienzan a proliferar sólo cuando el embrión eclosiona y da comienzo a su fase larvaria (Mandhavan, 1977). Las células que componen los tejidos imaginales son pequeñas, de aspecto indiferenciado, y proliferan muy rápidamente. Además, poseen la capacidad única de mantener su estado determinado durante largos períodos de proliferación (Shearn y Garen, 1974).

Existen nueve pares de discos imaginales en la larva de *Drosophila*, junto con un único disco genital. De ellos derivan las estructuras cuticulares del adulto tales como la cabeza, el tórax y sus apéndices (patas, alas y halterios), la genitalia y la analia. Los discos por tanto se nombran según la estructura que van a formar, así el disco de pata 2 dará lugar a la pata del 2º segmento torácico (Figura I-2).

Inicialmente cada disco imaginal consta de 10 a 40 células, que se dividen durante el desarrollo larvario hasta alcanzar un número de unas 1000 veces superior (Cohen et al., 1993; Martín et al., 2009), proceso a lo largo del cual van adquiriendo una expresión génica diferencial. El ritmo de división de las células se va haciendo más lento a medida que se acerca la pupación hasta quedar finalmente detenido una vez alcanzado el tamaño adecuado (Martin y Morata, 2006; Martín et al., 2009). Al final de la etapa larvaria, en los discos imaginales ya se encuentran establecidos todos los elementos de patrón morfológico que se observan en la cutícula adulta (Bryant, 1975). Los discos imaginales son de gran utilidad para estudiar el desarrollo de *Drosophila* ya que son fáciles de aislar y manipular, y además permiten visualizar directamente la expresión de los genes implicados en la morfogénesis de las estructuras a las que darán lugar.

La información posicional a lo largo del desarrollo

El cuerpo de *Drosophila*, al igual que ocurre en el resto de artrópodos y cordados, está subdividido en unidades repetidas llamadas segmentos o metámeros. *Drosophila* posee seis segmentos cefálicos, tres torácicos y diez abdominales. Estos segmentos están a su vez divididos a lo largo del eje antero-posterior (A/P) en compartimentos anteriores (A) y posteriores (P).

Durante la embriogénesis, la acción combinada de productos maternos y zigóticos (genes “gap” y “pair-rule”) establecen las coordenadas del eje antero-posterior del embrión y dirigen la formación de las primeras unidades metaméricas, los parasegmentos, compuestas por el

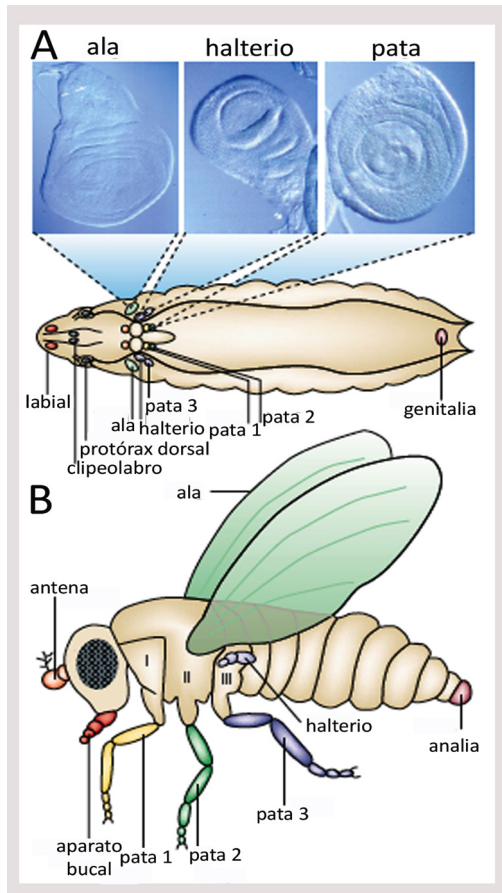


Figura I-2: Esquema de las estructuras adultas derivadas de los discos imaginales. A: Larva de tercer estadio en el que se muestra la posición de los discos imaginales (coloreados de acuerdo con las estructuras que darán lugar en el adulto, en B). En la parte superior de la figura se muestran imágenes de los discos de ala, halterio y pata. B: En el cuerpo adulto de *Drosophila*, se indican las estructuras cuticulares que derivan de los discos imaginales. Modificado de Morata, 2001.

compartimento posterior de un segmento y el anterior del segmento siguiente (Martínez-Arias y Lawrence, 1985).

La subdivisión en parasegmentos es transitoria, ya que al final de la embriogénesis los surcos parasegmentales desaparecen dando lugar a los surcos segmentales en el borde posterior de las bandas de expresión del gen *en* (Martínez-Arias y Lawrence, 1985; Sanson, 2001). Así cada segmento queda dividido en dos compartimentos celulares independientes, el anterior (A) en el que no se expresa *en*, y el posterior (P) en el que sí se expresa. Los compartimentos son por tanto unidades de linaje celular inmiscibles. Los genes como *en* que se expresan de manera estable confiriendo la identidad a un compartimento reciben el nombre de “genes selectores”. La presencia y ausencia de la expresión del gen selector actúa como señal binaria a lo largo del desarrollo, de manera que establece una restricción de linaje, que heredarán sus células descendientes (García-Bellido, 1975; Mann y Morata, 2000). Finalmente, los genes responsables de conferir la identidad a cada parasegmento y a las estructuras que derivan de ellos se denominan genes homeóticos o genes HOX (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985; Kaufman et al., 1990).

Los discos imaginales derivan de la epidermis embrionaria, como se describe más arriba. En el momento en el que los discos comienzan a formarse, la división en compartimentos A y P ya ha tenido lugar y los discos heredan células de ambos compartimentos. Esta división A/P en los discos es crucial para el desarrollo de *Drosophila*, ya que al

menos para los discos torácicos (patas, alas y halterios), las fronteras entre compartimentos actúan como centros organizadores de patrón y crecimiento (Blair, 1995). Las células próximas al borde A/P producen moléculas difusibles que señalizan a las células adyacentes. Estas moléculas actúan como morfógenos, difundiendo desde esta región a lo largo del disco formando un gradiente de concentración que el tejido interpreta como información posicional para su correcto desarrollo (Figura I-3).

Los morfógenos mejor estudiados en *Drosophila* son Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg) y Hedgehog (Hh). En el caso del primordio del ala, *En* permite la activación de gen *hedgehog* (*hh*), que promueve la síntesis de la proteína difusible Hh. Hh es capaz de difundir a corto alcance, para así establecer un gradiente desde el borde A/P. En las células anteriores adyacentes al borde A/P, Hh activa la expresión de *decapentaplegic* (*dpp*), mientras que en el compartimento posterior la expresión de *en* impide que las células respondan a Hh (Basler y Struhl, 1994; Capdevila y Guerrero, 1994; Tabata y Kornberg, 1994). Dpp es un miembro de la familia de factores de crecimiento y proliferación TGF β y actúa como morfógeno de largo alcance, proporcionando

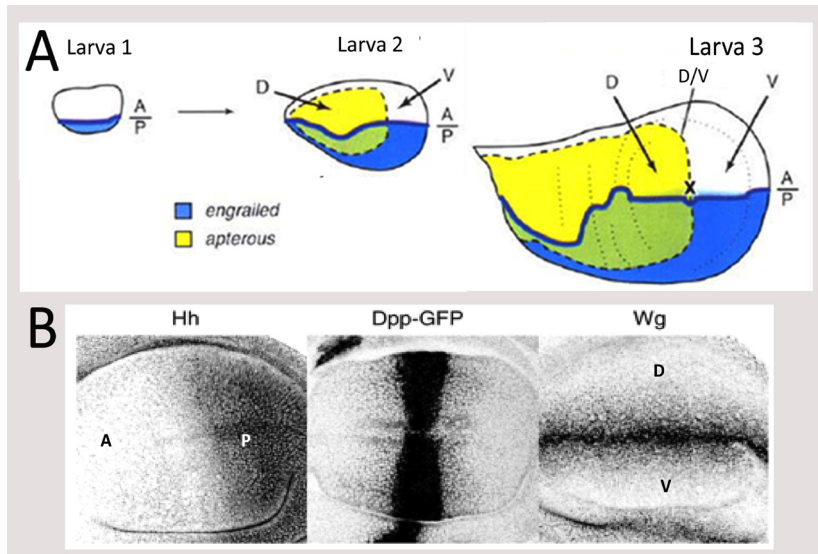


Figura 1-3: Esquema del establecimiento de los bordes A/P y D/V en el disco de ala. A. Desde la formación del primordio en el embrión, el disco de ala prolifera hasta alcanzar el patrón adecuado, donde la expresión del gen de polaridad segmental *engrailed*, en azul en A, está presente en el compartimento posterior de los discos. En amarillo se observa el dominio de expresión del gen *apterous*. Modificado de Blair, 1995. **B.** Distribución de los morfógenos Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp) y Wingless (Wg). Se observa cómo la presencia de estos morfógenos disminuye a medida que se alejan del lugar de síntesis (bordes entre compartimentos A/P para Hh y Dpp, y borde D/V para Wg). Hh difunde desde el borde; Hh y Wg son detectados mediante anticuerpo, mientras que Dpp-GFP es una fusión de Dpp y la proteína fluorescente verde GFP. Tomado de Tabata y Takei, 2004.

información posicional a las células del disco de ala durante su desarrollo (Lawrence y Struhl, 1996; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996)(Figura 3).

Los morfógenos son importantes para muchos procesos del desarrollo. Por un lado son necesarios para la formación de los apéndices (Cohen y Jurgens, 1989; Cohen, 1990), y en concreto del primordio de pata, apéndice que estudiamos en este trabajo. Por otro lado, para que una estructura como la pata de *Drosophila* se forme correctamente a partir de las estructuras larvarias, los morfógenos deben coordinar simultáneamente el establecimiento del patrón y el crecimiento, la supervivencia, el modelado del tejido y la muerte celular que se requiere para la formación de determinadas estructuras (Mirth, 2005; Widmann y Dahmann, 2009; Fuchs y Steller, 2011; Gorfinkiel et al., 2011).

En los siguientes apartados trataré, de manera separada, los aspectos más relevantes de la muerte celular y de la morfogénesis para el desarrollo de los apéndices de *Drosophila*.

La apoptosis en el desarrollo de *Drosophila*

En 1965 Lockshin y Williams acuñaron el término “muerte celular programada” para definir los sucesos de muerte celular que están programados durante el desarrollo y sin los cuales el organismo no podría sobrevivir. Unos años más tarde, Wyllie y sus colaboradores (Wyllie et al., 1980) establecieron una clara distinción entre los dos tipos de muerte celular más frecuentes: la muerte celular patológica, o necrosis, que tiene lugar en tejidos lesionados y se caracteriza por la ruptura celular y consiguiente respuesta inflamatoria; y la muerte celular fisiológica o apoptosis, que ocurre durante el desarrollo normal del organismo y en la que las células conservan la integridad de sus membranas.

Las células que mueren por apoptosis sufren una serie de cambios morfológicos característicos,

como reducción del volumen celular por deshidratación, pérdida de adhesividad con las células vecinas, fragmentación del DNA, condensación de la cromatina y formación de vesículas en la membrana (proceso conocido como *blebbing*). Estos procesos permiten la disgregación de la

célula en varios cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas, lo que impide que se desencadene la respuesta inflamatoria local que tiene lugar en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio (revisado en Fink y Cookson, 2005). Todos estos cambios son el resultado de una cascada de eventos moleculares cuyo objetivo principal es la degradación de los sustratos celulares por unas proteasas denominadas caspasas.

La apoptosis es una parte integral del desarrollo de tejidos y órganos (Meier et al., 2000; Baehrecke, 2002), siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular en el individuo adulto. Es por ello que su desregulación suele desencadenar graves alteraciones en el desarrollo. Así, moscas con defectos en la maquinaria apoptótica mueren temprano (White et al., 1994), y ratones en los que la Caspasa-3 no es funcional mueren perinatalmente con un exceso de células en su sistema nervioso central (Kuida et al., 1996). Sin embargo, la falta de apoptosis en el nemátodo *C. elegans* no compromete su supervivencia, a pesar de que estos mutantes tienen un 15% más de células que no son completamente funcionales (Ellis et al., 1991). Las funciones de la apoptosis durante el desarrollo animal son muy diversas (revisado en Jacobson, 1997; Fuchs y Steller, 2011) (Figura I-4). Entre ellas podemos citar: 1- la morfógenesis de ciertos órganos, cuyo ejemplo clásico es la eliminación de las membranas interdigitales para la formación de los dedos de algunos vertebrados superiores como el pollo, el ratón o el hombre (Saunders y Hubbard, 1966); 2- la eliminación de estructuras innecesarias, como la cola y el intestino de los renacuajos, que no son necesarios para la rana adulta

y se pierden durante la metamorfosis (Shi y Ishizuya-Oka, 1996); 3- El control del número de células. Por ejemplo, en el sistema nervioso de vertebrados, las neuronas y los oligodendrocitos se generan en exceso, y más de la mitad de ellos son eliminados por apoptosis para adecuar su número al número de células que han de inervar (Oppenheim, 1991); 4- La eliminación de células anormales, no funcionales o dañadas. La apoptosis dirige la eliminación de células que están dañadas o que son potencialmente peligrosas para el organismo, y un ejemplo lo encontramos

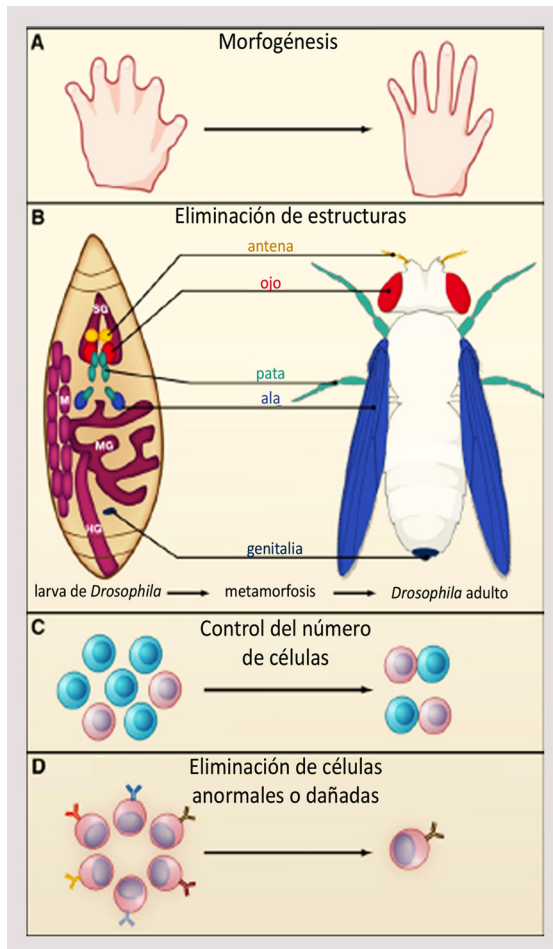


Figura I-4: Funciones de la apoptosis en el desarrollo. **A:** la muerte celular programada regula el correcto esculpido de los órganos, como ocurre con la eliminación de las membranas interdigitales de vertebrados. **B:** Durante la morfogénesis de *Drosophila*, la mayoría de los tejidos larvarios son eliminados por apoptosis, como es el caso de las glándulas salivares (SG), músculos (M), aparato digestivo (MG y HG), mientras que las nuevas estructuras derivan de las células imaginales de los discos, como los que se señalan en la imagen. **C y D:** La apoptosis también controla el número celular, por ejemplo eliminando las células incapaces de unirse específicamente a sus vecinas (C), así como la eliminación específica de los linfocitos autorreactivos (D). Tomado de Fuchs y Steller, 2011.

en el desarrollo del sistema inmune de vertebrados, donde los linfocitos T o B que producen receptores antigénicos autoreactivos son eliminados por apoptosis (Krammer, 2000).

Durante el desarrollo de *Drosophila*, la apoptosis tiene un papel central en multitud de procesos morfogenéticos. En el embrión, la apoptosis es necesaria durante la segmentación para esculpir los surcos segmentales. En la región cefálica del embrión, el gen Hox *Deformed* es necesario para la activación local de *rpr* en la cabeza del embrión, concretamente entre los segmentos maxilar y mandibular. La falta de actividad de este gen impide la formación de los surcos entre dichos segmentos, que en consecuencia quedan fusionados (Lohmann et al., 2002). La apoptosis en el sistema nervioso central de *Drosophila* es necesaria para el desarrollo de la cuerda nerviosa ventral ya que controla el número final de células de la glía (Sonnenfeld y Jacobs, 1995). Más tarde, durante la metamorfosis, los tejidos larvarios sufren una intensa remodelación para establecer el plan corporal del adulto mediante el control de los niveles de la hormona esteroidea ecdisona (Jiang et al., 2000). También se ha demostrado que la apoptosis se precisa durante el desarrollo de la epidermis del abdomen, donde las células de los histoblastos (precursores del abdomen) crecen a expensas de las células larvarias, que mueren por apoptosis (Ninov et al., 2007).

Existen evidencias de que la apoptosis también está implicada en la eliminación de células que han adquirido una información posicional incorrecta. El morfógeno Dpp describe a lo largo del disco de ala un gradiente homogéneo que confiere a las células información acerca de su posición. Cuando se genera una discontinuidad en dicho gradiente, las células a ambos lados de la discontinuidad mueren por apoptosis dependiente de la vía de señalización de la Jun-kinasa (JNK) con el fin de restablecer los niveles continuos de activación de la vía (Adachi-Yamada, 2002). De manera similar, en el fenómeno de competición celular (Morata y Ripoll, 1975), las células que reciben menos cantidad de Dpp mueren por apoptosis (Moreno et al., 2002).

Mecanismo molecular de la apoptosis en *Drosophila*

La apoptosis en *Drosophila* está controlada por mecanismos moleculares altamente conservados. El núcleo de la maquinaria apoptótica está representado por las caspasas (o cisteinil-aspartato proteasas), que son unas proteasas con especial afinidad por los residuos de aspartato. Las caspasas son responsables de la degradación de los sustratos celulares y consiguiente desestructuración y muerte de la célula. Como la mayoría de proteasas, las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos o zimógenos, que carecen de actividad catalítica. Su activación tiene lugar por proteólisis en respuesta a diferentes señales de muerte celular.

Cuando una célula recibe una señal de muerte, las primeras caspasas que se activan son las caspasas iniciadoras; en *Drosophila*, Dronc es la principal caspasa iniciadora y se han identificado además otras dos caspasas iniciadoras (Dredd y Strica). Las caspasas iniciadoras se activan por autoproteólisis y, a su vez, activan otras caspasas llamadas efectoras. En *Drosophila* se han descrito cuatro caspasas efectoras (Drice, Dcp-1, Decay y Damm). Éstas tienen prodominios cortos, por lo que no son capaces de formar complejos y autoproteolizarse. Su función es la de proteolizar sustratos fundamentales para la célula, como la laminina, que al romperse desintegra la membrana nuclear, o como la enzima inhibidora de DNAsas, cuya falta de actividad conduce a la degradación del material genético. Es importante resaltar que las caspasas efectoras no son únicamente “agentes destructores” sino que son capaces de activar o inactivar diversos sustratos. Así, para generar correctamente los cuerpos apoptóticos (*blebbing*), las caspasas efectoras son necesarias y suficientes para disminuir las propiedades adhesivas de las células en las que va a tener lugar el proceso apoptótico (revisado en Suzanne y Steller, 2009; Wickman et al., 2012).

La puesta en marcha de la cascada apoptótica en *Drosophila* depende en muchos casos de la activación sostenida de la caspasa iniciadora Dronc. Ésta se encuentra bloqueada por la proteína

inhibidora DIAP1 (“*Drosophila* Inhibitor of Apoptosis Protein 1”), que suprime la actividad de Dronc, así como la de las caspasas efectoras activadas por ella. Esta función inhibidora de DIAP1 se describió por primera vez al observar que la apoptosis causada por la ausencia de DIAP1 podía ser evitada expresando el inhibidor de caspasas p35 (Hay et al., 1994). p35 es una proteína de baculovirus que posee determinados residuos en su secuencia proteica que la identifican como pseudosustrato de las caspasas efectoras. Una vez p35 es procesada, es un eficaz inhibidor de la muerte celular en el paso final de la cascada apoptótica ya que no se disocia del centro activo del enzima, bloqueando así la actividad catalítica de las caspasas efectoras (revisado en Hay et al., 1994; Callus y Vaux, 2007). Independientemente de cómo se regule la activación de Dronc, para la mayoría de las células la

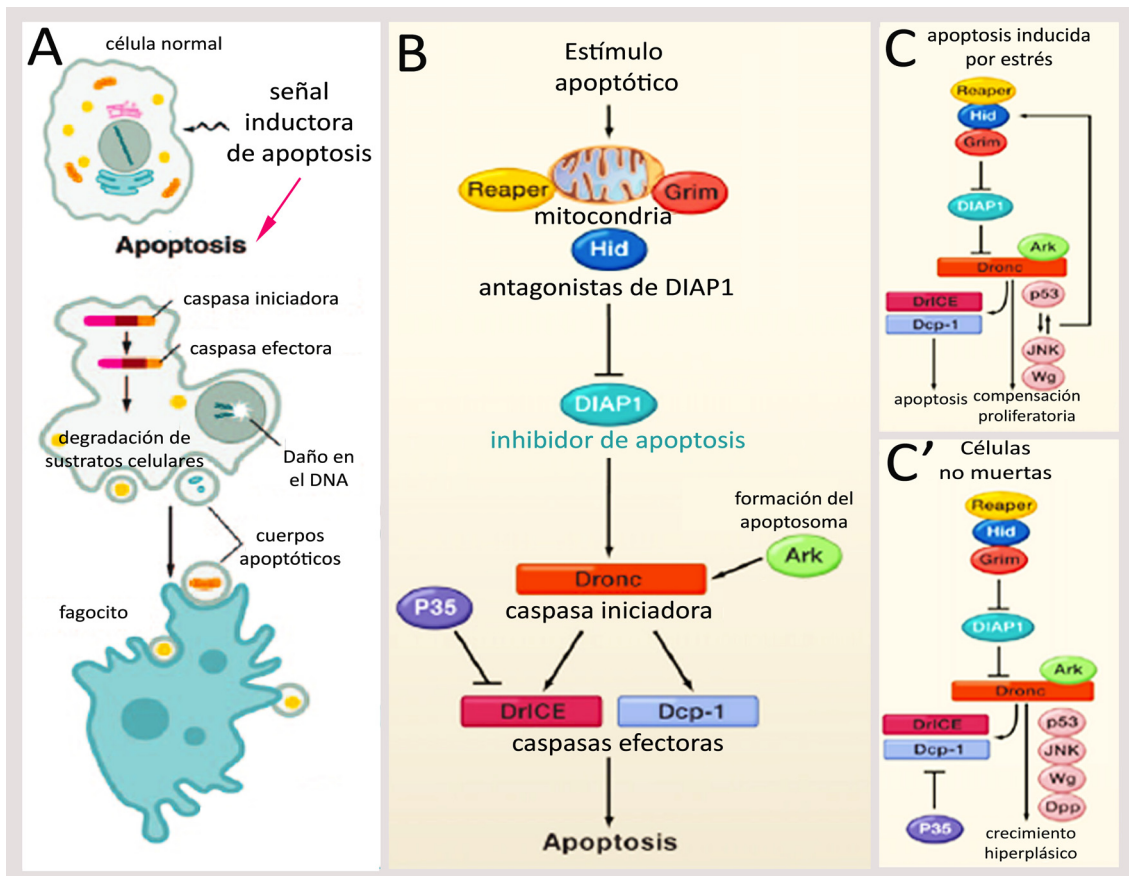


Figura I-5: Ruta molecular de la apoptosis en *Drosophila*. **A:** La apoptosis se activa en la célula tras recibir una señal activadora de la caspasa iniciadora. Su procesamiento activa a las caspasas efectoras, que degradan los sustratos celulares, que son eliminados por los fagocitos. Modificado de Fink y Cookson, 2005. **B:** En *Drosophila*, múltiples vías de señalización regulan a RHG, los antagonistas de la proteína inhibidora de apoptosis (DIAP1). Tras un estímulo apoptótico, los elevados niveles de RHG degradan a DIAP1, permitiendo la actividad de la caspasa iniciadora Dronc y la consecuente activación de las caspasas efectoras Drice y Dcp-1. La proteína de baculovirus P35 es capaz de unirse específicamente a las caspasas efectoras en el último paso de la vía apoptótica, evitando así la muerte de la célula. Modificado de Fuchs y Steller, 2011. **C:** En respuesta a estrés (irradiación o golpe de calor), la regulación de la apoptosis en el disco de ala es compleja. Un bucle de amplificación de la señal apoptótica tiene lugar a través de la vía de la JNK y el gen de supervivencia celular P53. En respuesta a la señal inductora, JNK y P53 se regulan entre sí a nivel transcripcional, activando a su vez a los genes RHG. La consecuente activación de Dronc activa por un lado a las caspasas efectoras, y por otro lado amplifica la señal vía JNK, completando así la amplificación de la señal mediada por este bucle de regulación positiva. Modificado de Shlevkov y Morata, 2011. **C':** La inhibición por P35 de las caspasas en células que están recibiendo una señal para morir concede a las células del disco de ala un estado denominado “no muertas”. En esta situación la vía de JNK es activada, induciendo la síntesis de los morfógenos Wg y Dpp, promoviendo así un sobrecrecimiento hiperplásico del tejido. Modificado de Ryoo et al., 2004; Pérez-Garijo et al., 2009.

decisión entre morir o sobrevivir depende de un balance entre los niveles de caspasas activas y DIAP1. Esta decisión depende de las señales de muerte que lleguen a las células. En una de las rutas apoptóticas principales, la muerte celular se inicia al aumentar la expresión de los genes codificadores de proteínas proapoptóticas como Reaper (Rpr), Hid (Head involution defective), Grim, Sickle y Jafrac2. Estas proteínas se conocen colectivamente como proteínas RHG, y promueven la muerte celular uniéndose a DIAP1, interfiriendo así en su capacidad inhibitoria de las caspasas. Además, las proteínas RHG también regulan los niveles de DIAP1 estimulando su ubiquitinación y consiguiente degradación.

La unión de las proteínas RHG a DIAP1 puede también conducir a la activación de la vía de la c-Jun N-terminal quinasa (JNK). Esta quinasa puede ser activada también a través de receptores de tipo TNF (*tumor necrosis factor*) y promueve la muerte celular en algunos contextos morfogénicos y de respuesta a estrés (Martin-Blanco, 1998; Hay et al., 2004; Hay y Guo, 2006). La vía JNK se activa a través de la fosforilación sucesiva de una serie de proteínas quinasa y concluye con la activación del gen *puckered* (*puc*). Este gen codifica para una MAP quinasa fosfatasa, y además de ser activado por la vía, es capaz también de reprimirla, inhibiendo con ello la muerte celular dependiente de Jun quinasa (Martin-Blanco et al., 1998)(Figura I-5).

Los mecanismos de regulación de la apoptosis no responden únicamente a una cascada molecular simple o lineal, sino que lo hacen en una compleja regulación que depende del contexto en el que está siendo activada (revisado en Fuchs y Steller, 2011). Un ejemplo se refiere a la apoptosis en respuesta a estrés (provocada por la irradiación o por golpe de calor), donde recientemente se ha descrito que existe un bucle de regulación positiva que hace que Dronc esté regulado por la vía JNK y por dp53, pero que a su vez regule a éstos, asegurando así la eficacia del programa apoptótico con el fin de evitar grandes alteraciones en la homeostasis de los órganos a lo largo del desarrollo de un organismo (Shlevkov y Morata, 2011).

Otro ejemplo, siendo de especial relevancia como base de esta tesis, se refiere a la formación de las uniones entre los tarsos de la pata de *Drosophila*. En un trabajo precedente de nuestro laboratorio se ha descrito que la apoptosis se requiere para la formación de estas uniones. En este proceso, como explicaré más adelante, el morfógeno Dpp desempeña una función crucial para la correcta activación de la apoptosis en las articulaciones presuntivas de los tarsos (Manjon et al., 2007).

Morfogénesis de las patas de *Drosophila*

Los apéndices son estructuras especializadas que se desarrollan en el tronco de la mosca, y se proyectan perpendicularmente a éste, a lo largo del eje Próximo-Distal (P/D). *Drosophila*, al igual que el resto de los artrópodos, desarrolla una gran variedad de apéndices articulados (del griego αρθρον, *arthron*, “articulación” y πούς, *pous*, “pie”) con funciones específicas tales como las alas, los halterios y las patas para la locomoción, los aparatos bucales para la alimentación, y las antenas como órganos sensoriales. El desarrollo de los apéndices es un robusto proceso de tal importancia que es compartido a lo largo de la evolución, de hecho, esta robustez se ha confirmado en algunos estudios donde se demuestra que existe un mecanismo común por el cual se desarrollan los apéndices de vertebrados y artrópodos (Panganiban et al., 1997; Mercader et al., 1999; Panganiban y Rubenstein, 2002).

Desarrollo embrionario del primordio de pata

Las patas de *Drosophila* son apéndices torácicos ventrales y se localizan a razón de un par por segmento torácico. De acuerdo con su posición a lo largo del eje A/P se puede hablar de patas protorácicas (primer segmento torácico), mesotorácicas (segundo segmento torácico) o

metatorácicas (tercer segmento torácico). Los apéndices torácicos dorsales y ventrales de cada segmento se originan a partir de un mismo primordio embrionario (Cohen et al., 1993; Kubota et al., 2000). Este primordio, precursor de los discos imaginales de pata y ala/ halterio, puede distinguirse claramente desde la segunda mitad del desarrollo embrionario como un grupo de células subepidérmicas densamente empaquetadas. Al final del período embrionario los primordios de los discos imaginales se segregarán de la epidermis del embrión como epitelios columnares monocapa, quedando todavía conectados a la superficie interna de la larva por los extremos de las células que se invaginan (Bate y Arias, 1991).

El primordio embrionario de los discos torácicos queda especificado desde muy temprano por la expresión de los factores de transcripción *button-head (btd)* y *Distal-less (Dll)* (Cohen et al., 1993; Estella et al., 2003). *Dll* se detecta por primera vez hacia el final del estadio 10 de la embriogénesis en pequeños grupos de células que cruzan las fronteras parasegmentales (Cohen y Jurgens, 1989; Cohen, 1990). La expresión de *Dll*, gen codificante para la proteína con homeodominio Dll, nace donde confluyen las expresiones de *wg*, que se localiza en una banda inmediatamente anterior a la frontera parasegmental, y *decapentaplegic (dpp)*, que se expresa en una banda dorsolateral perpendicular a la expresión de *wg* y participa en la formación del patrón dorsoventral del embrión (Rusch y Levine, 1996; Serrano y O'Farrell, 1997). *wg* es responsable de la inducción de *Dll* en estas células (Cohen, 1990), y su expresión queda limitada por la acción represora de Dpp dorsalmente, y de la vía del "Epidermal growth factor receptor" (EGFR) ventralmente (Cohen et al., 1991; Goto y Hayashi, 1999; Kubota et al., 2000; Panganiban, 2000). Por otro lado, *Dll* es también reprimido en la región posterior del embrión por los genes Hox *Ultrabithorax* y *abdominal-A*, que impiden así la formación de apéndices en el abdomen (Vachon et al., 1992). A medida que progresa la embriogénesis (momento en que ocurre la retracción de la banda

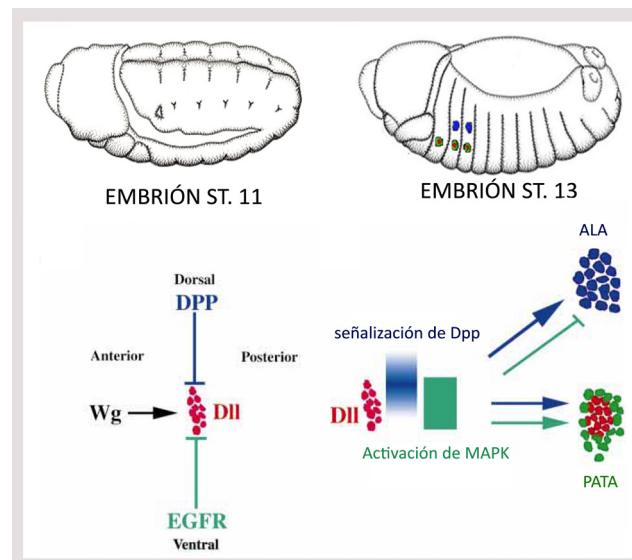


Figura I-6: El origen embrionario de las patas de *Drosophila*. En el primordio embrionario de pata, *wg* dirige la expresión del gen *Dll* mientras que los genes *dpp* (dorsal) y *egfr* (ventral) delimitan su dominio de expresión. Las células dorsales originarán el primordio de ala, mientras que las células ventrales darán lugar al disco imaginal de pata. Modificado de Kubota et al., 2000.

germinal), los dominios de expresión de *dpp* y *wg* en el embrión se separan. Las células dorsales del primordio reciben altos niveles de Dpp y migran dorsalmente, perdiendo la expresión de *Dll*. Se trata de los precursores de los discos torácicos dorsales, ala y halterio (Cohen et al., 1993). Así, Dpp es responsable de reclutar a las células del primordio que adquirirán destino dorsal,

mientras que EGFR antagoniza esta señalización de Dpp impidiendo el desarrollo de discos de ala y halterio en la región ventral. Ambos genes son necesarios para el correcto desarrollo de las patas ya que restringen la actividad de *Dll* a la región distal de las mismas, permitiendo la formación de las estructuras proximales (Kubota et al., 2000)(Figura I-6).

Desarrollo del eje Proximo-Distal de pata

La pata adulta de *Drosophila*, que se desarrolla a partir del disco imaginal de pata, está formada por diez segmentos separados entre sí por articulaciones flexibles o *joints*. Estos segmentos se disponen a lo largo de un nuevo eje de crecimiento, el eje proximodistal (P/D), ortogonal a los ejes A/P y D/V. El eje P/D es exclusivo de los apéndices (revisado en Estella et al., 2012), y se caracteriza por crecer perpendicularmente al tronco del organismo. Así, las regiones proximales son las más cercanas al tronco y las distales las más alejadas de éste. En la pata de *Drosophila*, los segmentos de proximal a distal son: coxa, trocánter, fémur, tibia, cinco tarsos y pretarso (revisado en (Morata, 2001; Kojima, 2004).

El eje P/D de la pata se organiza durante el tercer estadio larvario. Como hemos visto antes, el primordio del disco de pata nace en la frontera entre parasegmentos, y por lo tanto está dividido en un compartimento P que expresa *en* y un compartimento A que no lo expresa. *En* activa al gen *hh*, que codifica para una proteína secretada. La acción de la proteína Hh en el compartimento posterior queda bloqueada por En, pero Hh puede difundir a través del borde A/P hacia el compartimento anterior e inducir la expresión de *wg* ventralmente y la expresión de *dpp* dorsalmente (y también ventralmente a bajos niveles). La asimetría dorsoventral entre las expresiones de ambos genes se mantiene por antagonismo mutuo (Brook y Cohen, 1996; Jiang y Struhl, 1996). *Wg* y *Dpp* son morfógenos de largo alcance y como tales difunden hacia las células anteriores y posteriores del disco, organizando el patrón de la pata a lo largo del eje P/D (Diaz-Benjumea et al., 1994; revisado en Estella et al., 2012). La región central del disco, donde se encuentran las células que reciben tanto *Wg* como *Dpp*, corresponderá a la región más distal de la pata, mientras que la periferia del disco, donde *Wg* y *Dpp* no coinciden, dará lugar a las estructuras proximales y cercanas al tronco (Lecuit y Cohen, 1997; Abu-Shaar y Mann, 1998; Gonzalez-Crespo et al., 1998).

Durante las primeras fases del desarrollo larvario la actividad simultánea de los morfógenos *Dpp* y *Wg* será necesaria para mantener la expresión de *Dll* en el centro del disco (Diaz-Benjumea et al., 1994; revisado en Estella et al., 2012) y para reprimir a su vez a los genes *homotorax* (*hth*) y *teashirt* (*tsh*), cuya expresión quedará restringida a la periferia (Abu-Shaar y Mann, 1998; Gonzalez-Crespo et al., 1998; Wu y Cohen, 1999). Éste es el primer signo de subdivisión P/D del disco de pata. La expresión de *Dll* se independizará más tarde (hacia la mitad del tercer estadio larvario) de las señales de *Wg* y *Dpp* (Lecuit y Cohen, 1997), y se mantendrá en la región distal del disco por un mecanismo de autorregulación mediado por las secuencias reguladoras *Dll-LT* y *Dll-LL* (revisado en Estella et al., 2012). Durante la transición entre los dos primeros estadios larvarios, *Dll* induce la expresión del gen *dacshund* (*dac*) en la región medial de la pata, que junto con los procesos de proliferación celular y crecimiento del disco de pata, establecen un rudimentario eje P/D (Giorgianni y Mann, 2011). *dac* se activa como respuesta a niveles de *Wg* y *Dpp* moderados, siendo reprimido en la región central del disco por niveles altos de ambos morfógenos (Abu-Shaar y Mann, 1998; Lecuit y Cohen, 1997), e inducido por señales emitidas desde las células proximales (Goto y Hayashi, 1999). *Wg* y *Dpp* también inducen la expresión de genes de la vía de EGFR, encargada de activar la expresión de diversos genes diana en la región más distal de la pata (Campbell, 2002; Galindo et al., 2002; Estella et al., 2012). A lo largo del tercer estadio el dominio de *dac* se expande también proximalmente y solapará con el dominio de *hth*. Hacia el final del tercer estadio larvario el disco de pata está dividido en cinco regiones

concéntricas, que corresponden a los dominios de expresión resultantes de la combinación de los tres genes *hth*, *dac* y *Dll*. Así, la región más proximal, donde sólo se expresa *hth*, dará lugar a la pleura, la coxa y parte del trocánter. El dominio donde coinciden *dac* y *hth*, al trocánter distal y la parte proximal del fémur. El dominio de *dac*, al fémur y parte de la tibia. El dominio de *Dll* y *dac* a la tibia distal y al primer tarso (Lecuit y Cohen, 1997). Y finalmente el dominio de *Dll*, al resto de tarsos y al pretarso (revisado en Morata, 2001 y Kojima, 2004).

Ninguno de estos dominios corresponde, sin embargo, a un único segmento, por lo que será necesaria la acción de otros genes para especificar de manera precisa los distintos territorios de la pata. En el tercer estadio larvario temprano el ligando de la vía del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés, EGFR) *vein* (*vn*) empieza a expresarse en el centro del disco, que dará lugar al extremo más distal de la pata, como respuesta a niveles altos de *Wg* y *Dpp*. *Vn* difunde generando un gradiente de activación de la vía del EGFR que controlará la subdivisión de la región distal de la pata. Inicialmente, la actividad de esta vía induce la expresión

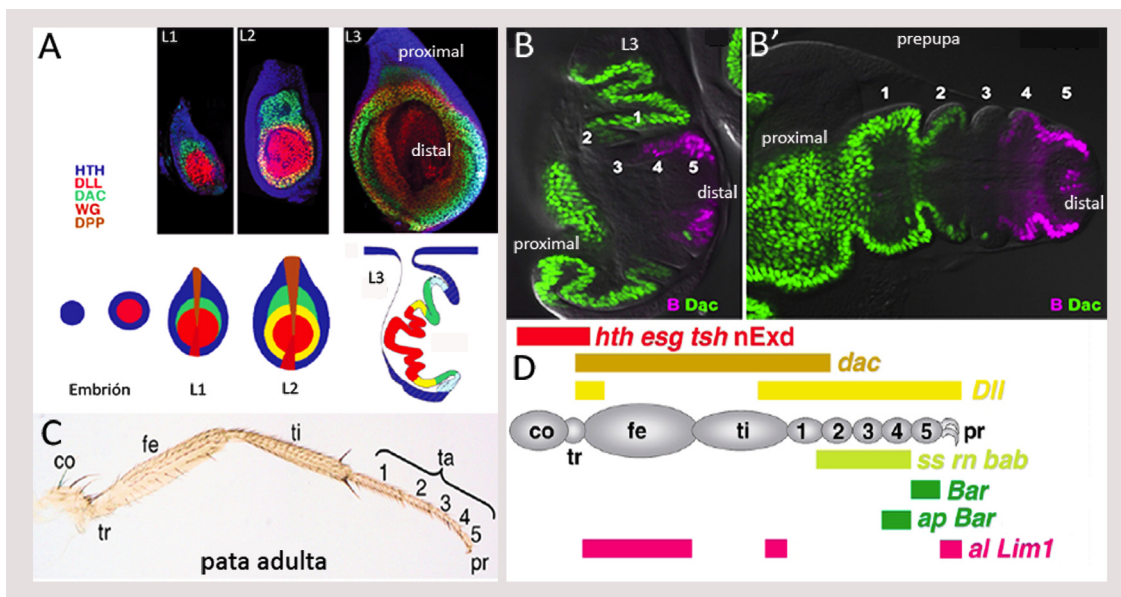


Figura I-7: A: Esquema de la expresión temprana de *hth* (azul) y *Dll* (rojo) en el primordio de pata: estos genes dirigen el temprano establecimiento del eje P/D y se mantendrá durante todas las fases larvarias. El eje A/P se mantiene gracias a la expresión de *en*, que activa a *hh* en P y en el borde A/P, dando lugar a la producción de los morfógenos *Dpp* (marrón) y *Wg* (rojo oscuro) en los dominios dorsal (arriba) y ventral (abajo), respectivamente. Durante el desarrollo larvario, la acción combinada de ambos morfógenos se requiere para el correcto establecimiento del eje P/D en el disco, que adquiere mayor complejidad una vez alcanzado el estadio de Larva 3 (L3). Arriba, la expresión de estas proteínas se detecta con anticuerpos específicos en los diferentes estadios larvarios (L1, L2 y L3). Tomado de Abu-Shaar y Mann, 1998. B, B': Dominios de *dac*, en verde, y *Bar* (violeta, tarsos 4 y 5) en el disco de larva 3. En B' se muestra la distribución de *Dac* y *Bar* durante la evaginación del disco en prepupa. Los tarsos están numerados del 1 al 5; en ambas imágenes el dominio proximal está a la izquierda y el distal a la derecha. Modificado de Natori et al., 2012. C: Imagen de una pata adulta y los segmentos que la componen, de proximal a distal: coxa (co), trocánter (tr), fémur (fe), tibia (ti), y tarsos (ta), numerados del 1 al 5. D: Esquema de los dominios de expresión de los principales genes a lo largo de eje P/D en la pata adulta: *hth* se expresa en la región proximal, *Dll* en la distal, y *dac* en el dominio flaqueado por *hth* y *Dll*. La expresión de genes como *bab*, *rn*, *Bar* y *Lim1* se detecta en segmentos específicos del apéndice. C y D están tomadas de Kojima, 2004.

del gen *aristales* (*al*) en el centro del disco. *al* será responsable de especificar el tarso t5 y el pretarso (uñas o *claws*). La vía del EGFR también activa tempranamente a los genes del grupo *Bar* en la región comprendida entre los tarsos t3 y t5. A este grupo pertenece el gen *ap*, cuyo dominio de expresión abarca el tarso t4 y una parte de la región proximal del tarso t5. Los niveles de expresión de *Bar* son distintos en cada uno de estos tarsos, lo que contribuye a su distinta

especificación. Hacia la mitad del tercer estadio los genes *rotund* y *bric-à-brac* se activan en anillos concéntricos en torno a la expresión de *al*. Ambos están regulados por la vía del EGFR, positiva o negativamente en función de la actividad de la misma, y serán responsables de la especificación de los tarsos t2, t3 y t4 (Campbell, 2002; Galindo et al., 2002; revisado en Natori et al., 2012).

Durante los dos primeros estadios larvarios el disco de pata es una estructura plana, pero durante el tercer estadio empieza a plegarse concéntricamente aunque sigue siendo un epitelio monocapa. Los pliegues concéntricos prefiguran las articulaciones que separarán unos segmentos de otros, mientras que los pliegues que prefiguran las uniones tarsales se forman desde el final del tercer estadio larvario. Al inicio de la pupación el epitelio del disco se proyecta en el eje P/D: el centro del disco dará lugar a los segmentos distales de la pata y la periferia del disco a los proximales (revisado en Kojima, 2004). Un rasgo significativo de esta etapa tardía del desarrollo de la pata es el establecimiento de patrones de expresión génica repetitivos a lo largo del eje P/D. Este patrón de segmentación, a diferencia de la segmentación embrionaria, ocurre rápidamente en un tejido que a su vez está creciendo; finalmente, la pata se organiza como una serie de anillos concéntricos en las regiones presuntivas de las articulaciones, y el orden de aparición de los anillos de expresión génica no responde a una secuencia P/D obvia. Se ha sugerido que los genes *Dll*, *dac* y *hth* actúan de manera combinada para definir estos dominios de expresión en anillo (Rauskolb, 2001)(Figura I-7).

Morfogénesis de las articulaciones distales en la pata de *Drosophila*

Una característica exclusiva de los artrópodos es la presencia de apéndices articulados. El exoesqueleto quitinoso que protege a la mayoría de los organismos de este grupo ofrece una gran resistencia al movimiento. Las uniones (o articulaciones) entre segmentos de la pata adulta son estructuras flexibles que permiten el movimiento de los segmentos. Más concretamente, existen dos tipos de articulaciones en función de la región de la pata: las articulaciones proximales y las articulaciones distales. Morfológicamente las primeras son más complejas y los músculos se encuentran anclados a la articulación (Bishop et al., 1999; Mirth y Akam, 2002). Las segundas, exclusivas de la región distal de la pata, unen entre sí los tarsos. Éstas no tienen músculos anclados y tienen una estructura de “ball and socket” (del inglés, “pelota y hueco”), permitiendo el movimiento al encajar una estructura redondeada de la región más distal de un segmento dentro del hueco que presenta el tarso adyacente en su dominio proximal (Tajiri et al., 2010). La diferenciación de las uniones es un proceso complejo que implica cambios de forma, adhesión y distribución celular, así como la modificación de los elementos extracelulares en los que se sustenta el tejido. A pesar de que este proceso de diferenciación ocurre en la fase de pupa, el territorio del tejido que adquiere el destino celular para formar la unión está ya especificado entre el final del tercer estadio larvario y el inicio de prepupa, donde las uniones tarsales más distales (entre los tarsos t3 y t5) son las últimas en establecerse (Natori et al., 2012). Muchos de los genes que adquieren expresión segmental son elementos de las vías de *Notch* (*N*) y EGFR. La vía de *N* es necesaria y suficiente para la diferenciación de las articulaciones de *Drosophila* (de Celis et al., 1998; Bishop et al., 1999; Rauskolb y Irvine, 1999). La vía del EGFR también participa en este proceso antagonizando la actividad de *N* fuera de la región intersegmental y garantizando así el correcto posicionamiento de las articulaciones (Galindo et al., 2005; Shirai et al., 2007)(Figura I-8).

Las regiones que darán lugar a las articulaciones de la pata se hacen aparentes en el disco de tercer estadio tardío, a modo de anillos concéntricos de expresión génica, donde cada futura articulación está asociada a una expresión particular. Más tarde, en la fase de “prepupa” (de 0h a 6h después de la pupación) el disco de pata inicia el proceso de eversión y se proyecta telescópicamente a lo largo del eje P/D, reduciendo su diámetro y aumentando su longitud. Ello

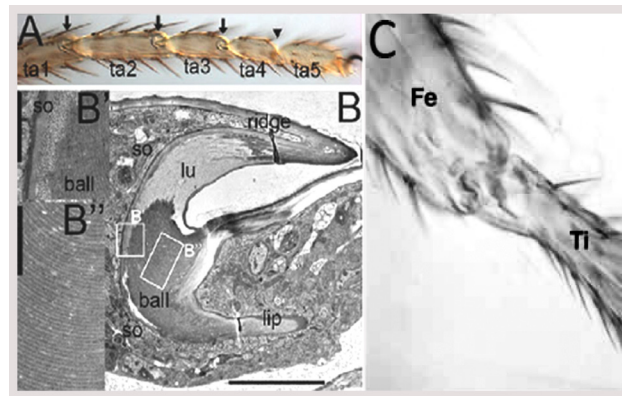


Figura I-8: Morfología de las uniones proximales y distales de la pata de *Drosophila*. **A:** Imagen de los tarsos (señalados como ta1-ta5) de la pata adulta; las flechas indican las articulaciones tarsales, de tipo “ball and socket”. La punta de flecha señala la articulación entre los tarsos 4 y 5. **B:** Imagen de microscopía electrónica mostrando en detalle la estructura de la unión entre tarsos. B' y B'' son ampliaciones de los detalles señalados en B. Se pueden diferenciar las siguientes estructuras de la articulación: so, socket (hueco); lu, matriz lubricante, que concede flexibilidad a la articulación; lip, estructura tipo “labial” que forma la región redondeada (ball) en la cutícula; ridge: estructura quitinosa y afilada que protege dorsalmente la articulación. A y B están tomados de Tajiri y cols, 2010. **C:** Imagen de microscopía óptica de la unión entre los segmentos proximales fémur (fe) y tibia (ti) cuya complejidad es mayor que las articulaciones de los tarsos. Tomado de Bishop et al., 1999.

sucede gracias a cambios de forma en la superficie apical de las células de la tibia y el tarso t1, que dejan de ser anisométricas y adquieren una conformación regular. En cambio, los segmentos tarsales más allá del basitarso no cambian sus dimensiones durante este período, y por lo tanto apenas contribuyen a la elongación del disco (Mirth y Akam, 2002). En este momento del desarrollo, los territorios celulares que prefiguran las articulaciones presuntivas van acompañadas de la formación de un pliegue (resultado de la constricción apical en el epitelio). Este pliegue, donde más tarde se diferenciarán las uniones, y su presencia es necesaria para el desarrollo de las articulaciones. Para completar el proceso de elongación, la pata emerge de la membrana peripodial que envolvía al disco durante todo el desarrollo larvario (Condic et al., 1991; Tajiri et al., 2010; van Ham et al., 2012).

Un pulso prepupal de la hormona esteroidea ecdisona estimulará la transición de prepupa a pupa. Ya iniciada la fase de pupa, 18 horas después de la formación del pupario, tendrá lugar la diferenciación definitiva de las articulaciones (Mirth y Akam, 2002; Tajiri et al., 2010). Es interesante resaltar que hasta el momento, se conocen al detalle las fases de la diferenciación de las uniones que tiene lugar en pupa, mientras que no está descrita la relación entre la aparición de las uniones presuntivas y la formación del pliegue en el epitelio que la acompaña.

Función de Notch, Dpp y la apoptosis en el desarrollo de las articulaciones

Como se dijo más arriba, la vía de N se requiere para formar las articulaciones. El gen *N* codifica para una proteína transmembrana que funciona como receptor en numerosos procesos de comunicación celular tanto en *Drosophila* como en vertebrados (revisado en Bray, 2006 y Lai, 2004). En las patas, la vía de N es necesaria y suficiente tanto para inducir la formación de articulaciones entre segmentos como para promover el crecimiento de los mismos durante el desarrollo larvario. Así, cuando esta vía no funciona correctamente las articulaciones de la pata no se forman o lo hacen parcialmente, y los segmentos no crecen lo suficiente, obteniéndose un fenotipo de fusión de segmentos y reducción del tamaño (Bishop et al., 1999; de Celis et al., 1998; Rauskolb y Irvine, 1999)(Figura I-9).

En el disco de pata la proteína N es ubicua, y sus ligandos Delta (DI) y Serrate (Ser) están presentes

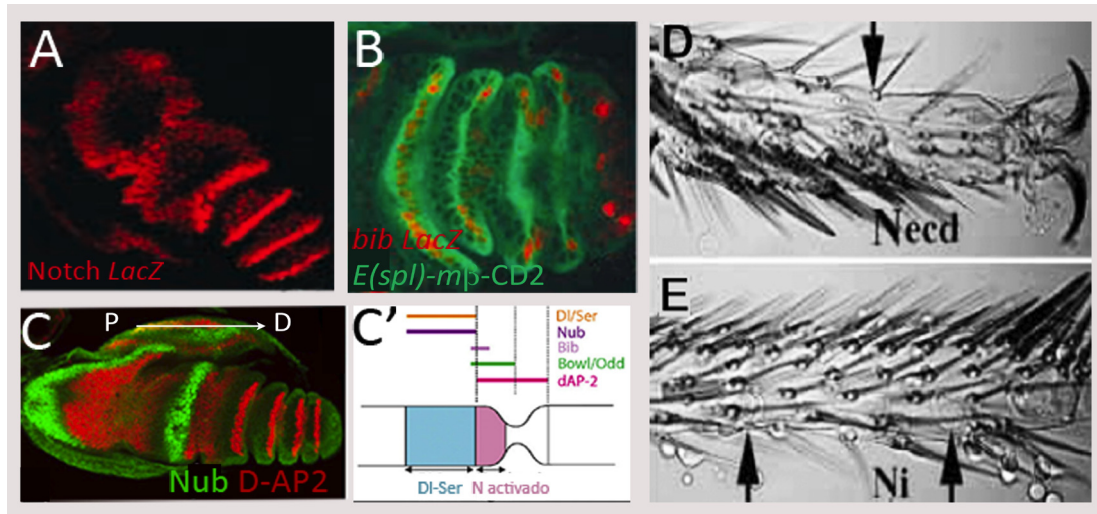


Figura I-9: La vía de Notch es necesaria y suficiente para la formación de las articulaciones. **A:** Detección de la actividad de Notch en las articulaciones presuntivas de la pata (*Notch-LacZ* en rojo). **B:** Expresión de los genes diana de la vía, *bib* (en rojo) y *E(spl)mβ* (en verde). A y B están tomados de De Celis et al., 1998. **C:** Localización en uniones presuntivas de las proteínas Nub (verde) y dAP-2 (rojo); nótese la presencia de dAP-2 en las uniones proximales y distales, mientras que Nub sólo se localiza en las proximales (P, proximal; D, distal). Modificado de De Celis et al., 1998. **C':** Esquema de los genes activados en la región presuntiva de la unión. *DI/Ser* son los ligandos del receptor Notch (N), que tras su unión a N señalizan hacia distal (P a la izq.; D a la dcha.). Así, en la célula distal adyacente a los ligandos se activan diferentes factores de transcripción. Tomado de Greenberg y Hatini, 2009. **D:** Desaparición parcial (flecha) de las articulaciones ante la incorrecta activación de la vía de N (patas *dpp-Gal4 UAS-N^{ecd}*). **E:** Formación de articulaciones ectópicas parciales (flechas) tras la expresión de una forma constitutivamente activada del receptor N (patas *dpp-Gal4 UAS-N^{intra}*). Tomado de de Celis et al., 1998.

en todos los segmentos a modo de anillos concéntricos. La vía de *N* se activa en las células más distales de cada segmento, que se encuentran adyacentes y distales a las que expresan *Ser* y *DI*. Se ha propuesto que estos ligandos no activan la vía de *N* proximalmente porque esta activación se encuentra reprimida por la activación de la vía del EGFR (Galindo et al., 2005). En cada segmento, la actividad de esta vía describe un gradiente cuyos niveles más altos se localizan precisamente en las células proximales a la expresión de *DI* y *Ser*. Mutaciones en genes de polaridad planar, sin embargo, también producen activación ectópica proximal de la vía de *N*, sugiriendo que también pueden reprimir a ésta proximalmente (Held et al., 1986; Gubb et al., 1999; Bishop et al., 1999).

Varios de los genes diana de la vía de *N* son factores de transcripción. Entre los mejor caracterizados se encuentran los miembros del complejo *Enhancer of Split (E(spl))*. *E(spl)* se expresa en las células más distales de cada segmento de la pata, coincidiendo de manera precisa con el dominio de activación de la vía de *N*. Sin embargo, su falta de función no está asociada a ningún fenotipo mutante, lo que sugiere que son otros los factores que median la actividad de la vía de *N* en las patas (de Celis et al., 1998). Entre ellos cabe destacar a los genes *dAP-2* (Kerber et al., 2001), *big brain (bib)* (de Celis et al., 1998), *nubbin (nub)* (Rauskolb y Irvine, 1999), *disconnected (disco)* (Bishop et al., 1999; Heilig et al., 1991), *deadpan* (Mirth y Akam, 2002) y a los genes de la familia *odd-skipped* (Hao et al., 2003). Curiosamente, algunos de estos genes, como *nub* y *odd*, se expresan en las regiones presuntivas de las articulaciones proximales, mientras que otros, como *disco* y *deadpan*, lo hacen únicamente en las distales (Mirth y Akam, 2002). Además, como comentábamos en el anterior apartado, existen claras diferencias morfológicas entre ambos tipos de articulación (Mirth y Akam, 2002); estas diferencias a nivel morfológico y genético parecen

sugerir que las articulaciones proximales y las distales pueden haber evolucionado de manera independiente (Casares y Mann, 2001; de Celis Ibeas y Bray, 2003).

Una característica exclusiva de las uniones distales es la muerte celular que precisan para su formación. A partir del tercer estadio larvario, la vía de Dpp regula la activación de la apoptosis únicamente en las uniones de los tarsos; esta vía se activa de manera asimétrica en los segmentos distales de la pata, generando un borde brusco de activación en la articulación presuntiva. La expresión de una construcción indicadora del gen *rpr* (*rpr-LacZ*) coincide con el borde brusco de actividad de Dpp en las articulaciones presuntivas, de modo que *rpr-LacZ* se detecta tanto en las células con mayor actividad de Dpp como en las células distales adyacentes, donde la vía no está activa (Manjón y cols., 2007). La formación de bordes abruptos de actividad de Dpp induce la apoptosis dependiente de *rpr* y Jun kinasa, ya que en su ausencia no se activa la muerte,

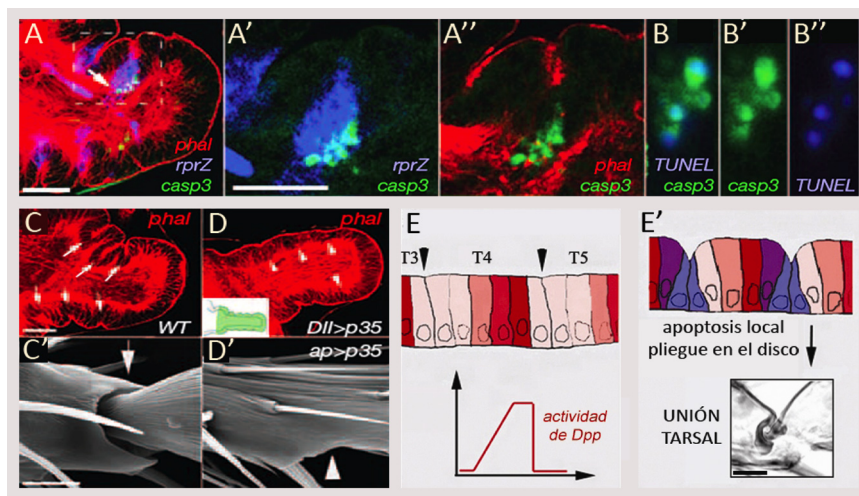


Figura I-10: La apoptosis en las uniones de los tarsos. A-A'', B-B'': En las uniones presuntivas de los tarsos de la pata, la apoptosis se detecta en el dominio de expresión del gen proapoptótico *reaper* (azul en A, A') donde se localizan células marcadas por caspasa (verde en A, A', B, B') y Tunel (azul en B y B''). C, C', D, D': La apoptosis es necesaria para la formación de las uniones adultas ya que cuando ésta se impide al expresar la proteína P35 entre los tarsos t4 y t5 (dominio de *ap*), las uniones no se forman (D', comparar con C'). Asimismo, los pliegues que prefiguran las futuras uniones (C) no están presentes en el disco cuando la proteína P35 se expresa en la parte distal de la pata (D). E: Esquema de la actividad de la vía de Dpp (rojo) dentro de cada futuro tarso, donde altos niveles se detectan en las células más distales de cada segmento. E': Para la formación de los pliegues, la apoptosis (azul) se activa localmente en las regiones que confrontan altos y bajos niveles de actividad de la vía de Dpp. Modificado de Manjón et al., 2007.

necesaria para la morfogénesis de las articulaciones distales (Manjón et al., 2007). La relación entre las vías de Dpp y N es compleja, ya que hay experimentos que sugieren una activación mutua (Manjón et al., 2007). Es interesante resaltar que la formación del pliegue de las uniones presuntivas de los tarsos es posterior a la activación del gen proapoptótico *reaper* (Figura I-10).

Papel de *zfh-2* en la formación de las uniones tarsales

Trabajos anteriores han identificado al gen *zinc finger homeodomain 2* (*zfh-2*) como un elemento regulado por Notch y requerido para formar las uniones tarsales (Manjón, 2007). Este gen codifica una proteína con 3 homeodominios y 16 dedos de zinc (Fortini et al., 1991) y presenta un patrón de expresión variable a lo largo del desarrollo. En el embrión se expresa tardíamente en el sistema nervioso central, lo que sugiere su implicación en la neurogénesis (Lai et al., 1991). Durante el desarrollo larvario *zfh-2* interviene en el proceso de distalización del disco de ala, inicialmente bajo control de *wg*, y más tarde bajo el control de *nub* y *vestigial*. Así, *zfh-2* especifica

la región proximal del ala en respuesta a la señalización temprana de *wg* (Whitworth y Russell, 2003; Terriente et al., 2008).

El gen *zfh-2* se expresa en los discos de pata durante el estadio larvario, a partir de las 78h de desarrollo después de la puesta del embrión. Se localiza en la región distal del disco (desde las 78h hasta las 96h del estadio de larva III), donde se encuentra regulado por el gen *Dll*. Su patrón de expresión es muy dinámico, ya que desde las 96h de desarrollo hasta la pupa, el gen *zfh-2* modifica su dominio de expresión restringiéndose a las regiones presuntivas de las uniones de la pata, tanto proximales como distales. En el disco de prepupa se ha descrito que la expresión

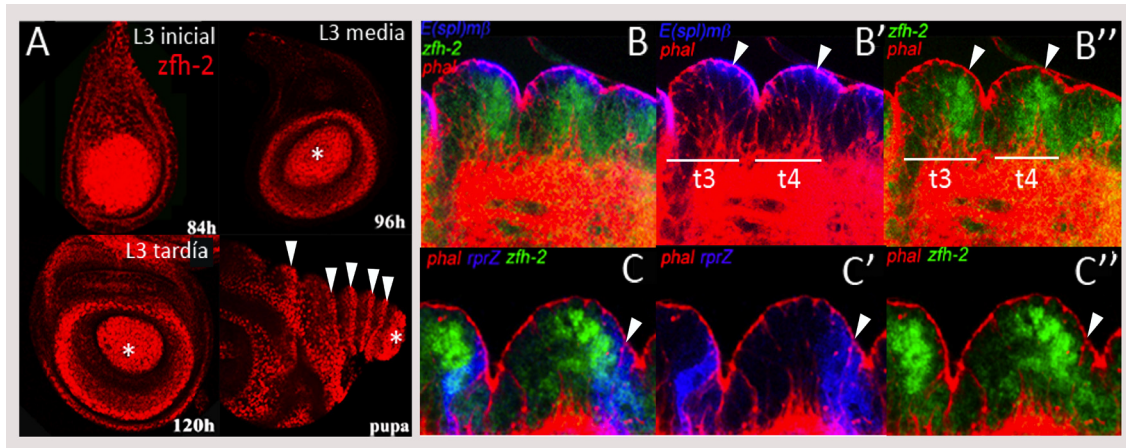


Figura I-11: *zfh-2* se expresa en las uniones presuntivas, donde la vía de Notch está activa. A: Presencia de la proteína Zfh-2 en el disco de pata durante la fase de Larva 3 y prepupa. Inicialmente se detecta en el dominio distal de la pata (* indica la región más distal de la pata) para restringirse a las uniones presuntivas (puntas de flecha) una vez iniciada la pupación. B: La presencia de la proteína Zfh-2 (verde en B, B'') coincide con el dominio de expresión del gen diana de la vía de N, *E(spl)mβ* (azul en B, B'). Por ejemplo, se indican los tarsos t3 y t4, dicha colocalización ocurre en las células más distales de cada futuro tarso (puntas de flecha). La F-actina (*phal*, en rojo) permite ver la morfología celular. C-C'': La presencia de Zfh-2 (verde en C y C'') solapa parcialmente con el dominio del gen indicador *rpr-LacZ* (azul en C y C') en la región distal de los futuros tarsos (puntas de flecha). Tomado de Manjón, 2007.

de *zfh-2* se restringe a las células más distales de cada futuro segmento, coincidiendo con el territorio en el que genes diana de la vía de N son activados. La proteína Zfh-2 se detecta además en el tendón que llega a la región más distal, así como en la región más distal de la pata. Además, *zfh-2* solapa parcialmente con el dominio de expresión de la construcción indicadora *rpr-LacZ* (Manjón, 2007)(Figura I-11).

Dentro del proceso genético que dirige la formación de las uniones tarsales, se ha descrito que el gen *zfh-2* es activado por la vía de Notch en las articulaciones presuntivas, donde se requiere para la correcta morfogénesis de estas estructuras en la región distal de la pata, estando implicado en la activación discontinua de Dpp y en la inducción de apoptosis (Manjón, 2007)(Figura I-12). Sin embargo, se desconoce su relación genética con otros genes moduladores de la vía de N así como su efecto sobre genes efectores diferentes de *rpr* o de la vía de Dpp que estén dirigiendo la morfogénesis de las uniones.

La formación de pliegues como un mecanismo morfogénico en el desarrollo

Durante la morfogénesis de un órgano, además de controlar el número final de células mediante la apoptosis y la proliferación, se deben regular los cambios de forma que sufren las células para

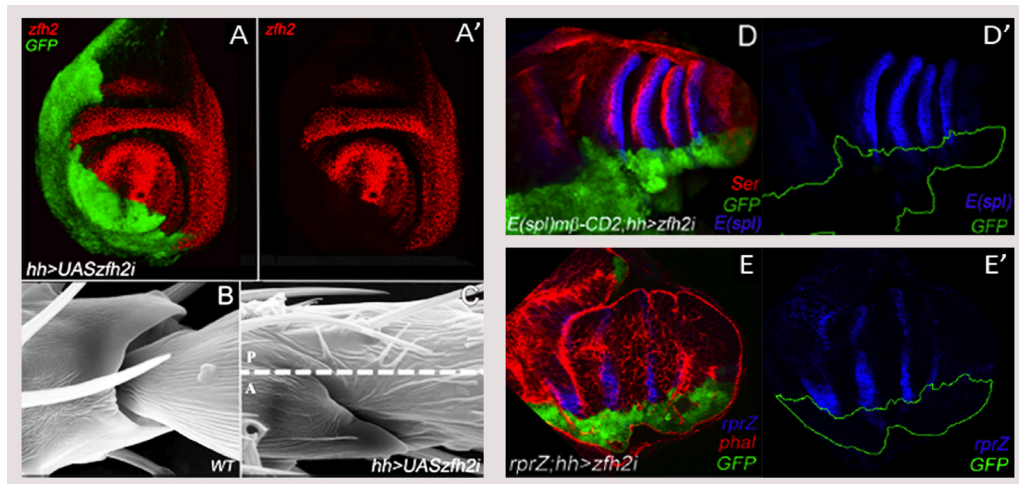


Figura I-12: *zfh-2* se requiere para la formación de las uniones de los tarsos. A, A': la falta de función dirigida por la expresión de UAS-*zfh-2* RNAi (compartimento posterior, verde en A) elimina completamente la proteína Zfh-2 (rojo en A y A'). B: Unión entre tarsos silvestres (WT, del inglés *wildtype*). C: cuando se impide la función del gen *zfh-2* en el dominio de *hh* (compartimento posterior, P; A: anterior), las uniones tarsales desaparecen. D, D': *zfh-2* se requiere para activar la vía de N en los tarsos: cuando se expresa la construcción UAS-*zfh-2* RNAi en el compartimento posterior del disco de pata (verde en D, delineado en D'), disminuye la presencia del ligando Ser (rojo) y del gen diana de esta vía E(spl)mβ (azul). E, E': La eliminación de *zfh-2* impide la expresión de la línea indicadora del gen proapoptótico *reaper* (azul en E y E') en los tarsos (compartimento UAS-*zfh-2* RNAi en verde en E). Tomado de Manjón, 2007.

esculpir un tejido. Existen diversos procesos en el desarrollo embrionario de *Drosophila* en los que la eliminación de células por apoptosis y la morfogénesis están íntimamente ligadas, como la muerte dirigida por *rpr* en la formación de los surcos segmentales embrionarios (Lohmann et al., 2002) y el cierre dorsal del embrión (Gorfinkiel y Blanchard, 2011), entre otros ejemplos.

Para la formación de un pliegue en un tejido, uno de los mecanismos más usados requiere que un grupo de células reduzca el diámetro de su dominio apical, permitiendo así la formación de una indentación en el epitelio. Cuando este cambio morfológico se lleva a cabo activamente en respuesta a señales en el desarrollo se conoce como constricción apical, siendo múltiples los procesos en los que se ha descrito. La constricción apical está mediada por elementos del citoesqueleto que actúan como fuerzas moleculares (actina y miosina II no muscular son los elementos principales). La maquinaria de acto-miosina dirige la contractilidad de las células, propiedad biológica descrita en procesos tales como la citoquinesis, locomoción celular o cambios de morfología celular. La activación de la miosina II ha sido descrita en procesos biológicos como la celularización, la gastrulación, la formación de tráqueas o la formación de surcos embrionarios durante la embriogénesis de *Drosophila*, procesos en los que un pliegue se forma mediante la constricción apical de un grupo de células de un epitelio (Hacker y Perrimon, 1998; Dawes-Hoang et al., 2005; Grosshans et al., 2005; Brody y Casanova, 2006; Fox y Peifer, 2007; Kolsch et al., 2007; Mulinari et al., 2008). La miosina II no muscular está formada por un hexámero de seis cadenas: dos pesadas, dos ligeras y dos reguladoras. Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas reguladoras están codificadas respectivamente por los genes *zipper* (*zip*) (Young et al., 1993) y *spaghetti squash* (*sqh*) (Karess et al., 1991). Se sabe que la miosina II se activa por fosforilación (Tan et al., 1992) y que la Rho quinasa (ROK), es una de las quinasas encargadas de fosforilarla (Winter et al., 2001). Así, el motor molecular de acto-miosina es capaz, mediante la fosforilación de la miosina II, de convertir la energía química en energía mecánica o contráctil (Gorfinkiel y Blanchard, 2011).

En *Drosophila*, ROK es una quinasa efectora de la actividad de las GTPasas Rho (Winter et al., 2001). Las Rho GTPasas son una familia de proteínas denominadas "pequeñas GTPasas" que

pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, altamente conservadas en los organismos multicelulares (Symons y Settleman, 2000). Estas proteínas están involucradas en diversos procesos tales como la regulación de ciclo celular, citoquinesis, migración celular y regulación transcripcional de genes efectores (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Nikolaidou y Barrett, 2004). De hecho, la desregulación de las GTPasas Rho es relevante en procesos cancerosos (Vega y Ridley, 2008). En *Drosophila* existen tres GTPasas de este tipo: Rho (también conocida como Rho1 ó RhoA), Rac y Cdc42 (Hall y Nobes, 2000). Se ha descrito que la vía de señalización de Rho1 y la miosina II no muscular interaccionan genéticamente en diversos procesos morfogénicos del desarrollo embrionario y larvario de *Drosophila* (Halsell et al., 2000).

Para orquestar estos cambios de forma a través de la activación del motor de acto-miosina, se han identificado diferentes señales en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Uno de los ejemplos más estudiados en los que la constricción apical promueve la indentación del tejido para el desarrollo específico de un órgano es la formación del surco ventral de *Drosophila*. En este proceso, un grupo de 18 células sufren la constricción apical de sus ápices, a la que seguirán células de la línea media para finalmente delaminar y formar un tejido tubular en el interior del embrión cuyo destino celular es el mesodermo de la mosca (Lecuit y Cohen, 1997). El factor de transcripción *twist* es el responsable de promover la localización apical de proteínas como Fog y T48 en las células que componen el mesodermo. Durante la formación del surco ventral, estas proteínas son capaces de regular la localización subcelular de RhoGEF2, un regulador positivo de la actividad de las GTPasas Rho (Sawyer et al., 2009; Gorfinkiel y Blanchard, 2011). En la morfogénesis del mesodermo de *Drosophila* se ha visto que Rho1 y sus genes diana son necesarios para la correcta formación del pliegue, ya que en mutantes para *Rho1*, para *RhoGEF2* o para la miosina II el pliegue no es capaz de formarse correctamente (Barrett et al., 1997; Sawyer et al., 2009). Recientemente se ha descrito además, que durante este proceso, la miosina II se encuentra regulada tanto a nivel molecular como mecánico. Esto quiere decir que el motor molecular de actina-miosina es capaz a su vez de responder a estímulos mecánicos, siendo este proceso dependiente de los factores de transcripción *fog* y *snail*, que dirigen la formación del surco ventral (Pouille et al., 2009). Sin embargo, son escasos los procesos en los que se describe el efecto directo de un factor de transcripción sobre el esqueleto de acto-miosina.

El motor molecular de acto-miosina puede ser activado por diversos morfógenos tales como Dpp y Hh en el desarrollo, siendo uno de los ejemplos más estudiados el cierre dorsal del embrión. Este proceso ocurre al final de la embriogénesis para establecer una continuidad en el epitelio embrionario, permitiendo así la correcta eclosión de la larva (Fernandez et al., 2007). La retracción de la banda germinal deja expuesta la región dorsal del embrión, temporalmente ocupada por las células de la amnioserosa, que sufren fuertes cambios en su forma para finalmente morir por apoptosis. Las células epiteliales forman un frente (LE; del inglés, "leading edge") y avanzan activamente para cerrar este surco dorsal, siendo un proceso dependiente del motor de acto-miosina. La compleja regulación de este proceso esta liderada por la vía de de JNK, que activa a *dpp* en las células LE. La familia de las GTPasas Rho son una de las dianas de JNK y Dpp, y ayudan a coordinar la fusión entre ambas capas epiteliales del LE (Harden, 2002). De manera opuesta a lo que ocurre en el cierre del embrión, recientemente se ha descrito en el disco de ala, que Rho1 activa directamente a JNK, sin activar a ROK (Neisch et al., 2010).

En el disco de ojo, el morfógeno Hh dirige la contractilidad dependiente de acto-miosina en la formación del surco morfogénico. Se ha descrito que la activación de la GTPasa Rho1, mediada por RhoGEF2, permite la activación de la quinasa ROK, encargada de fosforilar directamente a las cadenas reguladoras de la miosina II no muscular (p-MRLC, del inglés, fosfo-cadena ligera reguladora de la miosina). Así, una vez la miosina II está activa (fosforilada), es capaz de reclutar la red de actina del citoesqueleto, y promover la constricción apical de la célula (Corrigall et al.,

2007; Escudero et al., 2007)(Figura I-13).

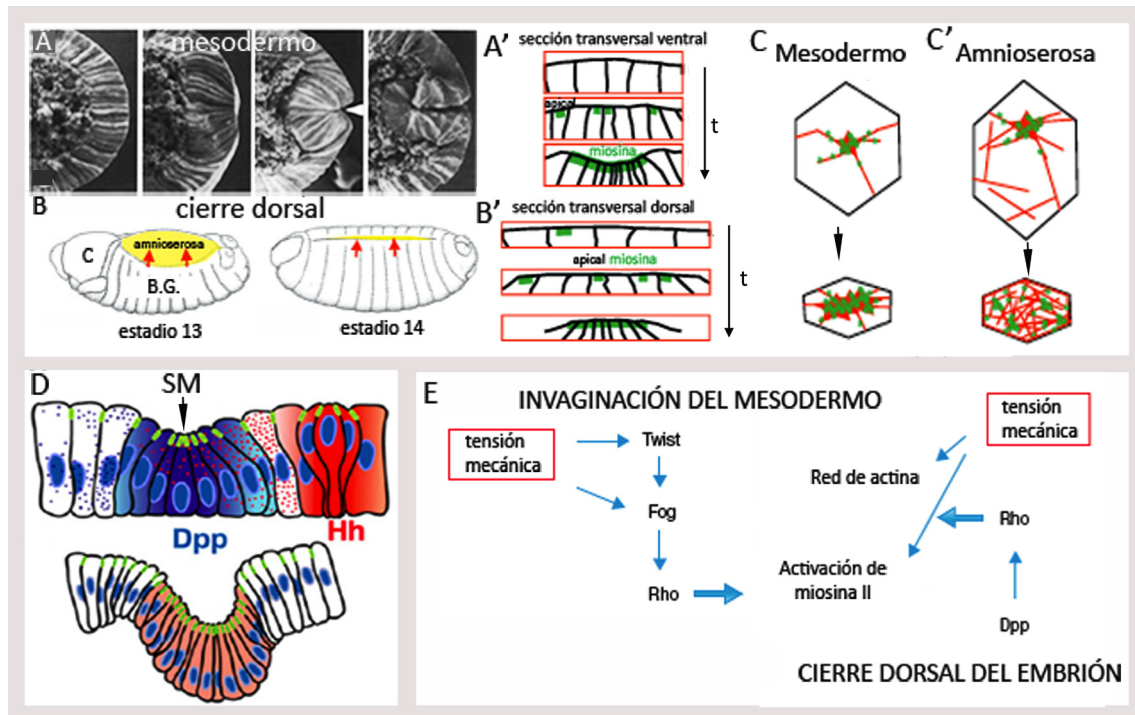


Figura I-13: la formación de pliegues en el desarrollo de *Drosophila*. **A:** Imágenes de la secuencia bajo microscopía electrónica de la invaginación del mesodermo (Ventral, a la derecha; Dorsal, a la izquierda). Tomado de Sawyer et al., 2009. **B:** Esquema del cierre dorsal del embrión (C: cabeza; BG: banda germinal). Representación gráfica de la acumulación de la miosina II durante la invaginación del mesodermo (A') y el cierre dorsal del embrión (B') ("t" indica transcurso del tiempo en ambos procesos). Tomado de Gorfinkiel y Blanchard, 2011. **C, C':** Esquema de la asociación subcelular de la actina (rojo) y miosina II (verde) descrita durante el cambio de forma que sufren las células en la invaginación del mesodermo (C) y en las células de la amnioserosa durante el cierre dorsal (C'). Tomado de Gorfinkiel y Blanchard, 2011. **D:** Los morfógenos Hh y Dpp dirigen la activación de la miosina II en el surco morfogenético (SM) del disco imaginal de ojo. Tomado de Corrigal et al., 2007. **E:** Resumen de los mecanismos que regulan la bioquímica y la mecánica del esqueleto de actina y miosina II. Los elementos que regulan este proceso promueven cambios en la tensión mecánica de las células a diferentes niveles. La miosina II no muscular se activa cuando está fosforilada por quinasas efectoras de Rho, estabilizada y localizada en posiciones subcelulares concretas. Tomado de Gorfinkiel y Blanchard, 2011.

Como hemos dicho anteriormente, la formación de un pliegue durante la fase de prepupa se requiere para la morfogénesis de las uniones presuntivas de los tarsos. En los pliegues de las futuras uniones, un grupo de células sufren constricción apical. De hecho, se sabe que diferentes activadores o inhibidores de las GTPasas (RhoGEF y RhoGAP, respectivamente) se expresan en las uniones presuntivas bajo control de la vía de Notch, y que son necesarias para la formación de las mismas (Greenberg y Hatini, 2010).

Como veremos en esta Tesis, el objetivo principal consiste en estudiar los mecanismos que generan las articulaciones de los tarsos de la pata. Hemos analizado que la unión presuntiva en el disco se forma mediante la apoptosis y la activación de la miosina II. Además, para ampliar el conocimiento relativo a las vías de señalización que orquestan este proceso, describiremos nuevas funciones del gen *zfh-2* durante la formación de las articulaciones.

OBJETIVOS

El tema central de esta tesis es el estudio de nuevos elementos implicados en la regulación de los procesos de apoptosis y morfogénesis de las articulaciones distales de *Drosophila*.

Para abordarlo se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Describir la expresión y función de la GTPasa Rho1 y de los elementos implicados en la activación de la miosina II no muscular durante la morfogénesis de las articulaciones de los tarsos.
2. Analizar la posible relación entre la apoptosis y la activación de la GTPasa Rho1 durante la formación de las uniones tarsales.
3. Profundizar en el estudio de la función del gen *zfh-2* en la morfogénesis de los segmentos tarsales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Todas las estirpes y cruces de moscas requeridos para esta tesis se mantuvieron en medio de cultivo estándar, con excepción de los cruces que fueron diseñados para observar la muerte celular en tiempo real, donde las moscas crecieron en medio de cultivo estándar suplementado con Naranja de acridina (ver apartado “Cultivo *ex vivo* de discos imaginales de pata”). Las cámaras de incubación se encuentran a temperaturas constantes de 17 °C, 25 °C ó 29 °C y fueron utilizadas en función de las condiciones experimentales. La condición de humedad relativa del aire siempre se mantuvo al 75%.

Cepas de moscas

La cepa silvestre utilizada es *Oregón-R*.

Los experimentos de expresión ectópica se llevaron a cabo mediante el sistema Gal4-UAS (Brand y Perrimon, 1993) (Figura M-1).

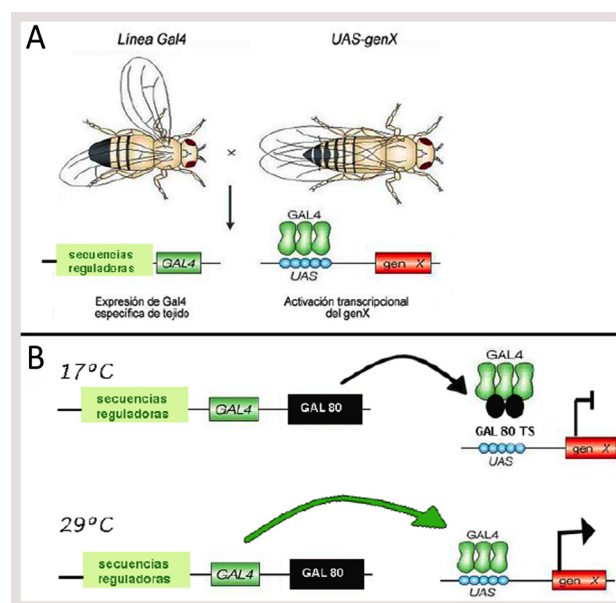


Figura M-1: El sistema Gal4/UAS. A: Este sistema permite dirigir la expresión de un gen de interés X en un tejido concreto y en un momento determinado. Para ello, la secuencia codificante para el activador transcripcional de levaduras Gal4 se incluye en un elemento transponible (elemento P), y éste se inserta al azar en el genoma de *Drosophila*. Esto permite generar líneas de moscas en las que la proteína Gal4 se expresa en el patrón espacial y temporal específico definido por la secuencias reguladoras del gen junto al que se ha insertado. La proteína Gal4 dirige la transcripción génica cuando se une a sus secuencias diana UAS (Upstream Activating Sequences), activando de manera constitutiva la expresión de cualquier gen que se encuentre a continuación de dichas secuencias. Modificado de Brand y Perrimon, 1993. B: El sistema Gal4-Gal80^{TS} permite la supresión de la actividad de la proteína Gal4 a 17 °C, temperatura en la que la proteína Gal80^{TS} es capaz de inhibirla. A 29°C, la proteína Gal80^{TS} queda inactiva, permitiendo la unión de la proteína Gal4 a las secuencias UAS (McGuire et al., 2003).

Líneas Gal4: La línea *hh*-Gal4 (Tanimoto et al., 2000) dirige la expresión de genes en el compartimento posterior del disco imaginal de pata y la línea *Dll*-Gal4 MD23 (Calleja et al., 1996) lo hace en la región distal del mismo. La línea *ap*-Gal4 (Calleja et al., 1996) comprende la región del tarso 4 y la parte mas proximal del tarso 5, así como la articulación entre ambos tarsos. La línea *zfh-2*^{LP30}-Gal4 fue aislada por G. Morata según el método descrito en Calleja et al., 1996. *bib*-Gal4^{NP4281} se expresa en todas las uniones de la pata (Hayashi et al., 2002). La línea *ptc*-Gal4 se expresa en una franja de células anteriores al borde de compartimento A/P, y está disponible en la colección “Bloomington *Drosophila* Stock Center” (#2017). La línea *rn*-Gal4 se expresa en una región específica de los tarsos, abarcando desde la mitad del tarso 1 hasta la mitad del tarso 4 (la línea fue un regalo de F. Díaz Benjumea)(Greenberg y Hatini, 2009). Las líneas Gal4 están resumidas en la Figura M-2.

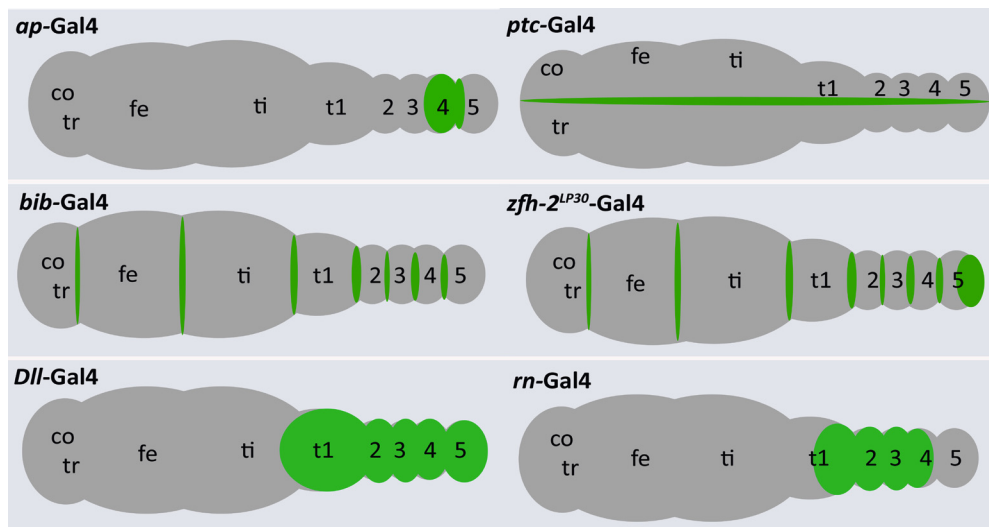


Figura M-2: Dominios de expresión de las líneas Gal4 utilizadas. En gris se esquematizan los segmentos del disco imaginal de pata de la prepupa de *Drosophila*. En verde, el dominio de expresión de las líneas Gal4 que utilizamos en esta tesis.

Líneas UAS

Para marcar el dominio de activación de las diferentes líneas Gal4 con la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizó la cepa UAS-GFP (Ito et al., 1997).

La línea UAS-P35 (Hay et al., 1994) se utilizó para la inhibición de las caspasas efectoras. La inducción de muerte celular se llevó a cabo sobreexpresando *hid* con la línea UAS-*hid*, descrita en “Bloomington *Drosophila* Stock Center”.

La línea UAS-Rho1^{V14} fue utilizada para expresar una forma constitutivamente activa de la GTPasa Rho1 (Fanto et al., 2000) y la línea UAS-Rho1 (Stramer et al., 2005) para incrementar los niveles de Rho1. La línea UAS-RhoGEF2 se utilizó para expresar elevados niveles del factor activador de Rho1, RhoGEF2 (descrito en flybase, <http://flybase.org/>). La línea UAS-YFP-*zip*^{DN}, a la que nos referimos como UAS-*zip*^{DN} promueve la síntesis de una forma truncada de *zipper* capaz de eliminar su función (Dawes-Hoang y cols., 2005). La línea UAS-MbsN300 dirige la sobreexpresión de la subunidad de la fosfatasa que inhibe específicamente la fosforilación de la cadena reguladora de la miosina II no muscular (del inglés, MRLC, que es codificada por el gen *spaghetti-squash*); esta línea fue utilizada para bloquear la activación de MRLC (Lee y Treisman, 2004).

Para llevar a cabo experimentos de ganancia de función del gen *zfh-2* utilizamos la línea UAS-*zfh-2*^{mcherry} (datos sin publicar, regalo de F. J. Díaz-Benjumea). La expresión de este transgén permite monitorizar la presencia de la proteína fluorescente mcherry en la región donde se expresamos la proteína Zfh-2 exógena. La construcción, que contiene las secuencias UAS y región codificante para la proteína mcherry, está inserta en el primer exón del gen *zfh-2* (este tipo de construcciones se denominan “EP hostile takeover”, datos no publicados). Así, cuando se combina con una línea Gal4 podemos incrementar la presencia de la proteína Zfh-2 (comunicación personal de F. J. Díaz Benjumea), acoplada al fluoróforo mcherry.

Para visualizar la actividad de la vía de la GTPasa Rho1, se utilizó la línea UAS-RBD (Dominio de unión a Rho1, del inglés “Rho Binding Domain”). Como se describe previamente (Simoes et al., 2006), este transgén permite expresar en el dominio de expresión de una línea Gal4 concreta, una proteína unida a GFP que es capaz de unirse a la proteína Rho1 activa, mientras que no puede unirse a la proteína Rho inactiva. En el clonaje de esta proteína, la mutación en tres sitios específicos del dominio de activación fosforilable de la GTPasa Rho1 (dominio PKN) son la clave para que la unión tenga lugar únicamente con Rho1. Esto permite localizar la GFP al estado activo de Rho1; así, como describen sus autores, esta construcción sirve de “sensor” *in vivo* de la activación de la GTPasa Rho1 facilitando así visualizar las células en las que la vía se encuentra activa.

Inactivación ectópica de genes: silenciamiento con cepas UAS RNAi

La interferencia de RNA se basa en la fragmentación de una molécula RNA de doble cadena (dsRNA) en unidades más pequeñas que inducen la degradación específica de secuencia del RNA mensajero de un gen determinado. En *Drosophila*, la producción de RNA de interferencia (RNAi) puede dirigirse mediante el sistema Gal4-UAS y así interferir en la función de un gen en un tejido y momento determinados del desarrollo (Dietzl et al., 2007). En algunos casos donde las líneas transgénicas no son capaces de eliminar totalmente la función del gen, para potenciar la maquinaria RNAi de la célula se aumentan conjuntamente los niveles de expresión de la proteína Dicer-2, que interviene en la maduración de los RNA. Para ello, la línea UAS-Dicer-2 fue combinada en diversos experimentos con el UAS-RNAi correspondiente (Lee et al., 2002; Dietzl et al., 2007).

Las líneas UAS-*zfh-2* RNAi 19.3 fue realizada previamente en el laboratorio (Manjón, 2007; Terriente et al., 2008) incluye las secuencias de los cebadores utilizados para su construcción (“upper primer” y “lower primer”). Las siguientes líneas UAS-RNAi se obtuvieron de la colección “Vienna Drosophila RNAi Center” (Dietzl et al., 2007): UAS-*Rho1* RNAi (#12734), UAS-*ROK* RNAi (#3793), UAS-*sqh* RNAi (#7917), UAS-*zfh-2* RNAi (#13305) y UAS-*Rap1* RNAi (#33437).

Líneas mutantes

Para estudiar el fenotipo de falta de función del gen *dAP-2*, los discos de pata fueron disecados de la descendencia de las líneas mutantes *AP-2¹¹* y *AP-2¹⁵*. La combinación de ambos alelos (hipomorfo y nulo respectivamente) en transheterocigosis es viable en un reducido número de individuos (Monge et al., 2001). *AP-2¹¹* FRT80B/TM3 (#23920) y *AP-2¹⁵* FRT80B/TM6C (#23721) están listadas en “Bloomington Drosophila Stock Center” (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>).

Líneas LacZ

La línea *rpr-4kb-LacZ* está descrita en (Jiang et al., 2000). *hid^{w05014}* (*hid-LacZ*) es una inserción del elemento P-LacZ en la región codificante del gen *hid*. Esta construcción está disponible en la colección “Bloomington Drosophila Stock Center” (#11642), y ha sido publicada previamente como “indicador” de la actividad del gen *hid* (Adachi-Yamada et al., 2005). Las líneas *bib-LacZ*, *E(spl)-LacZ* y *E(spl)mβ-CD2* son un regalo de J.F de Celis (de Celis et al., 1998).

Monitorización de proteínas fluorescentes: cepas “protein-trap”

zipper-GFP y *Rho1-GFP* fueron obtenidas de la colección FlyTrap, disponible en <http://flytrap.med.yale.edu/>. La línea *sqh-GFP* 43.1 es un regalo de J. Casanova (Royou et al., 2004).

Experimentos de cambio de temperatura

El establecimiento del eje proximo-distal de la pata tiene lugar hasta las 84h de desarrollo. Sin embargo, la formación de las uniones tiene lugar a partir de este momento. Los experimentos dirigidos a describir la función de diversos elementos en la morfogénesis de las uniones se realizaron con el sistema Gal4-Gal80^{TS} evitando así interferir en el establecimiento del eje P/D de las patas. En estos experimentos, la proteína Gal80^{TS} está activa a la temperatura restrictiva de 17 °C impidiendo la expresión de la proteína Gal4, mientras que a 29 °C, la proteína Gal80^{TS} se degrada. Así, si el experimento se traslada a 29 °C se permite la expresión de la proteína Gal4 (McGuire et al., 2003). La construcción *tub-Gal80^{TS}* permite producir la proteína Gal80^{TS} en todas las células del tejido (bajo el control del promotor del gen codificante para la tubulina, *tub*), y su efecto tendrá lugar únicamente en las células donde se encuentre la proteína Gal4. Indicamos los experimentos de esta Tesis en los que esta construcción se utiliza.

Análisis clonal

Para estudiar la falta de función de genes cuyas mutaciones son letales se utilizaron clones de recombinación mitótica de secuencias FRT mediada por flipasa (flp) (Xu y Rubin, 1993). Mediante esta técnica, en un

determinado tejido, a partir de células que llevan la mutación de un gen en heterocigosis, se pueden obtener células mutantes homocigóticas para el mismo; estas células, a su vez, están marcadas por la ausencia o presencia de una proteína indicadora determinada. Para estudiar el efecto de la falta de función de RhoGEF2 en el disco imaginal de pata, se disecaron larvas UbiGFP FRT42B/RhoGEF2 FRT42B (Nikolaidou y Barrett, 2004). En este tejido, el territorio mutante está marcado por la ausencia de la proteína GFP.

Construcción de la sonda de RNA de AP2

Para detectar las células que expresan el gen *dAP2* en el disco imaginal de pata, sintetizamos la sonda de RNA a partir del plásmido BDGP EST RE17884 (regalo de J.F. de Celis) que contiene el cDNA del gen *dAP2*. La mayoría de los genes de *Drosophila* se han clonado durante años por miembros de la comunidad científica de *Drosophila*. Estos datos han sido agrupados en el Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) y han llevado a publicar la colección del cDNA del 70% de los genes de *Drosophila* (DGC, Drosophila Gene Collection) (Stapleton et al., 2002). Esta colección está disponible en <http://www.fruitfly.org/>. El cDNA de AP2 se linearizó con la enzima de restricción Not I y se transcribió con ribonucleótidos marcados con dioxigenina y la RNA polimerasa T3 (según el método del Kit Riboprobes, Roche).

Hibridación in situ

Para revelar la sonda marcada con dioxigenina (Dig) del gen *dAP2* se utilizó el protocolo que se encuentra en el libro *Drosophila Protocols* con pequeñas modificaciones (Sullivan et al., 2000). Las larvas se diseccionan en PBS 1X para extraer los discos imaginales de pata y se fijan 30 minutos en paraformaldehído (PF) al 4%; tras dos lavados con PBT (PBS-Tween al 0,1%) se vuelve a fijar en PF al 4% y Tween 20 al 0,1%. Luego se hace una secuencia de lavados con las siguientes proporciones PBT/ Solución de Hibridación (SH): 70/30, 50/50, 30/70 y finalmente dos lavados con SH. Tras prehibridar las larvas 1h a 55 °C, se incuban los discos toda la noche con la sonda a 55 °C, previamente hervida 10 minutos a 80 °C y enfriada en hielo 2 min. Al día siguiente se realizan una serie de lavados en condiciones decrecientes de SH hasta lavar 4 veces con PBT. Después los discos se bloquean con PBT-BSA (PBS, Tween al 0,1% y BSA al 1%) y se incuban al menos 1 hora con el anticuerpo anti-Dioxigenin-AP (Roche). Tras cuatro lavados en PBT, las larvas se trasladan a 500 µl de solución de revelado (SR), y se añaden 4,5 µl de Nitro-Blue-Tetrazolium chloride (NBT, Roche) y 3,5 µl de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Roche). La reacción se sigue bajo la lupa binocular, y cuando está lista, se montan los discos en glicerol.

Solución de Hibridación (para 500 ml): 250 ml formamida demonizada, 5 ml de esperma de salmón 10 mg/ml, 50 mg/ml heparina, 0,1% Tween 20, enrasar con H₂O libre de RNAsa.

Solución de revelado (para 4 ml): 400 ml de TrisHCl 1M pH 9.5, 100 ml NaCl 4M, 200 ml MgCl₂, 40 ml Tween 20 al 10%, enrasar con H₂O libre de RNAsa.

Inmunohistoquímica

Para detectar con anticuerpos específicos la localización de diversas proteínas, utilizamos el protocolo descrito en el libro *Drosophila Protocols* con pequeñas modificaciones (Sullivan et al., 2000). Las larvas se disecan en PBS 1X para extraer los discos imaginales de pata y se fijan 20 minutos en paraformaldehído (PF) al 4% con 0,1% de DOC y 0,1% de Tritón. Se para la fijación con un lavado de 5 minutos en PBS 1X y se bloquea el tejido en dos lavados consecutivos con PBT-BSA (PBS, Tritón al 0,3% y BSA al 1%). La incubación con el anticuerpo se desarrolla a 4 °C toda la noche. Al día siguiente las larvas se lavan 3 veces en PBS y se incuban 1-2h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios y en oscuridad. Después de otros 3 lavados con PBS se separan y se montan los discos en el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc).

Para la detección de proteínas en discos imaginales se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

Anti-Hid de cobaya purificado (fué un regalo de Hyung Don Ryoo, NYMC, New York, USA, publicado en Shlevkov y Morata, 2011).

Anti-Dpn de cobaya (regalo de Yuh Nung Jan, HHMI, University of California School of Medicine, US).

Anti-βGalactosidasa de conejo (Capel) y de ratón (Promega).

Anti RhoGEF2 de conejo (Grossans et al., 2005).

Anti sqh-1P de cobaya y anti sqh-2P de rata (Zhang y Ward, 2010).

Anti P-MRLC de conejo, de Cell Signalling Technology (Escudero et al., 2007).

Anti-Zfh2 de rata (regalo de C. Q. Doe, datos sin publicar).

Para estudiar la morfología celular, la actina filamentosa (F-actina) se visualiza al añadir la faloidina junto con los demás anticuerpos secundarios. Se encuentra disponible acoplada a tres fluoróforos diferentes: TRITC-Faloidina, Phalloidin-Atto 647N y Phalloidin-Atto 488 (Sigma Aldrich). La detección de DNA se realizó con To-pro 3 (# T3605, Life Technologies).

Para detectar las células apoptóticas en tejido fijado se utilizó el anticuerpo primario de conejo Anti caspasa-3 activada de humanos (Cell Signalling Technology), que reconoce también la forma activa de la caspasa efectora Drice de *Drosophila* (Yu et al., 2002).

Los anticuerpos secundarios estaban acoplados a los fluoróforos 488, 555 y 647 (Alexa).

Cultivo *ex vivo* de discos imaginales de pata

Esta técnica permite el estudio en tiempo real de tejidos vivos. Bajo microscopía confocal podemos seguir la formación del pliegue presuntivo de las articulaciones en el disco de pata de *Drosophila*. Este protocolo fué modificado y puesto a punto a partir de trabajos recientemente publicados sobre el cultivo *ex vivo* de ovarios y discos de ala (Prasad et al., 2007; Aldaz et al., 2010) en *Drosophila* por la Dr. Magali Suzanne (laboratorio de Hermann Steller, The Rockefeller University, NY, USA). Mediante esta técnica se pueden seguir movimientos de las células en el tejido y cambios de expresión génica que no alcanzamos a estudiar de forma tan precisa mediante técnicas de inmunohistoquímica en tejido fijado. Los discos imaginales de pata se extraen en el inicio de la fase de prepupa, durante las 6h anteriores a la formación del pupario, 0h APF (del inglés "after puparium formation"), momento en el que se inicia la morfogénesis de los discos de pata (Mirth, 2005). Más específicamente, la articulación que une los tarsos t4 y t5 comienza su morfogénesis con un pequeño retraso en comparación al resto de articulaciones tarsales (Shirai et al., 2007), siendo ésta la unión que se estudia en los experimentos que hemos realizado con esta técnica (en las películas, establecemos el tiempo t=0 min cuando la articulación entre los tarsos t4 y t5 aún no ha comenzado a formarse).

Para simular las condiciones del interior de la larva, en primer lugar los discos se extraen de la larva en la mezcla de disección, compuesta por medio de cultivo de líneas celulares de *Drosophila* "Schneider's" (11720-034, Invitrogen), suplementado con 15% de Suero Bovino Fetal (FBS) (10106-169, Invitrogen) y 0,5% de la mezcla comercial de antibióticos Penicilina-Streptomina (15140-122, Invitrogen). Para evitar que el disco flote e impida tomar imágenes correctamente, la mezcla de montaje se compone de mezcla de disección y Metil-Celulosa (M0387-100G, Sigma) al 0,4%. Para el marcaje de membranas celulares se añade el colorante liposoluble FM464 (T3166, Molecular Probes) únicamente a la mezcla de disección, para que éste se incorpore a las células en niveles no muy elevados ni tóxicos para las células (modificado de Mirth y Akam, 2002) (Figura M-3).

Al inicio de la pupación, la larva sufre un incremento de niveles de la hormona ecdisona, responsable de promover el cambio de fase larvaria a pupa (Mirth, 2005). Por tanto, para simular el inicio de la eversión de los discos de pata que sufren las larvas en este momento del desarrollo, añadimos al medio 20-Hydroxyecdisona (20-HE) (H5142, Sigma Aldrich) a una concentración final de 0,1 ug/ml (adaptado de Aldaz et al., 2010). Con el fin de evitar contaminaciones y la eversión prematura de los discos imaginales, las mezclas de disección y montaje fueron preparadas en el momento inmediatamente previo a la observación en tiempo real bajo microscopía confocal.

Mezcla de disección: 500 µl de medio "Schneider's"-15% FBS- 0,5% Penicilina-Streptomina , 2,5 µl 20-HE y 2,5 µl de FM4-64.

Mezcla de montaje: 300 µl de medio "Schneider's"-15% FBS- 0,5% Penicilina-Streptomina, 60 µl de una solución stock de medio "Schneider's con Metilcelulosa al 2,5% y 4 µl de 20-HE.

Para visualizar la activación de la apoptosis en grupos discretos de células, las moscas y su descendencia crecieron en medio de cultivo estándar instantáneo (173204 Formula 4-24, Carolina) suplementado con 100 µg de Naranja de acridina (NA, A6014, Sigma) en cada tubo. La NA es un colorante fluorescente (verde) que se incorpora a las células apoptóticas (White et al., 1994).

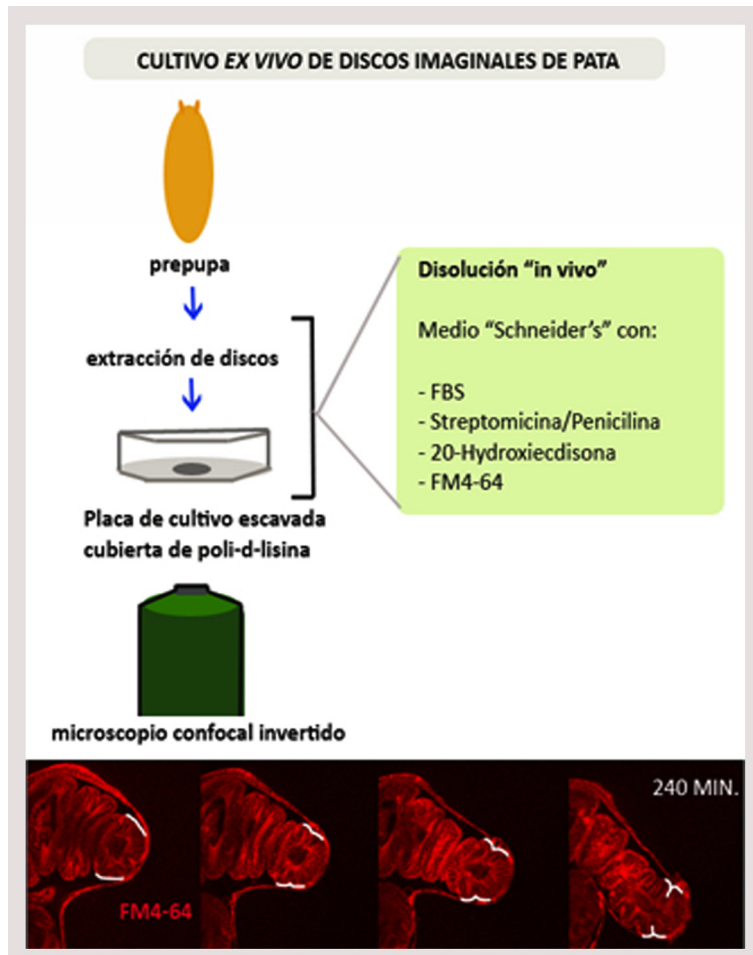


Figura M-3: Esquema del cultivo ex vivo de discos imaginales de pata para la adquisición de imágenes. Los discos se colocan en la "mezcla de montaje" dentro de una placa excavada (P35GC-1.5-10-C Mattek Corporation), donde la región circular de 35 mm de diámetro esta cubierta en su base por un cubreobjetos de vidrio, optimizando así la observación por microscopía confocal. Estas placas están cubiertas por Poli-D-Lisina, favoreciendo la adhesión del tejido al cubreobjetos de vidrio. Los experimentos tuvieron lugar entre 2h y 5h, tiempo en el que los discos son viables. El intervalo entre imágenes era variable, de 2 a 5 minutos en función de cada experimento. Abajo, se observa la formación del pliegue entre los tarsos t4 y t5 (en rojo, FM464; imagen tomada de M. Suzanne).

Adquisición de imágenes

Las imágenes del cultivo de discos *ex vivo* fueron adquiridas en un microscopio invertido a temperatura ambiente y las preparaciones de inmunohistoquímica se fotografiaron en un microscopio vertical (ambos son modelo LSM 510 Zeiss) . El tratamiento de imágenes de los experimentos *ex vivo* y la aplicación de los filtros de gradaciones de colores para la evaluación cualitativa de niveles de fluorescencia (naranja-violeta o "fire" y 16 colores) fue realizado con el programa de libre acceso Fiji/ImageJ. El montaje de los demás experimentos se ha realizado con Adobe Photoshop®.

Preparación de cutículas adultas

Las partes de las moscas que nos interesan fueron hervidas en KOH 10%, lavadas con agua destilada y montadas en medio de montaje Hoyer's. Este medio de montaje necesita estar toda la noche a una temperatura de 60° C para solidificar, evitando así la entrada de aire en la preparación. Estas preparaciones se fotografiaron en un microscopio de campo claro Zeiss Axiophot.

RESULTADOS

1. PAPEL DE LA GTP-ASA RHO1 EN LA MORFOGÉNESIS DE LAS ARTICULACIONES DE LOS TARSOS

Desde el final del tercer estadio larvario, en el epitelio del disco comienzan a formarse en el disco de pata una serie de pliegues concéntricos que prefiguran las futuras articulaciones. Al inicio de la pupación el disco evierte a lo largo del eje P/D permitiendo observar dichos pliegues fácilmente. El desarrollo de las articulaciones sigue un proceso complejo cuyas fases intermedias y tardías han sido descritas en gran medida (Mirth y Akam, 2002; Tajiri et al., 2010). Sin embargo, los mecanismos que llevan a la formación de los pliegues en el epitelio durante las primeras fases de la prepupa y pupa no han sido, en su mayor parte, determinados.

Se sabe que la formación de dichos pliegues va acompañada de la constricción apical de las células que definen el territorio de la futura articulación (Manjón et al., 2007). Para este proceso se requiere la muerte celular, de tal forma que si ésta se impide, el pliegue (y la articulación en el adulto) no se forman o lo hacen de forma incompleta (Manjón et al., 2007). Sin embargo, se desconocen las señales implicadas en la formación de estos pliegues en relación a la activación de la apoptosis, y por tanto su implicación durante la formación de las uniones entre los tarsos.

En varios procesos celulares en los que se forman pliegues en el epitelio es necesaria la actividad de la miosina II no muscular (revisado en Sawyer et al., 2009), por lo que decidimos investigar si dicha molécula, así como los elementos que la activan, son requeridas en la formación de las uniones tarsales. En este capítulo de resultados describiremos la distribución de dichos productos y los requerimientos de su actividad en la formación de las articulaciones.

La GTPasa Rho1 y su factor activador RhoGEF2 presentan un patrón dinámico durante la formación de las uniones tarsales presuntivas

Se ha descrito que la familia de las GTPasas Rho pueden ver modulada su actividad por moléculas capaces de promover el paso de GDP a GTP, que se encuentra unido a la GTPasa, y viceversa. Los GEFs y GAPs (del inglés, “Guanine Exchange Factors” y “Guanine Activating Proteins”) se encargan de activar e inhibir, respectivamente, a las GTPasas. Además, los elementos GDIs (del inglés, “Guanosine nucleotide dissociation inhibitors”) se encargan de mantener a las GTPasas en su estado inactivo. La regulación de estas GTPasas permite modular, a través de sus efectores, la formación del motor molecular de acto-miosina para el correcto modelado de los tejidos (revisado en Sawyer et al., 2009 y en Gorfinkiel y Blanchard, 2011).

Para conocer el papel de la proteína GTPasa Rho1 en el proceso de formación de las uniones, en primer lugar quisimos conocer su localización en el tejido imaginal de pata. Utilizamos individuos transgénicos portadores de un transposón que contiene la secuencia codificante de la proteína fluorescente GFP insertada en uno de los intrones del gen *Rho1* (este tipo de líneas se conocen como “protein traps”). A partir de ahora nos referimos a esta cepa transgénica como *Rho1*-GFP. Un factor activador de Rho1 es la proteína RhoGEF2 (Symons y Settleman, 2000). Recientemente, Greenberg y Hatini han descrito la expresión del gen RhoGEF2 en las zonas presuntivas de las uniones tarsales (Greenberg y Hatini, 2010). Ya que se desconoce si la GTPasa Rho1 está activada por RhoGEF2 en el disco de pata, realizamos experimentos de inmunohistoquímica para colocalizar ambas proteínas.

En el disco de pata de prepupa, los pliegues de las uniones presuntivas entre los tarsos t1 y t4 se han formado ya, mientras que la constricción apical de la futura unión entre los tarsos t4 y t5 aún no lo ha hecho. Así, de manera simultánea, podemos analizar en el mismo tejido los procesos celulares y la expresión génica en una fase avanzada (unión entre los tarsos t3 y t4) o en una fase inicial (unión entre los tarsos t4 y t5).

Observamos cómo la proteína Rho1 se comienza a acumular en las regiones apico-laterales de la región donde se va a formar la articulación entre los tarsos t4 y t5. Esta localización específica se detecta tanto a niveles apicales (Fig. R-1A, A') como en una sección apicolateral del tejido (Fig. R-1B, B'). Una vez el pliegue se ha formado (entre los tarsos t3 y t4), los niveles de fluorescencia parecen mayores que al inicio de la

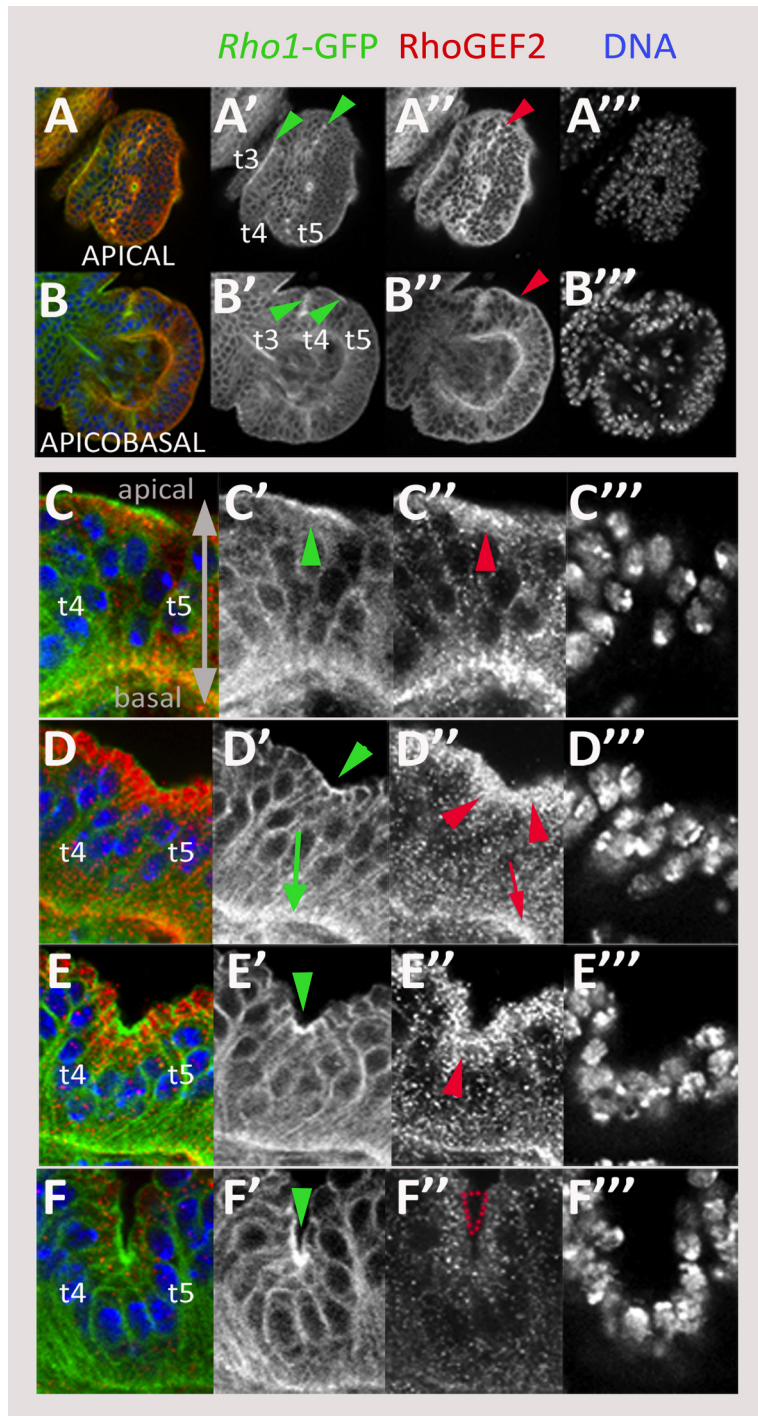


Figura R-1. Localización de *Rho1*-GFP y RhoGEF2 durante la formación del pliegue entre los tarsos t4 y t5. A, B: Sección apical (A) y apicobasal (B) del mismo disco, donde *Rho1*-GFP (en verde en A, B, en gris en A', B'; las puntas de flecha señalan la acumulación de la proteína) tiene un patrón cambiante en el eje apico-basal y se corresponde con la variación de la distribución de RhoGEF2 (rojo en A, B, en gris en A'', B''; las puntas de flecha señalan estas acumulaciones). En azul (A, B) o gris (A''', B''') se muestra Topro, que marca el DNA. C-F: Ventanas temporales (C-C'', D-D'', E-E'' y F-F'') de la formación del pliegue (los colores que indican la expresión de *Rho1*-GFP, RhoGEF2 o el marcaje con Topro, como en los paneles anteriores). Obsérvese la localización discreta de *Rho1*-GFP acompañada de la distribución más extendida de RhoGEF2 en el pliegue, así como la presencia de *Rho1*-GFP (verde en D, gris en D'; mas fuerte en E y E') y RhoGEF2 (rojo en D, gris en D'') en la base de las células (flechas). Las puntas de flecha verdes indican las acumulaciones de *Rho1*-GFP (C', D', E', F'), mientras que las puntas de flecha rojas indican las zonas donde se detectan acumulaciones de RhoGEF2 (C'', D'', E''). La flecha punteada en F'' indica la ausencia de RhoGEF2. En todas las figuras, las patas están orientadas con la parte más distal a la derecha.

indentación. La presencia del factor de intercambio de nucleótidos de guanina, RhoGEF2, detectado con un anticuerpo específico contra la proteína, se observa a altos niveles en la fase inicial de la formación del pliegue (Fig. R-1A, A'' y R-1B, B''), mientras que una vez el pliegue se ha formado RhoGEF2 ya no se detecta.

Para estudiar más a fondo la variación de la distribución de estas dos proteínas mientras se forma el pliegue que separa los tarsos t4 y t5, realizamos un estudio mas detallado de su colocalización durante este proceso (Fig. R-1C-F'''). Establecemos cuatro "ventanas temporales" para tal estudio. En la primera (Fig. R-1C-C'''), vemos una acumulación incipiente de Rho1, acompañada de elevados niveles de RhoGEF2 en el dominio apical de estas células. En la segunda ventana temporal (Fig. R-1D-D'''), ya es evidente una pequeña indentación en el epitelio. La localización específica de la proteína Rho1 en el dominio apical de las células va acompañada de una distribución algo menos localizada de RhoGEF2. En la tercera ventana temporal (Fig. R-1E-E'''), la diferencia entre la localización discreta de Rho1 y la presencia extendida de RhoGEF2 se hace mas evidente. En la cuarta y última ventana temporal (Fig. R-1F-F'''), las células han sufrido totalmente la constricción de sus ápices permitiendo la formación completa del pliegue. En este momento RhoGEF2 no se detecta a niveles elevados, mientras que Rho1 mantiene una localización específica en el ápice de las células que han modelado activamente su morfología celular.

La acumulación de la proteína Rho1 tiene lugar en la región distal de cada tarso

Como hemos mencionado con anterioridad, la formación de las uniones requiere apoptosis, cuya localización se puede precisar por la expresión de la construcción indicadora *rpr-lacZ* (Manjón et al., 2007). Para situar la acumulación de Rho1 con respecto a las células que expresan *rpr*, observamos la expresión de las proteínas β -Galactosidasa y GFP en discos de prepupas *Rho1-GFP/rpr-LacZ* (Fig R-2). Antes de formarse el pliegue en el epitelio de los futuros tarsos 4 y 5, la expresión de *rpr-LacZ* ya es evidente (aunque algo más débil que en las demás uniones tarsales, Fig R-2A, A', A'') mientras que aún no se observan mayores niveles de Rho1 (Fig. R-2A, A', A''). Una vez el pliegue se ha formado, como puede observarse entre los tarsos 3 y 4, los mayores niveles de Rho1 se detectan en el pliegue, en la parte mas distal del anillo de *rpr-LacZ* (Fig. R-2A, A', A''). Es importante destacar que en el dominio de expresión de *rpr*, se puede distinguir una región proximal a la unión con mayores niveles de *rpr-LacZ*, y una región en la zona distal del anillo donde los niveles de *rpr-LacZ* son menores (Fig R-2A'''). En estas células que presentan menos niveles de *rpr-LacZ* es donde se acumula exactamente la Rho1 (Fig. R-2A, 2A'' y 2A''').

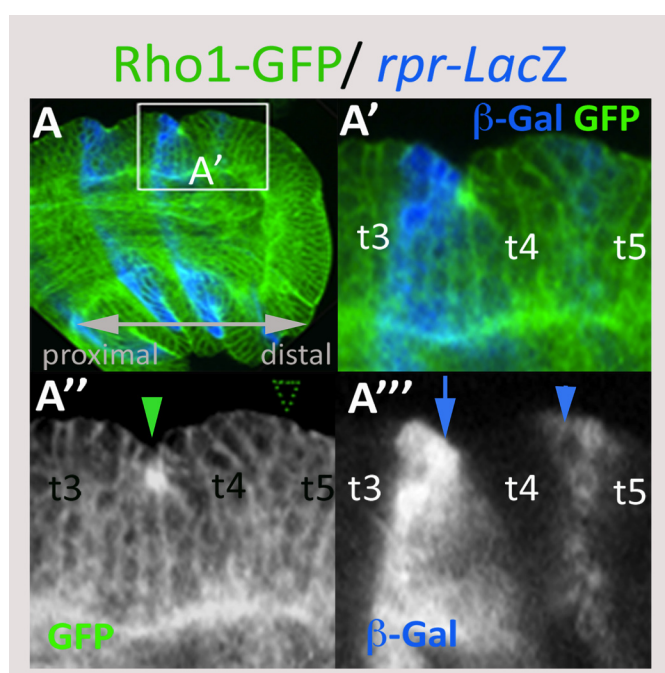


Figura R-2. Rho1GFP se localiza distalmente en las células *rpr-Z*. A: Localización en estados prepupales de Rho1 y *rpr-LacZ*: el aumento de la región dentro del recuadro (A') muestra altos niveles de *Rho1-GFP* (punta de flecha verde en A'') en la región apical de las células más distales del anillo de expresión de *rpr-Z* en la parte distal del tarso t3 (flecha azul en A'''). No hay acumulación de Rho1 (punta de flecha punteada en A'') antes de formarse el pliegue asociado a la unión presuntiva entre los tarsos t4-t5 (el anillo de *rpr-LacZ* asociado a esta unión esta marcado por la punta de flecha azul en A''').

La construcción UAS-RBD permite caracterizar *in vivo* los territorios celulares donde se encuentra activa la GTPasa Rho1

En el apartado anterior hemos descrito la localización apical de Rho1 en la región de la unión presuntiva. Para saber si la proteína Rho1 se encuentra activa, utilizamos una construcción específica para detectar a la GTPasa Rho1 activa *in vivo* (Simoes et al., 2006; ver Material y Métodos). Nos referimos a esta construcción como UAS-RBD (del inglés, "UAS-Rho Binding Domain"). Con esta construcción se observa un incremento de GFP únicamente en aquellas células donde la Rho1 se encuentra activa (Fig. R-3).

Expresamos la construcción UAS-RBD bajo control de *act-Gal4* (larvas *act-Gal4/+; UAS-RBD/+*). Observamos que los niveles elevados de GFP, y por tanto las regiones donde la Rho1 se encuentra activa, se restringen a los territorios celulares de las articulaciones proximales y distales (Fig. R-3A ,A'').

Para estudiar si este patrón de activación es dinámico durante la formación del pliegue, tal y como habíamos observado en tejido fijado de patas *Rho1-GFP*, realizamos experimentos de cultivo *ex vivo* de los discos de pata *act-Gal4 UAS-RBD*. La adquisición de imágenes cada 2 minutos durante unas horas permite monitorizar por imagen en tiempo real la activación de la proteína Rho1 durante la formación de las uniones (Imágenes de la película a tiempos t=0 y 162 min. en la Fig. 3B-B'' y Película 1, ver Anexo). Observamos que al inicio del proceso, el dominio de expresión de la proteína GFP entre los tarsos t4 y t5 es más estrecho que el existente entre los tarsos t3 y t4, donde el pliegue ya se ha formado (Fig. R-3B'). Mas tarde se incrementa la actividad de Rho1 en la unión en formación (Fig. R-3B' y B'') y se detecta además en los fragmentos de células del pliegue. Es decir, Rho1 está activa en las células más distales que conforman la constricción apical en el epitelio de las uniones presuntivas, en parte de la región proximal del tarso distal adyacente y en fragmentos de células cercanas a la base del epitelio (Fig. R-3B-B'').

La expresión de la construcción con otra línea Gal4 (prepupas *Dll-Gal4; UAS-RBD*) dio resultados muy parecidos (Fig. R-3C-C''). Pudimos observar la presencia de Rho1 activa en la unión de los tarsos t3-t4 y, además, activación de esta GTPasa antes de formarse el pliegue entre los tarsos t4 y t5 (Fig. R-3C'').

Es interesante resaltar la presencia de fragmentos celulares de morfología redondeada en algunas células donde la vía de Rho1 está activada. Estos fragmentos son dirigidos hacia la base del epitelio, pudiendo ser por tanto los cuerpos apoptóticos que son eliminados por delaminación (Fig. R-3B''). Con el fin de determinar si es así, colocalizamos la proteína GFP con elementos indicadores de la ruta apoptótica (anticuerpo específico contra la caspasa-3 activada) en discos de pata de prepupas *act-Gal4 UAS-RBD*. La posición de la formación del pliegue queda además definida por la expresión de la proteína Deadpan, producto del gen *dpn* (un gen diana de la vía de Notch), cuya expresión es específica de las uniones tarsales (Mirth y Akam, 2002). Dpn colocaliza con las células que expresan *rpr-LacZ* en los pliegues de las futuras uniones (Fig. R-4A). En el pliegue entre los tarsos t4 y t5 observamos que los dominios de actividad de Rho1 y Dpn son excluyentes (Fig. R-4B, B'). Esto confirma que la activación de Rho1 está ocurriendo en la región mas distal de las células formadoras del pliegue, abarcando además una franja de células mas proximales del tarso adyacente. Células con caspasa-3 activada se detectan coincidiendo con las células más proximales con proteína Rho1 activa. En una parte de las células que muestran señal de proteína Rho1 activada (Fig. R-4B-B'''), se detectan elevados niveles de caspasa-3 y Rho1 activa en los fragmentos apoptóticos . Esta observación es coherente con la función ya descrita en otros contextos biológicos, donde la caspasa-3 es necesaria y suficiente para actuar sobre los sustratos celulares y así fragmentar la célula y generar los cuerpos apoptóticos (*blebbing*)(revisado en Suzanne y Steller, 2009; Wickman et al., 2012). Una vez el pliegue esta formado entre los tarsos t3 y t4, el dominio de activación de Rho1 queda restringido a la franja de células más proximales del segmento adyacente. En resumen, encontramos dos tipos de células con la vía Rho1 activa: las células apoptóticas, antes y después del proceso de *blebbing*, y la franja de células distales al pliegue que forma parte del tarso adyacente y que son las únicas que la expresan una vez el pliegue se ha formado.

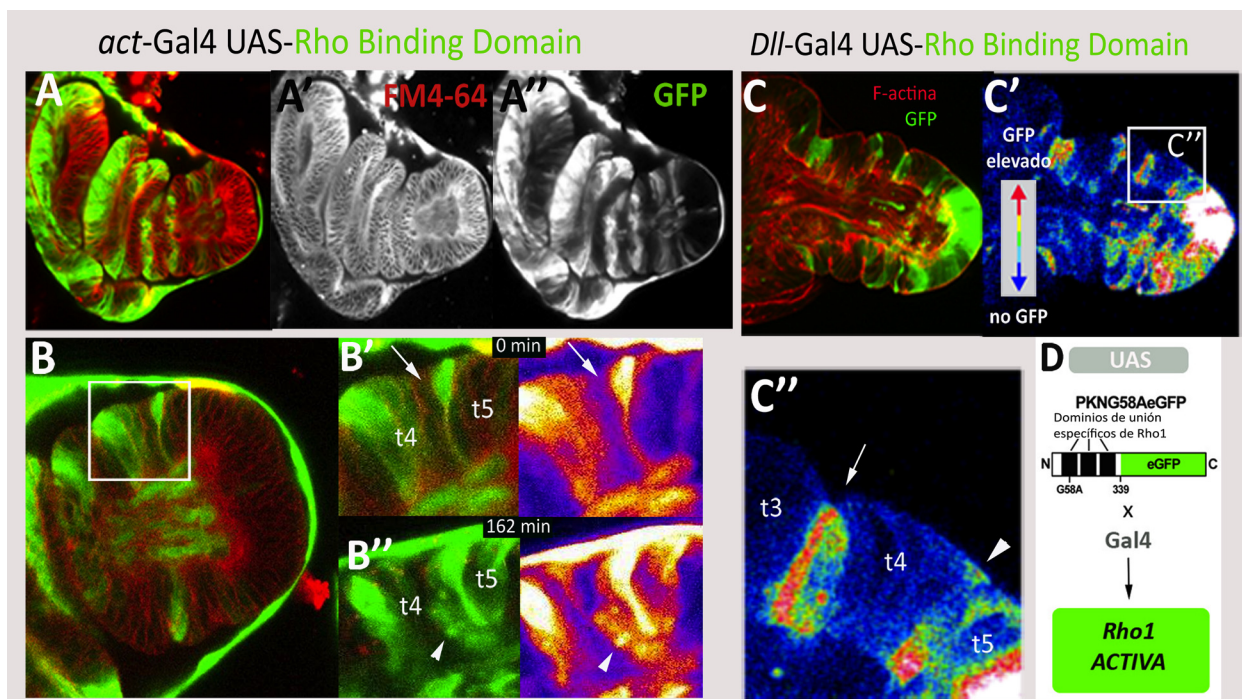


Figura R-3. La construcción UAS-RBD indica la localización de la proteína Rho1 activa en las uniones presuntivas. A-A'': Expresión de GFP (verde en A, gris en A'') cuando la construcción UAS-RBD se dirige de forma ubicua bajo control de la línea *act-Gal4* en un disco de pata en prepupa. El FM464 (rojo en A, gris en A') es un colorante que se incorpora a las membranas celulares. **B-B'':** Imágenes tomadas de la película 1 de discos *act-Gal4* UAS-RBD cultivados *ex vivo* en los tiempos $t=0$ y 162 min (los minutos desde el comienzo de la película se indican en B' y B''). La región indicada en B está aumentada en los diferentes tiempos en B' y B''. B'-B'': los niveles de GFP de cada panel se pueden seguir más fácilmente aplicando un filtro a la imagen donde la señal alta de GFP se muestra en colores naranja-blanco, y la señal reducida en violeta. Los niveles de actividad de Rho1 se detectan en las células distales de la constricción apical incipiente entre los tarsos t4 y t5 (flechas blancas en B'). Esta actividad también se detecta en los fragmentos de células presentes en la región basal del epitelio (puntas de flecha en B''). Las imágenes de la película fueron tomadas cada 2 minutos. **C:** disco de prepupa *Dll-Gal4* UAS-RBD. La presencia de Rho1 activa (verde en C) coincide con las futuras uniones. **C'-C'':** Filtro de 16 colores aplicado sobre los niveles de GFP (en rojo, altos niveles de GFP, frente al azul, que refleja ausencia de GFP). En el panel C'' (región ampliada de C') se indican los niveles de Rho1 activa en las células distales de la constricción apical de los tarsos t3 y t4 (flecha), mientras que en la región donde se va a formar la unión t4-5 la activación es incipiente (punta de flecha). **D:** Esquema de la construcción UAS-RBD. La secuencia de Rho1 con los dominios específicos mutados para reconocer específicamente a Rho1 fue clonada entre las secuencias UAS y eGFP. Su expresión bajo control de Gal4 permite monitorizar las células con Rho1 activa al producir elevados niveles de GFP. Modificada de Simoes et al., 2006.

La miosina II no muscular se acumula en las uniones presuntivas

Una de las proteínas efectoras de la GTPasa Rho1 es la quinasa Rho (ROK), encargada de fosforilar a las cadenas reguladoras de la miosina II no muscular. Esta miosina está formada por un hexámero de seis cadenas: dos cadenas ligeras, dos pesadas y dos reguladoras. Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas reguladoras están codificadas, respectivamente, por los genes *zipper* (*zip*) y *spaghetti squash* (*sqh*). En *Drosophila*, se ha descrito que la GTPasa Rho1 y la miosina II no muscular interaccionan genéticamente en diversos procesos morfogénicos durante el desarrollo embrionario y larvario (Halsell et al., 2000). Con el objetivo de conocer la función de la miosina II no muscular en la morfogénesis de las uniones, quisimos estudiar su distribución en discos de pata prepupales.

Cultivamos *ex vivo* discos de pata de prepupas *zipper-GFP* (Película 2, ver Anexo). En estos discos, la secuencia codificante de la proteína fluorescente GFP se encuentra insertada en uno de los intrones del gen *zipper* (Fig. R-5). En las primeras fases de formación del pliegue podemos seguir la formación de unas

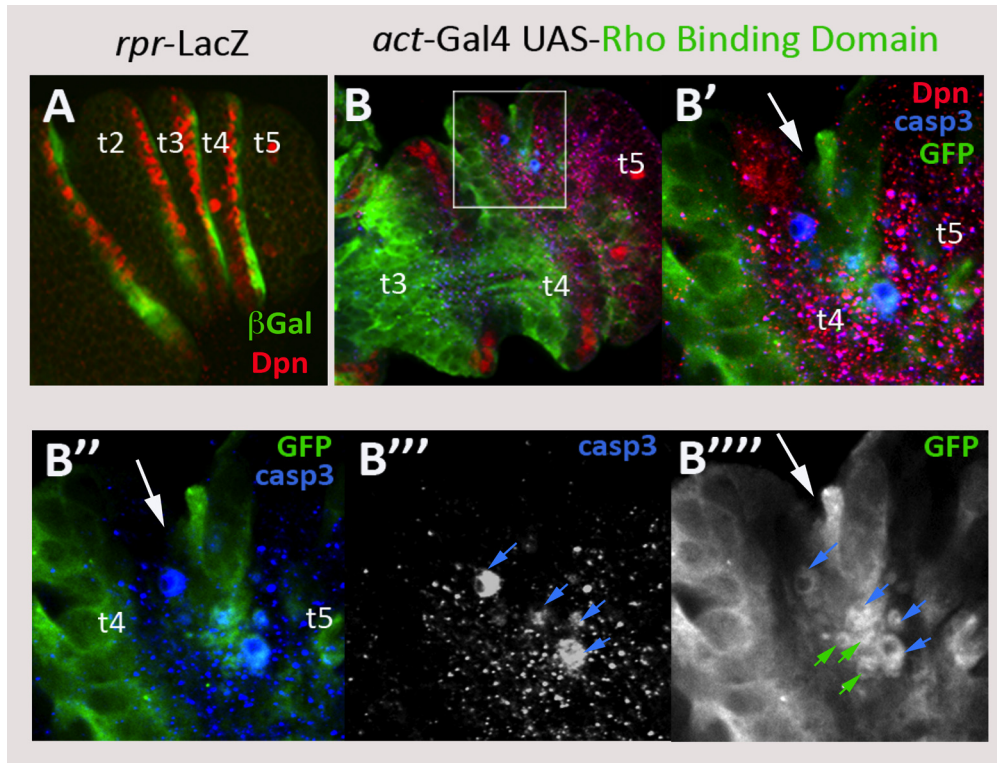


Figura R-4. Las células apoptóticas muestran expresión de proteína Rho1 activa. A: Dpn (rojo) coincide con el dominio de expresión de *rpr-LacZ* (verde) en las uniones tarsales (se indican los tarsos t2, t3, t4 y t5). B: Las células donde la proteína Rho1 está activa (en verde) son distales a las que expresan Dpn (en rojo). La zona indicada en B se amplía en B'-B'''. En los diferentes paneles la flecha indica el pliegue: aquí se detectan células apoptóticas (caspasa-3 activada, en azul en B, B', B'', en gris en B'''); los puntos de menor tamaño son inespecíficos, derivados de la detección con el anticuerpo para la caspasa-3 activada). Así, el pliegue se forma frente a las células marcadas con Dpn (rojo en B, B') donde la proteína Rho1 está activa, en el pliegue y en las células proximales del segmento adyacente (en verde en B, B' y B'', en gris en B'''). De todos los cuerpos apoptóticos con Rho1 activa, solo las de mayor tamaño aparente tienen niveles detectables de caspasa-3 (flechas azules en B'', comparar con fragmentos de menor tamaño, indicados por flechas verdes en B''').

acumulaciones locales de miosina II (Fig. R-5A, A'', B, B''). Estos acúmulos están asociados a fragmentos celulares de morfología redondeada, presumiblemente las células apoptóticas (Fig. R-5A, A', B, B', C, C', D, D'). Durante la invaginación del epitelio estos cuerpos celulares delaminan hacia la parte basal del epitelio, y se encuentran en todo momento asociados a las acumulaciones de *zipper-GFP* (Fig. R-5A, A'', B', B'', C, C', D, D'). Una vez el pliegue se ha formado correctamente, como puede observarse en la unión presuntiva entre los tarsos t3 y t4, los fragmentos ya no se observan y es evidente una acumulación fuerte de *zipper-GFP* II en las células más proximales del segmento adyacente (Fig. R-5A, A'', B, B'', C, C'', D, D'').

Para corroborar que estas acumulaciones de *zipper-GFP* eran fruto de la regulación intrínseca de la miosina II no muscular, quisimos monitorizar en tiempo real la distribución de sus cadenas reguladoras durante la formación de la futura articulación. Para ello cultivamos *ex vivo* discos de patas de prepupas *sqh-GFP* (Película 3, ver Anexo), donde confirmamos que los fragmentos celulares que se eliminan del epitelio durante la formación de la unión entre los tarsos t4 y t5 van asociados a acumulaciones localizadas de *sqh-GFP* (Fig. R-6A, A'', B, B''). Además, como observamos con *zipper-GFP*, se observan niveles elevados de *sqh-GFP* una vez el pliegue se ha formado entre las uniones de los tarsos t3 y t4 (Fig. R-6C, C'').

Sqh1P y Sqh2P tienen diferente localización durante la formación de las uniones

Las cadenas reguladoras de la miosina II pueden fosforilarse dando lugar así a dos posibles estados de la proteína activa, uno mono-fosforilado (Sqh1P) y otro di-fosforilado (Sqh2P) (Zhang y Ward, 2010). Se ha descrito para cada uno de ellos una localización subcelular diferente tanto en el disco de ala como en el

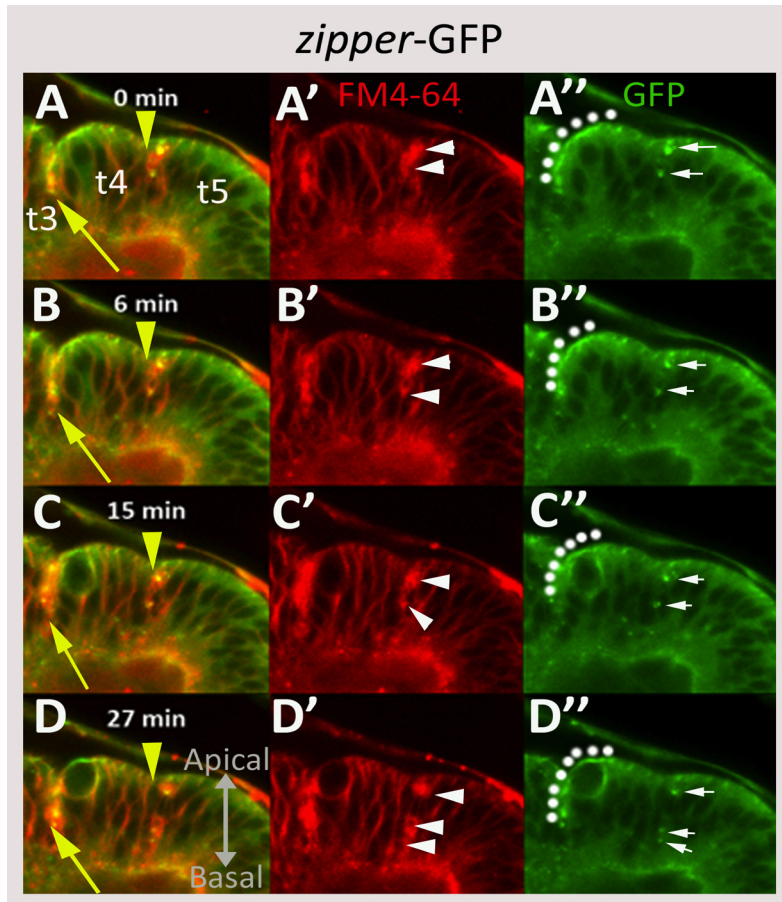


Figura R-5. *zipper*-GFP se acumula localmente en fragmentos celulares durante la formación del pliegue en disco prepupales. A-D: Fotografías tomadas de la Película 2, que muestra la formación del pliegue entre los tarsos t4 y t5 (punta de flecha amarilla). En verde se muestra la miosina II (*zipper*-GFP y en rojo el marcador de membrana FM464). Las flechas amarillas señalan el pliegue ya formado entre los tarsos t3 y t4. En A', B', C' y D' las puntas de flecha blancas señalan fragmentos celulares en la unión t4-t5, donde se está formando el pliegue. A'', B'', C'' y D'': Las acumulaciones de *zipper* asociadas a los fragmentos celulares están señaladas con flechas blancas, mientras que en el pliegue t3-t4 (delimitado con la línea de puntos) se detectan elevados niveles de *zipper*. Nótese que las acumulaciones de miosina II en la formación del pliegue coinciden con células con morfología alterada (detectada por la acumulación de la señal de FM464). Las imágenes de la película fueron tomadas cada 3 minutos.

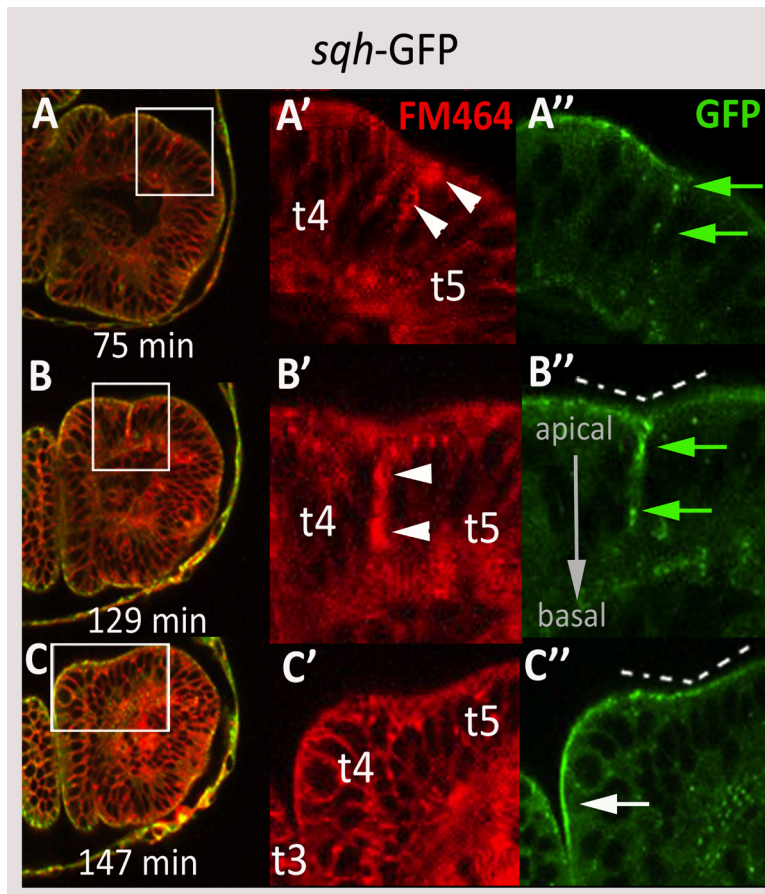


Figura R-6. *sqh*-GFP se acumula localmente en fragmentos celulares durante la formación del pliegue. Fotos tomadas de la Película 3. A-C: Formación del pliegue entre los futuros tarsos t4 y t5 (t4, t5 se indican en A', B', C'). Los recuadros en A, B, C señalan la zona ampliada en los paneles A' y A'', B' y B'', C' y C'', respectivamente. A', B', C' muestran en rojo la señal del marcador de membrana FM464. Las puntas de flecha en A' y B' señalan los fragmentos celulares. A'', B'': Los fragmentos celulares indicados en A' y B' van asociados a acumulaciones locales de *sqh*-GFP (flechas verdes en A'', B'') y delaminan hacia la parte basal (dirección señalada por la flecha gris en B''). En B-B'' se muestra *sqh*-GFP asociado a los fragmentos, y la línea discontinua indica la formación incipiente del pliegue. C-C'': los niveles de *sqh*-GFP son más fuertes en la unión ya formada entre los tarsos t3 y t4 (flecha blanca en C''); la línea discontinua señala el pliegue entre los tarsos t4 y t5). Las imágenes de la película fueron tomadas cada 3 minutos.

embrión de *Drosophila*. En el disco imaginal de ala Sqh1P se encuentra asociado a las uniones adherentes, mientras que Sqh2P se localiza en el dominio más apical de las células. La localización de Sqh1P en los pliegues del disco de ala, sugiere un posible papel iniciador de la contractilidad del tejido (Zhang y Ward, 2010).

Para poder discernir entre ambos estados de fosforilación de la miosina II durante la formación de las uniones, utilizamos de manera simultánea dos anticuerpos específicos para ambos estados de la proteína. Este experimento se realizó en prepupas *sqh*-GFP para confirmar, además, que la distribución de las dos formas fosforiladas coinciden con niveles altos de GFP.

Nuestros datos muestran que la proteína monofosforilada (Sqh1P) parece estar vinculada a la base de las células del epitelio imaginal, así como a múltiples estructuras punteadas dentro del tejido (Fig. R-7A,

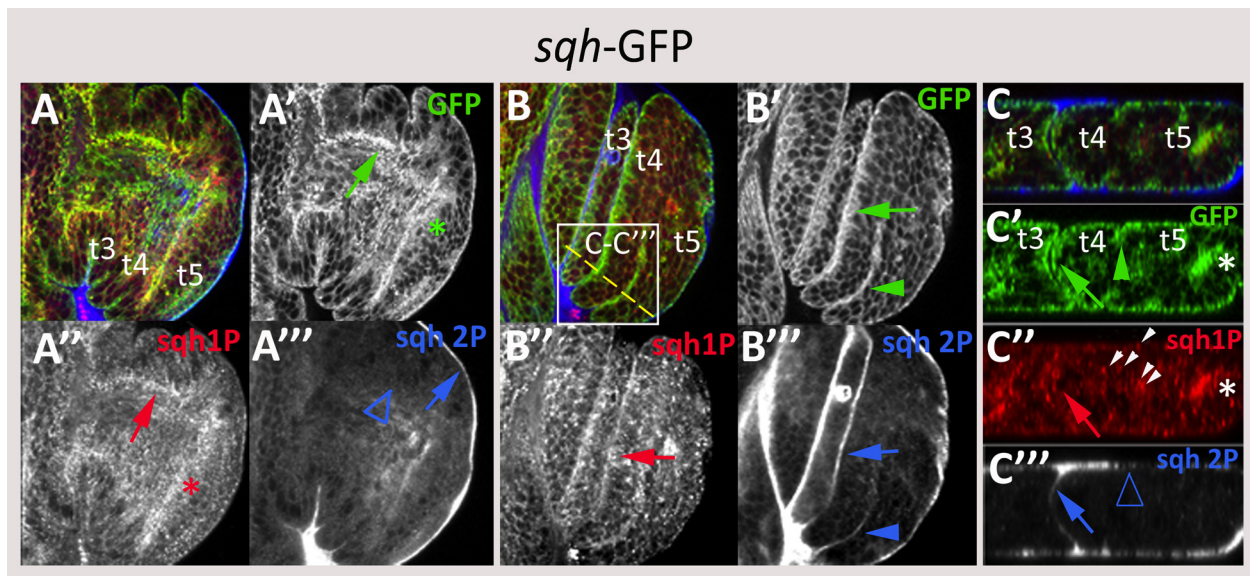


Figura R-7. Sqh1P y Sqh2P tienen diferentes distribuciones en las uniones presuntivas. A-A''': Corte apico-lateral de pata prepupal *sqh*-GFP. Se detecta Sqh1P en la base del epitelio de los tarsos (flecha en A'') mientras que Sqh2P se restringe al dominio apical del disco (flecha en A'''); la punta de flecha vacía indica su ausencia). Nótese que la acumulación de Sqh1P coincide con la de *sqh*-GFP (flecha en A'). **B-B'''**: Desde un plano más apical del disco se confirma que Sqh2P únicamente se acumula en los pliegues formados (la flecha en B''' señala el t3-t4 y la punta de flecha el t4-t5 incipiente), mientras que Sqh1P lo hace más discretamente (flecha en B''). La flecha verde en B' indica la acumulación de *sqh*-GFP en la unión t3-t4 y la cabeza de flecha en la unión t4-t5. **C-C'''**: Proyección en el eje Z de los planos tomados en las futuras uniones entre los segmentos t3 y t5 (recuadro indicado en B): *sqh*-GFP, Sqh1P y Sqh2P están indicados en verde, rojo y azul, respectivamente. Las flechas en C', C'' y C''' señalan la fuerte acumulación de GFP, Sqh1P y Sqh2P una vez el pliegue se ha formado entre los segmentos t3 y t4 (sin coincidir totalmente). En la fase inicial de la unión t4-t5 se detecta *sqh*-GFP (punta de flecha en C''), acumulaciones locales de Sqh1P (puntas de flecha) y ausencia de Sqh2P (flecha vacía en C''). Siempre se observan elevados niveles de *sqh*-GFP y Sqh1P en la base del epitelio de la región más distal del disco (indicado como * en A', A'', C', C''').

A''). En B, B'' se detecta Sqh1P levemente en los pliegues ya formados. La proteína difosforilada (Sqh2P) en cambio, está íntimamente asociada a la región más apical del epitelio, restringiéndose únicamente a las invaginaciones de las uniones presuntivas (Fig. R-7A, A'', B, B'''). Es importante resaltar que Sqh2P se localiza en los pliegues únicamente cuando se han formado, y no en fases anteriores de la constricción del tejido. Además, Sqh2P parece que también se encuentra en la membrana basal de las células de la membrana peripodial (flecha en Fig. R-7A'''), encargadas de cubrir el disco imaginal durante las fases larvares y que al inicio de la pupación serán eliminadas para permitir la evaginación del disco. Un estudio más detallado de este experimento fue realizado al hacer una sección en el eje Z de sucesivos planos de microscopía confocal (Fig. R-7C-C'''). Comprobamos que la proteína Sqh2P se encuentra en el pliegue ya formado entre los tarsos t3 y t4, asociado a acumulaciones locales de Sqh1P (Fig. R-7C, C'''). Sin embargo,

durante la morfogénesis del pliegue, únicamente se detectan acumulaciones locales de Sqh1P (Fig. R-7C, C'').

La acumulación de Sqh1P está asociada a las células apoptóticas

Hemos descrito que la vía de Rho1 se activa en los fragmentos celulares que han de ser eliminados y en las células más distales formadoras del pliegue (Fig. R-3 y R-4). Ya que la miosina II se acumula localmente tal y como hemos observado en discos cultivados de *zipper*-GFP y *sqh*-GFP, nos preguntamos si alguno de los dos estados fosforilados de la miosina II pudiese estar relacionado con el proceso de activación de la muerte.

Para ello, estudiamos la colocalización de Sqh1P y caspasa-3 activada en discos de prepupas *sqh*-GFP. Las acumulaciones locales de *sqh*-GFP que habíamos observado delaminando hacia la base del epitelio, efectivamente están asociadas a las células que han entrado en apoptosis. Confirmamos que en las células apoptóticas donde la vía de Rho1 está activa, como habíamos visto anteriormente (Fig. R-4), se acumula específicamente *sqh*-GFP y Sqh1P (Fig. R-8A, 8A', 8A'', 8A'''). Comprobamos estas observaciones en discos de pata de prepupas *act*-Gal4 UAS-RBD (Fig. R-8B, B'), donde las células con la GTPasa Rho1 activada están muriendo por apoptosis (caspasa-3 en rojo en la Fig. R-8B'). Estas células se dirigen hacia la parte basal del epitelio para ser finalmente eliminadas. A medida que avanzan en esta dirección (flecha gris vertical en Fig. R-8B') se detecta más fácilmente la presencia de Sqh1P (azul, en B'; detalle en gris a la derecha),

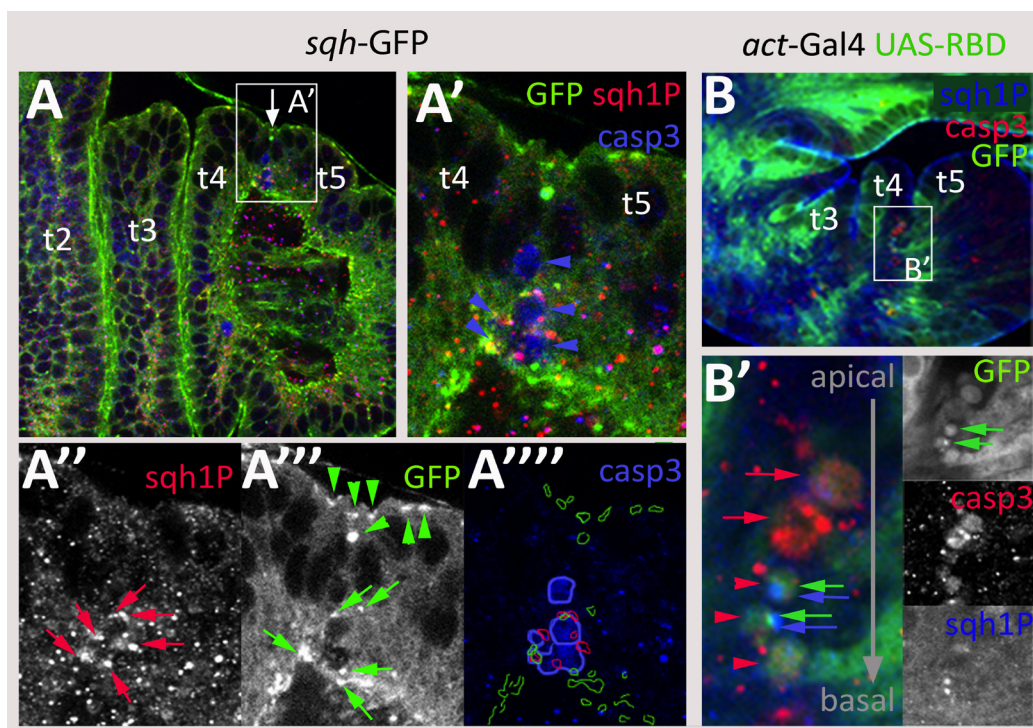


Figura R-8. Las células apoptóticas están asociadas a acumulaciones de Sqh1P. A-A''': Detección de células teñidas con anticuerpo anti-caspasa3 activada (azul) y anti-Sqh1P (rojo) en la unión presuntiva de los tarsos t4 y t5. *sqh*-GFP (en verde en A, A'; gris en A'') se detecta en la base del tejido y en los dominios apicolaterales de las células. El recuadro señalado en el panel A se muestra ampliado en A'-A'''. Las células apoptóticas (puntas de flecha azules en A' están asociadas a acumulaciones locales de Sqh1P (flechas rojas en A'') que colocalizan asimismo con acumulaciones de *sqh*-GFP (flechas verdes en A''). Las puntas de flecha en A''' señalan la miosina II apicolateral que no se asocia con las células apoptóticas. En el último panel se esquematizan las acumulaciones de Sqh1P (contorneado en rojo) y *sqh*-GFP (contorneado en verde) sobre la tinción de caspasa-3 activada (azul en A''') aunque se delinearán igualmente las células con caspasa-3 activada. **B, B'**: disco de pata de prepupa de genotipo *act*-Gal4 UAS-RBD. B' es una ampliación del panel señalado en B (unión entre t4 y t5). Las células con caspasa-3 activada (en rojo, señalado con flechas rojas) están en una posición más apical con respecto a los fragmentos celulares (puntas de flecha rojas). En estos fragmentos celulares se detecta la acumulación de Sqh1P (en azul, indicado por las flechas azules). Estas células tienen ligeramente mayores niveles de GFP (señaladas con flechas verdes).

sugiriendo que la acumulación de Sqh1P es posterior a la expresión de la caspasa-3.

La función de la GTPasa Rho1 es necesaria para formar las uniones entre los tarsos

Con el objetivo de conocer si las distintas expresiones descritas se necesitan para la correcta formación de las articulaciones, realizamos experimentos en los que reducimos la expresión de las distintas proteínas y observamos el efecto en las articulaciones del adulto. Para conocer la función en la formación de estas estructuras de Rho1, y puesto que la función de esta proteína es fundamental en una gran variedad de procesos del desarrollo de la mosca (revisado en Sawyer et al., 2009), usamos la técnica Gal4-Gal80^{TS} (McGuire et al., 2003) para eliminar su función a partir del estadio de prepupa (el mismo método se usó en distintos experimentos descritos mas abajo). Su ausencia en el dominio de expresión de *ap*-Gal4 (tarsos t4 y región proximal del tarso t5) lleva a una desaparición de la estructura de la unión tarsal así como a la desaparición de algunas cerdas (Fig. R-9B, comparar con el fenotipo silvestre en Fig. R-9A).

Para saber si Rho1 es suficiente para generar una articulación en el borde del dominio de expresión de *ap*-Gal4 expresamos, a partir del estadio de pupa, una forma de Rho1 constitutivamente activada (UAS-Rho^{V14}), descrita en Fanto et al., 2000. El 100% de los individuos habían perdido el tarso 4 y mostraban la desaparición completa de la articulación entre los tarsos t4 y t5 (Fig. R-9C).

Elevados niveles de RhoGEF2 impiden la formación de las articulaciones

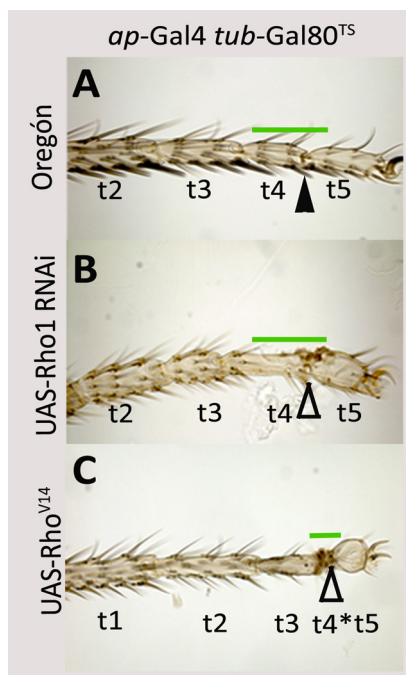


Figura R-9: Rho1 es necesaria para formar las articulaciones tarsales. **A:** Pata de un individuo silvestre de la cepa Oregon-R. La punta de flecha señala la articulación entre los tarsos t4 y t5. La línea verde delimita el dominio de expresión de la línea Gal4 que se utiliza en los paneles B y C. **B:** La eliminación de Rho1 en individuos *ap*-Gal4/UAS-Rho1 RNAi; *tub*-Gal80^{TS} impide la formación de la unión (punta de flecha vacía) y promueve la desaparición de algunas cerdas. **C:** La expresión de una forma constitutivamente activa de Rho1 en moscas *ap*-Gal4/UAS-Rho^{V14}; *tub*-Gal80^{TS} promueve la eliminación del tarso t4 (indicado como *) así como la articulación que debía de formarse entre los tarsos t4 y t5 (su ausencia se indica con la punta de flecha vacía).

Como hemos observado, Rho1 es necesario para la formación de las uniones entre los tarsos. Para saber si esta función está relacionada con su factor activador RhoGEF2 realizamos dos aproximaciones experimentales.

En primer lugar, para estudiar la falta de función de RhoGEF2, realizamos clones de falta de función de RhoGEF2 (ver Material y Métodos) en el disco de pata, ya que las moscas mutantes para este gen mueren tras la embriogénesis y no existen construcciones UAS-RNAi que eliminen su función. Desgraciadamente, la viabilidad de estos clones era reducida y no pudimos llegar a ninguna conclusión. En otra aproximación sobreexpresamos RhoGEF2 en diferentes regiones del disco imaginal de pata a partir del estadio de larva 3. En la Fig. R-10 se muestran las patas representativas de los fenotipos adultos en el dominio de *ap* (Fig. R-10B) y *rn* (Fig. R-10C), observándose que en ambos casos se interfiere con la formación de las uniones. Los

datos sugieren, pues, que la desregulación de su distribución en el individuo silvestre es capaz de interferir la formación de las uniones en el 100% de los individuos observados de ambos genotipos, pese a que no hemos podido determinar el efecto de su falta de función (Fig. R-10). Se han publicado datos mostrando que la sobreexpresión de un inhibidor de Rho1, RhoGAP68A, era capaz de inhibir la constricción apical de las uniones presuntivas (Greenberg y Hatini, 2010): este dato, y los obtenidos en este trabajo, indican que la modificación en la distribución de elementos reguladores de la GTPasa Rho1 resulta en la pérdida las articulaciones.

La fosforilación de la cadena reguladora de la miosina II no muscular es necesaria para la morfogénesis de las articulaciones tarsales

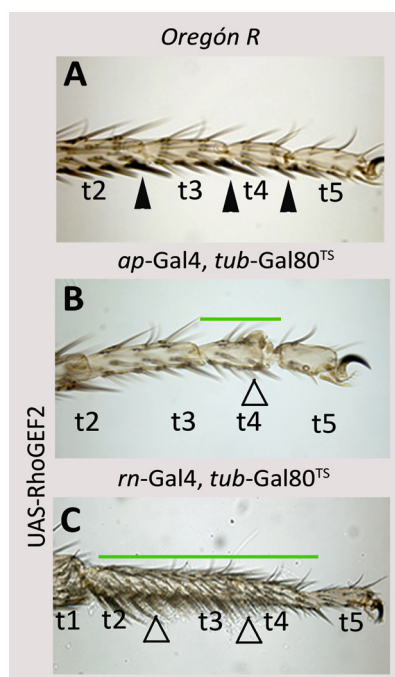


Figura R-10. Elevados niveles de RhoGEF2 son suficientes para interrumpir la formación de las uniones tarsales. A: Pata de un individuo silvestre de la cepa Oregón-R. Las puntas de flecha señalan las articulaciones entre los tarsos. B: La expresión en el dominio *ap-Gal4* (delimitado por la barra verde) de RhoGEF2 en moscas *ap-Gal4/UAS-RhoGEF2; tub-Gal80^{TS}* produce malformaciones en la articulación entre los tarsos t4 y t5 (la ausencia de unión silvestre está indicada por la punta de flecha vacía). C: La expresión de UAS-RhoGEF2 en el dominio *rn* (delimitado por la barra verde) en moscas *UAS-RhoGEF2/ tub-Gal80^{TS}; rn-Gal4/+* promueve la eliminación de las articulaciones entre los tarsos 1 y 4 (puntas de flecha vacías; comparar con el fenotipo silvestre en A).

Para confirmar la función de los genes que codifican las proteínas de la miosina II no muscular en el proceso de morfogénesis de las articulaciones, analizamos la falta de función de diversos componentes de la misma en este proceso. Expresamos una forma dominante negativa del gen que codifica la cadena pesada de la miosina II (*zip*) a partir de larva 3 tardía, con las líneas *ap-Gal4* y *rn-Gal4*, y observamos que la falta de niveles adecuados de *zip* afecta a la formación de las uniones tarsales así como a la formación de quetas (Fig. R-11B y G, comparar con A y F, respectivamente). En los primeros individuos, la unión tipo “ball and socket” desaparece en todos los casos (Fig. R-11B) mientras que en los segundos (Fig. R-11G), la falta de uniones fue observada siempre en las uniones entre los t1-t2 y t2-t3, mientras que las uniones entre los tarsos t3 y t4 permanecían (estas diferencias se corresponden con los diferentes niveles de expresión de GFP en moscas *rn-Gal4 UAS-GFP*; datos no mostrados). Inactivamos la función del gen *sqh* de forma similar y vimos que la reducción en la expresión de este gen afecta a la formación de las articulaciones levemente (Fig. R-11C, H, comparar con el fenotipo silvestre en A y F, respectivamente). Cuando la construcción *sqh*-RNAi se dirige con la línea *rn-Gal4*, la falta de uniones fue observada en un 67% de las patas analizadas (n=24), estando más afectadas de nuevo las uniones entre los tarsos t1 y t2 que las uniones entre los tarsos t3 y t4. El fenotipo obtenido con la línea *ap-Gal4* no aumentaba si se expresaba *Dicer-2*, un gen que codifica para una proteína requerida en el mecanismo de formación de RNA interferente (datos no mostrados)(Dietzl et al., 2007).

La quinasa Rho (ROK) se encarga de activar por fosforilación a las cadenas reguladoras de la miosina II no muscular en diversos procesos del desarrollo (ver Introducción). Si se reducen los niveles de expresión de *ROK* en los discos de pata se obtienen fenotipos similares a los observados cuando baja la expresión de

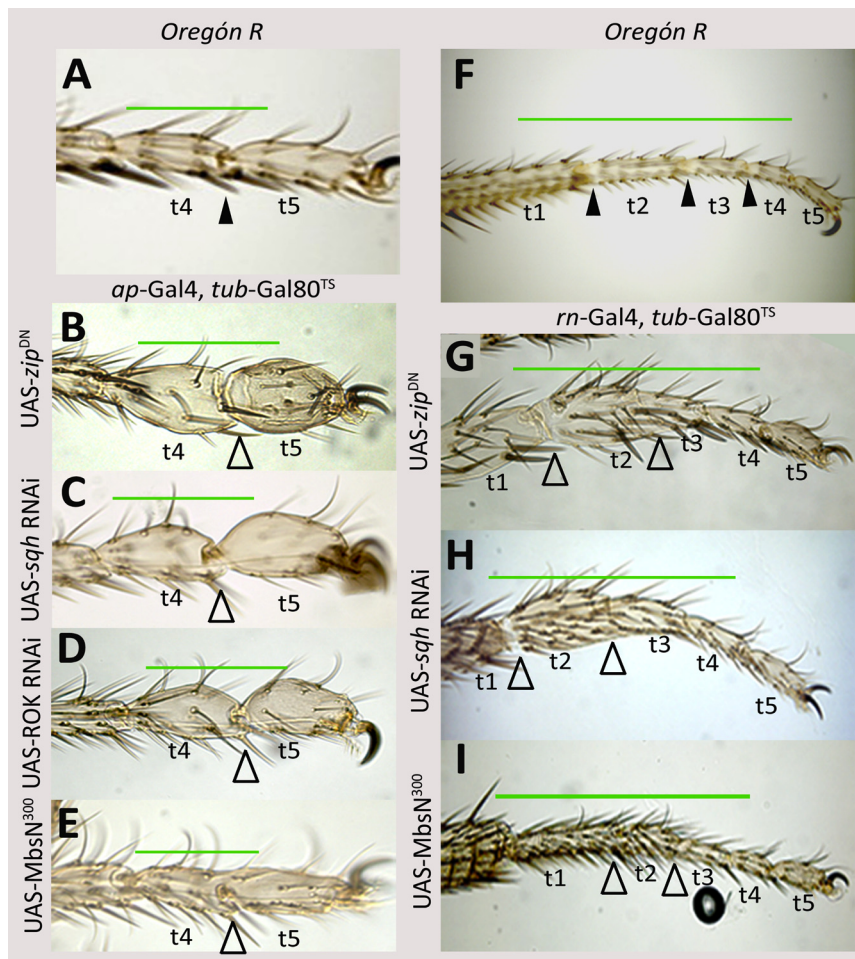


Figura R-11. La actividad de la miosina II se requiere para formar las uniones de los tarsos. **A:** Individuo silvestre de la cepa Oregon-R, mostrando la articulación entre los tarsos t4 y t5 (punta de flecha). La barra verde señala el dominio de expresión de la línea *ap-Gal4* que se utiliza en los paneles B-E. **B:** una forma dominante negativa de *zipper* (B) bloquea la formación de las uniones en individuos *ap-Gal4/+; tubGal80^{TS}/UAS-zip^{DN}*. **C, D y E:** la eliminación por RNAi de la función de *sqh* (*ap-Gal4/+; tubGal80^{TS}/UAS-sqh RNAi* en C), o de la de la proteína *ROK* (*ap-Gal4/+; tubGal80^{TS}/UAS-ROK RNAi* en D), así como la sobreexpresión de la subunidad MbsN300 (*ap-Gal4/+; tubGal80^{TS}/UAS-MbsN300* en E) alteran sustancialmente la morfogénesis de la unión t4-t5 cuando se expresan en el dominio *ap*; nótese también la forma hinchada de los segmentos tarsales en B, C y D. Las puntas de flecha vacías indican ausencia de articulación o articulación anormal en cada caso. **F:** Individuo silvestre de la cepa Oregon-R, mostrando las articulaciones entre los tarsos t1 y t4 (puntas de flecha). La barra verde señala el dominio de expresión de la línea *rn-Gal4* que se utiliza en los paneles G-I. **G:** la expresión de *UAS-zipper^{DN}* (*tubGal80^{TS}/+; rn-Gal4/ UAS-zip^{DN}* en G) bloquea la formación de las uniones entre los tarsos t1-t2 y t2-t3 (puntas de flecha vacías). **H, I:** la eliminación por RNAi de la función de *sqh* (*tubGal80^{TS}/+; rn-Gal4/ sqh RNAi* en H) y la sobreexpresión de MbsN300 (*tubGal80^{TS}/+; rn-Gal4/ UAS-MbsN300* en I) bloquean con mayor probabilidad la morfogénesis de la unión entre los tarsos t1-t2 y t2-t3 (puntas de flecha vacías).

sqh, formándose una unión anormal (Fig. R-11D). En otro experimento destinado a elucidar el papel de proteínas que intervienen en la fosforilación de la miosina, incrementamos los niveles de una subunidad de la fosfatasa MLCP (del inglés “Miosin Light Chain Phosphatase”). Dicha fosfatasa impide la fosforilación de las cadenas reguladoras de la miosina, y por tanto su activación. La fosfatasa es funcional cuando forma un heterotrímero compuesto con la proteína MBS (del inglés, “myosin binding subunit”) y otra proteína desconocida de 20 kDa (Lee y Treisman, 2004). La expresión de *UAS-MbsN300* (MbsN300 se refiere a los primeros 30 aminoácidos de la proteína MBS clonados tras las secuencias UAS) en los dominios de *ap* y *rn* evita que las articulaciones se formen correctamente. Para los experimentos realizados con la línea *ap-Gal4* la desaparición de las articulaciones se observó en un 50% de los casos (n=6), mientras que para los

datos obtenidos con *rn-Gal4* el fenotipo era variable en las uniones de los tarsos t1-t2 y t3-t4 (Fig. R-11E e I, respectivamente, n=5).

La GTPasa Rho1 y la correcta activación de la miosina II son necesarias para la formación del pliegue en las uniones presuntivas

La disminución de la expresión o función de Rho1 no sólo afectan a la formación de las uniones en el adulto, sino igualmente a la formación de los pliegues que separan los segmentos tarsales en prepupa. En discos en los que se reduce la expresión de Rho1 a partir del tercer estadio larvario tardío en el dominio de *ap*, el pliegue no se forma en ninguno de los casos analizados (n=8) (Fig. R-12B, B', comparar con el fenotipo silvestre en A, A'). La falta de función de *zipper* en la región de *ap* produce igualmente la desaparición del pliegue en el 64% de los casos analizados (n=17) (Fig. R-12C, C'). En el 11% de estos discos se observa la aparición de un pliegue ectópico en el extremo mas distal del dominio *ap-Gal4*. Similarmente, la reducción de niveles de *sqh* o ROK en prepupas de genotipos (Fig. R-12D, D') o (Fig. R-12E, E') provocan la ausencia del pliegue en el 86% (n=14) o 100% de los casos (n=24), respectivamente. Como se observa en la Fig. R-12E y E', además de la desaparición del pliegue entre los tarsos t4 y t5, la reducción de niveles de la quinasa ROK produce, en un 29% de los casos, una indentación "ectópica" en el epitelio asociada al borde del dominio *ap-Gal4*. De forma similar, la expresión de UAS-MbsN300 en *ap* hace desaparecer la indentación de la futura unión en el 100% de los casos, y se forma un pliegue ectópico en el borde distal del dominio *ap-Gal4* en un 11% de los casos (n=17) (Fig. R-12F, F').

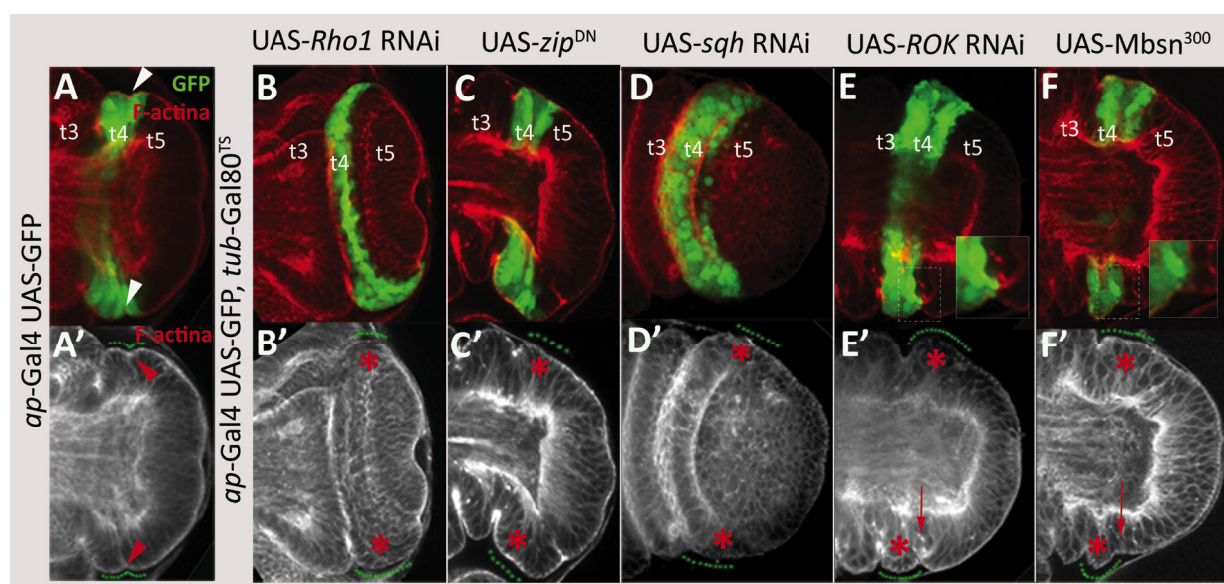


Figura R-12. Rho1 y elementos activadores de la miosina II son necesarios para la morfogénesis de los pliegue tarsales. **A, A'**: Detección de GFP (verde) y F-actina (rojo) en el disco de pata de prepupas *ap-Gal4 UAS-GFP*. Las puntas de flecha indican el pliegue entre los futuros tarsos t4 y t5. En A las puntas de flecha señalan la constricción apical, delineada por la línea de puntos). **B, B', C, C', D, D'**: La falta de función de Rho1 (*ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Rho1 RNAi; tub-Gal80^{TS}* en B, B'), de *zip* (*ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-zip^{DN}; tub-Gal80^{TS} /+* en C, C') y de *sqh* (*ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{TS}/UAS-sqhRNAi* en D, D') elimina la constricción apical de las células (marcado con *), resultando en la ausencia de pliegue en el epitelio (línea de puntos). **D, D'**: La falta de función de ROK (*ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{TS}/UAS-ROK RNAi*), elimina la constricción apical de las células (*), produciendo la ausencia de pliegue en el epitelio (línea de puntos). **E, E'**: La sobreexpresión de MbsN300 (*ap-Gal4 UAS-MbsN300*) produce el mismo fenotipo. En los contextos *ROK-RNAi* y *UAS-MbsN300*, aparece además una indentación ectópica (ampliación de estas regiones indicadas en E y F, señalado por flechas en E' y F') en el borde distal del dominio de *ap-Gal4* como se observa con el marcaje de F-actina (E' y F').

2. RELACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS Y LA GTP-ASA RHO1 DURANTE LA FORMACIÓN DE LAS UNIONES TARSALES

En el apartado anterior describimos que la disminución de la función de elementos necesarios para la correcta activación de Rho1 o de la miosina II no muscular afectan tanto a la formación de los pliegues intertarsales del disco como a la morfogénesis de las articulaciones en el adulto. Hemos observado que la vía de Rho1 se activa en dos tipos de células durante la formación de las uniones: en las células de la articulación que serán eliminadas por apoptosis y en las células más distales formadoras del pliegue, abarcando una franja de células proximales del tarso distal adyacente. En este capítulo de resultados describiremos la relación funcional entre la apoptosis y la activación de Rho1 para la regulación de la miosina II en las uniones de los tarsos.

Se sabe que para la ejecución de la muerte celular programada, la activación de la caspasa-3 es necesaria y suficiente para actuar sobre los sustratos celulares y así generar correctamente los cuerpos apoptóticos (*blebbing*) (revisado en Suzanne y Steller, 2009; Wickman et al., 2012). Teniendo en cuenta que durante la formación de las uniones se requiere apoptosis (Manjón et al., 2007), nos preguntamos sobre el papel de la vía de Rho1 y la miosina II en relación con la activación de la apoptosis en este proceso.

La falta de función de Rho1 o de la miosina II modifican la activación del programa apoptótico

La disminución de la actividad de la GTPasa Rho1 afecta a la formación de los pliegues intertarsales (Fig. R-12). Queríamos saber si este fenotipo se debe únicamente a la falta de contractilidad característica de la ausencia de miosina II o si existía una relación con la activación del programa apoptótico. Para ello, redujimos la actividad de la miosina y estudiamos la distribución de células apoptóticas. En los distintos experimentos usamos la misma línea (*ap-Gal4*) y el sistema Gal4/Gal80^{TS} inactivando los genes desde larva III tardía. La falta de función de los elementos de la cascada Rho1 en el dominio *ap* provoca un cambio en la distribución de las células con caspasa-3 activada, observándose tres variedades: dentro del dominio *ap*, ectópica en el borde distal del dominio y en ambas zonas (Fig. R-13B-F, comparar con A) (los % de los discos con estos fenotipos están resumidos en la gráfica Fig. R-13G).

La frecuencia de cada una de estas tres distribuciones de células que expresan caspasa-3 activada varía según el genotipo. En discos en los que se inactiva *Rho1* siempre se detectan células con señal apoptótica dentro del dominio Gal4, mientras que al expresar MbsN300, en cambio, es muy frecuente encontrar células expresando caspasa-3 activada en el borde del dominio (82% de los casos, n=11). Al inactivar *ROK*, *sqh* o *zip* se obtienen valores intermedios entre estos dos extremos. Una relación completa y detallada de los genotipos y los porcentajes de cada tipo de células se detalla en la Fig. R-13G y se explica en el pie de Figura. Nótese además que la reducción de la expresión de *Rho1* causa una disminución severa del tamaño del dominio de expresión de la proteína Gal-4, mientras que en los demás contextos genéticos, el dominio Gal-4 no disminuye aparentemente de tamaño (comparar Fig. R-13B-F con el fenotipo silvestre, Fig. R-13 A).

Para describir mejor el comportamiento de las células apoptóticas en un contexto mutante, cultivamos *ex vivo* discos de prepupas *ap-Gal4 UAS-MbsN300* (Fig. R-13H-H'', I-I'') que habían crecido en medio de cultivo suplementado con Naranja de Acridina (que indica la muerte celular, ver Material y métodos). En esta película (Película 4, ver Anexo) observamos que dentro del dominio donde debería de formarse el pliegue entre los tarsos t3 y t4, se detectaron más células apoptóticas marcadas en verde por Naranja de Acridina, que en discos de pata silvestres (Fig. R-13 H y H'', comparar con el caso silvestre en Fig. R-13A, A''). Estas células no son capaces de ser eliminadas del epitelio (imágenes tomadas en t=0min en la Fig. R-13 I-I'' y t=16 min en la Fig. R-13 J-J''; comparar con el disco silvestre en Fig. R-13 H, H').

Concluimos con estos datos que la inactivación de elementos de la vía que conducen a la función de la miosina II produce una alteración variable en la distribución de células apoptóticas respecto al fenotipo silvestre, sugiriendo que esta modificación en el epitelio intertarsal puede cambiar dicha distribución llegando a incidir en las señales de muerte. Sugerimos que Rho1 y la maquinaria encargada de activar

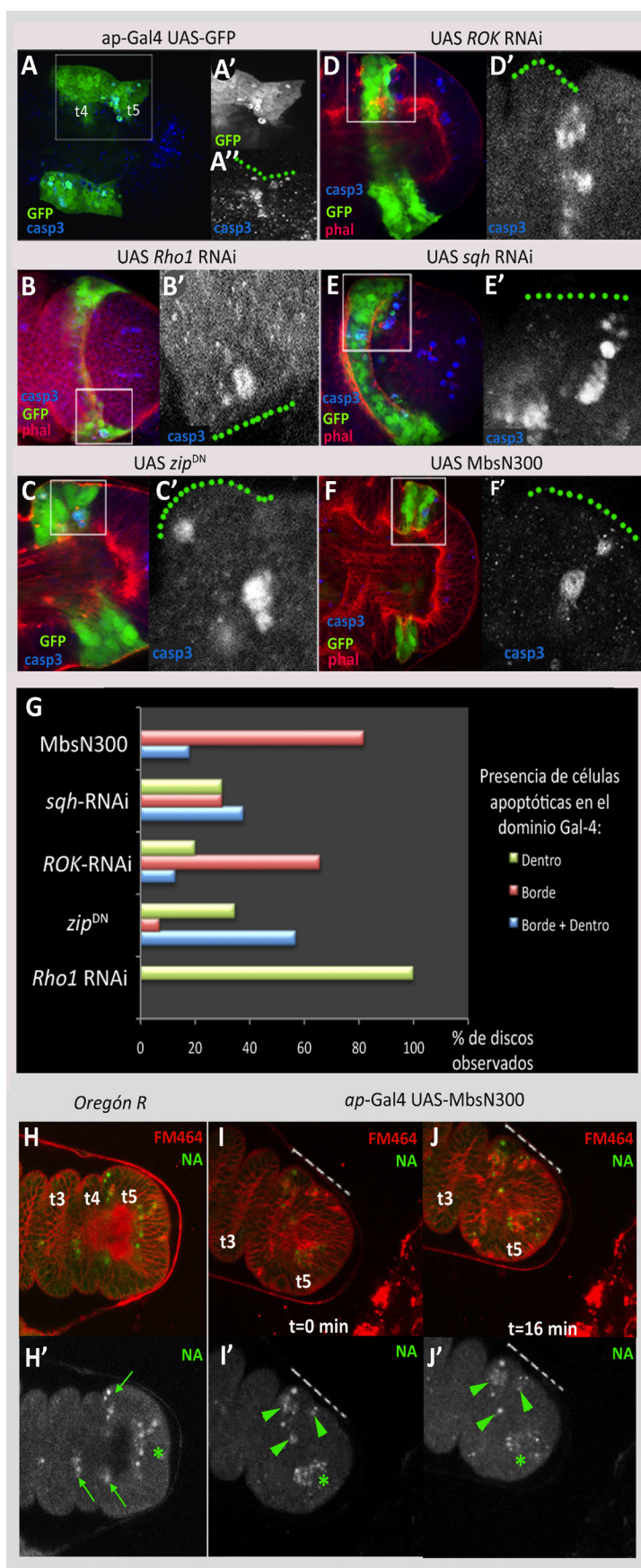


Figura R-13. Efecto de la falta de función de Rho1 y de la miosina II no muscular en la activación de la apoptosis de las articulaciones tarsales.

A: presencia de células apoptóticas (caspasa-3 activada en azul en A y en gris en A'') dentro del dominio de *ap-Gal4 UAS-GFP* (GFP en verde en A, en gris en A'). En todos los paneles, la línea de puntos verde marca el dominio Gal4 y la F-actina (rojo) marca la morfología celular. **B, B', C, C':** La falta de función de *Rho1* (B: *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-Rho1 RNAi; tub-Gal80^{TS}*) y de *zip* (C: discos *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{TS}/UAS-*zip*^{DN}*) produce muerte dentro del dominio Gal4 (caspasa-3 activada, en azul en B y C, en gris en B' y C', regiones ampliadas de B y C). La falta de función de *zipper* produce células apoptóticas dentro del dominio Gal-4 en un 35% de los discos (n=18), frente a un 57% de los casos en que las células apoptóticas se localizan en el borde del dominio *ap* (C, C'). **D, D', E, E', F, F':** D', E' y F' son un aumento de la zona marcada en D, E y F respectivamente. La apoptosis (gris en D', E' y F', azul en D, E y F) se detectó en el borde del dominio Gal4 (GFP en D, E y F, línea de puntos en D', E', F') al disminuir niveles de *ROK* en un 66% de los casos (n=15), frente a un 13% de los discos en los que se observó la muerte tanto dentro como en el borde del dominio Gal4 (D: Gal4 UAS-GFP/+; *tub-Gal80^{TS}/UAS-ROK RNAi*). Cuando se disminuyen los niveles de *sqh* (E: *ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{TS}/UAS-*sqh* RNAi*), la muerte (caspasa-3 activada en gris en E', azul en E) se detecta tanto en el borde como dentro del dominio Gal4 en un 38% de los casos (n=13), frente al 30% de los casos donde se detecta únicamente en el borde. La diferencia mas evidente se obtiene al aumentar la actividad de la subunidad MbsN300, que produce muerte en el borde del dominio de *ap* en un 82% de los discos (n=11) frente a un 18% de discos con células apoptóticas tanto dentro del dominio como en el borde (F: *ap-Gal4 UAS-MbsN300*). **G:** resumen de los % de discos mostrando los 3 posibles fenotipos de activación de muerte con respecto al dominio Gal4. **H-H'':** disco de pata silvestre donde la muerte celular se detecta entre los tarsos (Naranja de Acridina, NA, en verde en H, en gris en H' señalado por flechas). FM464 (en rojo en H) marca los contornos celulares. **I-I'', J-J'':** Imágenes de la película 4 del disco de pata *ap-Gal4 UAS-MbsN300*, tomadas en los tiempos t=0min (I-I') y t=16 min (J-J'). En este experimento no podemos usar GFP para marcar la región Gal4, ya que la NA se detecta en este color; el marcador de membranas FM464 (rojo en I, I', J, J') indica la morfología celular y por tanto la región donde el pliegue no se forma entre los tarsos t4 y t5 (indicado por la línea discontinua en I' y J'). La NA permite ver la mayor presencia de células apoptóticas en el dominio *ap-Gal4* (verde en I, J, gris en I', J', señalado por las puntas de flecha) en comparación con el individuo silvestre (en H y H'). * indica en H, H', I, I', J, J' las células apoptóticas características del tarso t5.

la miosina son necesarias para la correcta activación de la muerte celular en las uniones presuntivas, dificultando así la formación del pliegue y la articulación en la región intertarsal.

La inhibición de la apoptosis producida al expresar la proteína P35 aumenta la actividad de Rho1 y de la miosina II no muscular

Hemos descrito el posible papel sobre la apoptosis de cambios en la ruta que conduce a la activación de *sqh*. Nos preguntamos ahora si puede ocurrir el fenómeno opuesto, que la apoptosis influya en la activación de elementos de esta ruta. Para responder a esta pregunta, decidimos impedir la muerte y observar la expresión y actividad de *sqh*.

La expresión de la proteína de baculovirus P35 previene la muerte (Hay et al., 1994) e impide la correcta

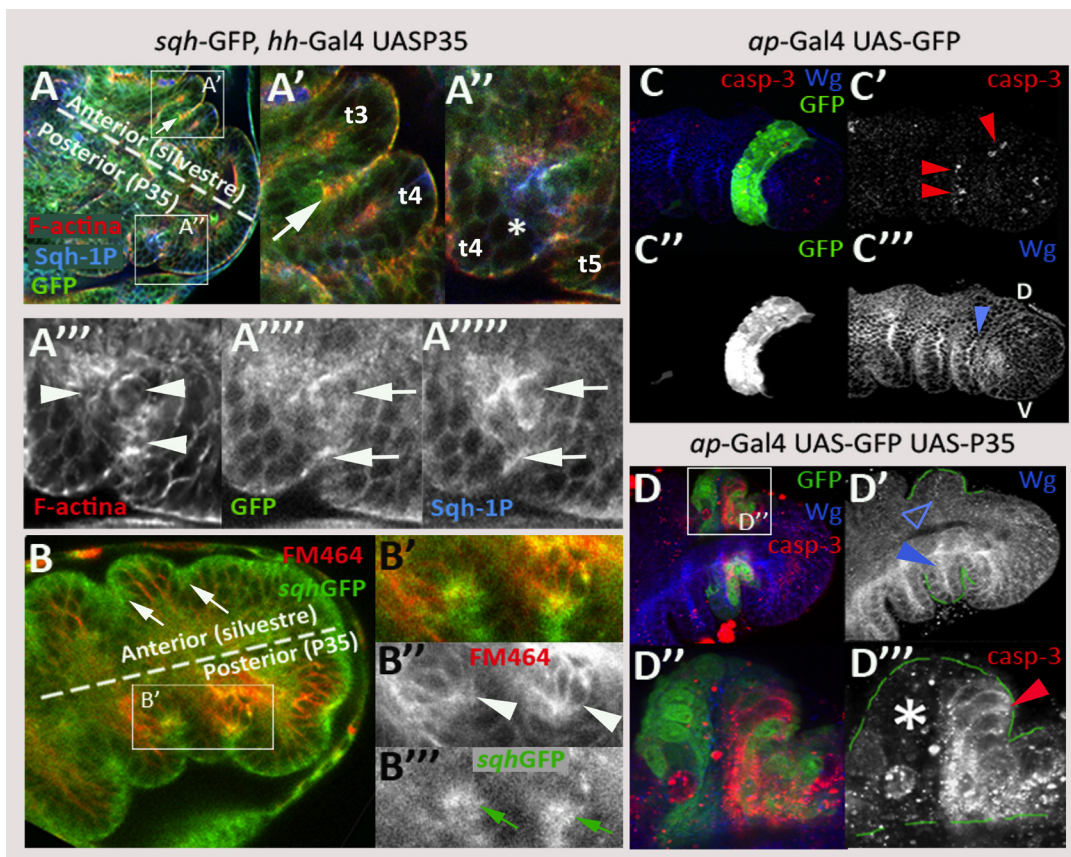


Figura R-14. La inhibición de la apoptosis al expresar la proteína P35 produce un aumento local de la proteína Sqh1P. A-B''': Discos de pata de prepupas *sqh-GFP; hh-Gal4/ UAS P35*. **A:** La presencia de P35 en el compartimento posterior de estos discos produce grupos de células de morfología irregular (* en A''; marcaje de F-actina, en rojo en A, A''; en gris en A''' señaladas por puntas de flecha) en las futuras uniones (A' y A'' son ampliaciones de los recuadros en A), en comparación con las uniones silvestres (ampliado en A y A', la flecha indica una de las uniones silvestres del compartimento anterior). Las células que expresan P35 presentan en su citoplasma mayores niveles de la proteína Sqh1P (azul en A, A'', flechas en el panel gris en A''''), al igual que de *sqh-GFP* (verde en A, A'', flechas en el panel gris en A'''''). **B:** Imagen de la Película 5; el cultivo de discos *sqh-GFP; hh-Gal4/ UAS P35 ex vivo* permite observar los grupos de células de la unión que expresan P35 (las uniones dentro del recuadro de B se amplían en B'-B'''); FM464 (en rojo en B y B', en gris en B'') marca los contornos celulares alterados de las células que no se eliminan del tejido (puntas de flecha en B'') y que acumulan miosina II (*sqh-GFP* en verde en B, B', en gris, indicado por flechas verdes en B'''), en contraste con las uniones silvestres del compartimento anterior (flechas en B). **C-C''':** Detección de caspasa-3 activada (rojo en C, gris en C' señalado por puntas de flecha rojas) y Wg (azul en C, gris en C''' señalado por punta de flecha en azul; D, dorsal; V, ventral) en discos de pata prepupales *ap-Gal4 UAS-GFP* (GFP en verde en C, en gris en C''). **D-D''':** La expresión de P35 en discos *ap-Gal4 UAS-GFP UAS-P35* produce aumento de expresión de caspasa-3 activada en las células distales del tarso (* en D'''), gris en D''', señalado por la punta de flecha roja), y no lo hace en las células proximales del tarso (* en D'''). Wg se expresa en la región ventral del disco (punta de flecha en D'), y no se detecta Wg ectópico en las células dorsales que expresan P35 (punta de flecha vacía en D').

formación de pliegues en los tarsos prepupales y de articulaciones en el adulto (Manjón et al., 2007). La expresión de P35 en el compartimento posterior de los tarsos genera en la región de las futuras uniones grupos de células con morfología alterada que no se eliminan del tejido. La F-actina permite ver que estas células son más redondeadas que las presentes en la región silvestre (Fig. R-14A''' comparar con las uniones silvestres en A', señalada con una flecha en A y A'). En los casos más severos las células muestran acumulaciones de miosina II (*sqh*-GFP, indicado en verde en Fig R-14A, A'', en blanco en A''', comparar con uniones silvestres en el compartimento anterior en A y A'). Como describimos en el anterior apartado, la miosina se activa al ser fosforilada (Tan et al., 1992), pudiendo estar mono o di-fosforilada (Zhang y Ward, 2010). En el caso de las células que expresan la proteína P35 y localizadas en las futuras uniones, detectamos que *Sqh* se acumula (*sqh*-GFP en verde en Fig. R-14A''''') y está específicamente fosforilada en su estado *Sqh*1P (azul en Fig. R-14A, A'', y gris en A''''').

Resultados similares se obtuvieron tras cultivar *ex vivo* discos donde P35 se expresa en el compartimento posterior del disco (Película 5, ver Anexo), observándose igualmente una acumulación de *sqh*-GFP en las células que formarían las uniones (Fig. R-14B-B'''). La expresión de P35 hace que estas células no puedan ser eliminadas del epitelio (de manera que en la película no se observaban cambios ni movimientos celulares). Por tanto, estos resultados sugieren que la proteína P35 evita la eliminación de las células apoptóticas en las uniones y provoca un aumento local de la presencia de *sqh*-GFP y *Sqh*1P.

Se ha descrito que la expresión de la proteína P35 en células de discos imaginales que van a morir (por ejemplo por haber sufrido irradiación), causa la formación de células "no muertas" ("undead") que emiten los morfógenos *Wg* y *Dpp* (Pérez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004; revisado en Martín et al., 2009 y Fuchs y Steller, 2011). Esto se debe a que la proteína P35 impide el paso final de la apoptosis (la actividad de la caspasa efectora *Drice*) pero no los anteriores (como la actividad de los genes proapoptóticos o de la caspasa iniciadora *Dronc*, por ejemplo), responsables de la activación de *Drice*. Para comprobar si este fenómeno se producía igualmente en las células que estudiamos, expresamos P35 en el dominio de *ap*, donde se encuentran las células que van a morir, y teñimos los discos con un anticuerpo específico para la proteína *Wingless* (*Wg*). Durante el desarrollo del disco de pata, el morfógeno *Wg* es necesario para dar identidad ventral y para la formación de la parte distal de la pata (Brook y Cohen, 1996; Jiang y Struhl, 1996; Díaz-Benjumea et al., 1994), y se localiza en la región ventral del disco (ver Introducción). En discos de pata donde expresamos P35 en el dominio de *ap*, observamos que la presencia de *Wg* en la región ventral (V; comparar con su ausencia en D, dorsal) no cambia con respecto al individuo silvestre (en azul en Fig. R-14 C, C''') ya que no hay *Wg* ectópico (Fig. R-14D, D') en el dominio *ap*, pese a los elevados niveles de caspasa-3 activada (Fig. R-14D, D'', D'''). En el disco de ala, se sabe que las células en las que se expresa P35 acumulan a la caspasa-3 "secuestrada" en su citoplasma (Hay et al., 1994), de manera que es aún detectable por su anticuerpo específico. En el disco de pata, las células "no muertas" que reciben el estímulo apoptótico se encuentran exclusivamente en la región más distal del tarso, lo cual explica que la caspasa-3 se detecte únicamente en esta zona (rojo en Fig. R-14D, D'', D''') y no en las células proximales del tarso (indicadas con *). Es decir, en las futuras uniones tarsales, la presencia de P35 evita la eliminación de las células, produce un acúmulo de *Sqh*1P y de caspasa-3 activada pero no activa *wg*.

Para conocer si cambios en la actividad de la GTPasa *Rho1* se correlacionan con la mayor presencia de miosina II cuando se impide la muerte con P35 en las células que forman la unión, analizamos el estado de activación de *Rho1* en prepupas *ap*-Gal4/UAS-P35; UAS-RBD/+ en comparación con las de genotipo control *ap*-Gal4/+; UAS-RBD/+. En ausencia de P35 detectamos mayores niveles de GFP en la zona distal del tarso t4 y en las células que sufren apoptosis, así como en una franja de células situadas en la parte más proximal del tarso t5 (Fig. R-15A, A' y A'''). Este patrón es coherente con respecto a lo observado en prepupas *act*-Gal4 UAS-RBD (Fig. R-3, R-4 y R-8). Cuando inhibimos la ejecución de la muerte expresando P35 en el dominio de *ap* junto con UAS-RBD, los niveles de actividad de la GTPasa *Rho1* eran más elevados que en el individuo silvestre (detectados por GFP en Fig R-15B, B', B''', C, C''' y C'''''); comparar con Fig. R-15A, A', A''') y se localizaban en las células que presentaban altos niveles de caspasa-3 citoplasmática (Fig. R-15B, B', B'', C, C'). Colocalizamos que en gran parte del citoplasma de estas células se detecta mayor presencia de *Sqh*1P (Fig. R-15 B, 15B''''') al igual que observábamos en la Fig. R-14, mientras que la forma

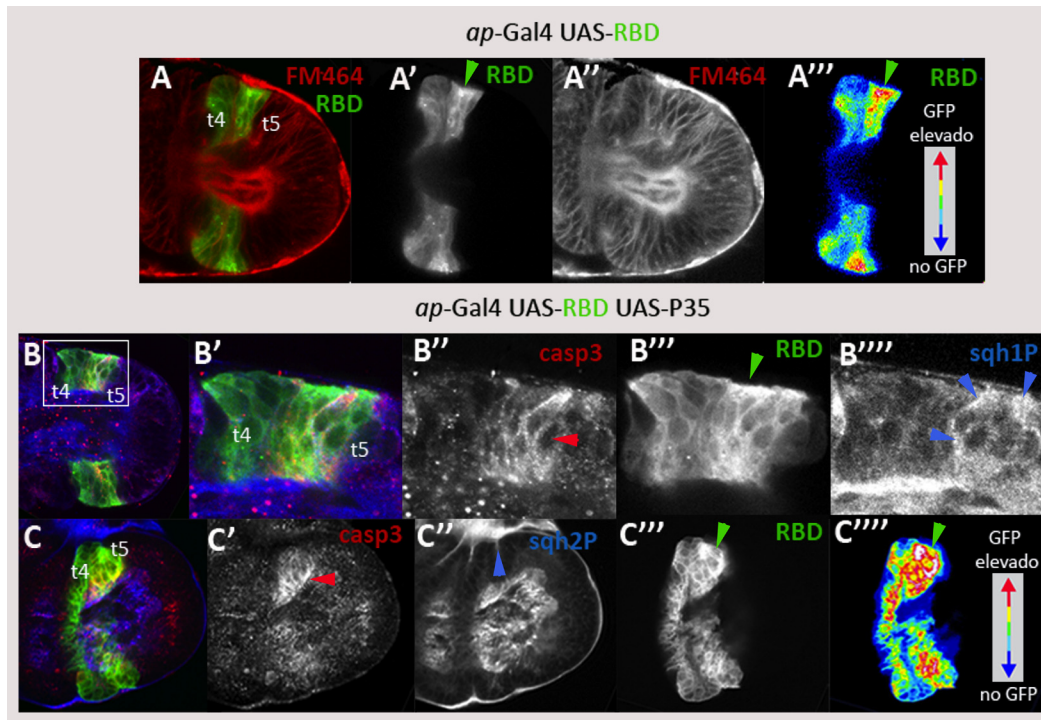


Figura R-15. Los niveles de actividad de Rho1 aumentan en las células que expresan P35, produciendo un aumento de la cantidad de proteína Sqh1P. A-A''': expresión de RBD en la unión silvestre de los tarsos t4-t5 de prepupas *ap-Gal4/+; UAS-RBD/+*. Altos niveles de GFP (en verde, indicado por puntas de flecha verdes en A' y A''); modificado a escala de 16 colores en A''') se detectan en la unión entre los tarsos t4 y t5, en los fragmentos celulares y en una franja de células proximales del tarso t5. B-C''': la inhibición de la muerte con P35 produce elevados niveles de caspasa-3 inactiva detectables en el citoplasma de estas células (rojo en B,B',C y gris en B'' y C'; indicado por puntas de flecha rojas; B'-B'''' son ampliaciones del recuadro en B). Estas células tienen altos niveles de actividad de Rho1 (niveles de GFP en gris en B''', C''' y en código de 16 colores en C''''), señalados por las puntas de flecha verdes). La elevada actividad de Rho1 colocaliza con una mayor presencia citoplasmática de la proteína Sqh1P (azul en B, B'; gris en B''', indicado por puntas de flecha azules) mientras que Sqh2P permanece como en las uniones silvestres (azul en C; gris en C''), en la región más apical del epitelio (punta de flecha azul en C'').

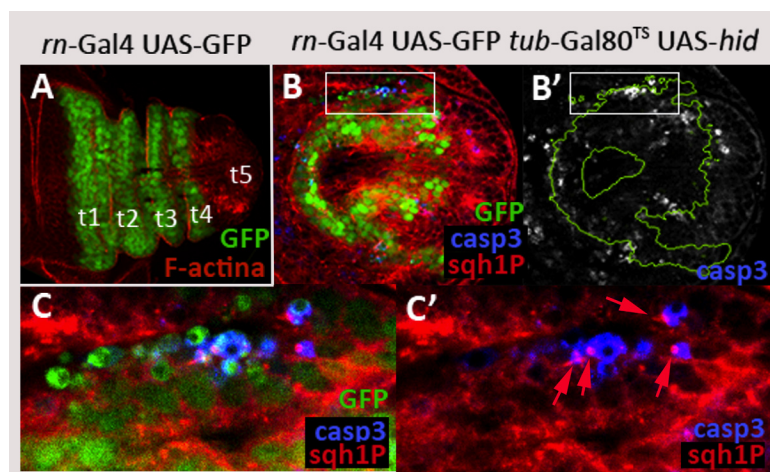


Figura R-16. La elevada expresión de *hid* produce acumulaciones locales de Sqh1P en las células apoptóticas. A: dominio de expresión de la línea *rn-Gal4 UAS-GFP* (GFP, en verde) entre los tarsos t1 y t4; la F-actina se muestra en rojo. B-B': La expresión de *hid* elimina gran parte del dominio *rn* (GFP, en verde en B, delineado en B') produciendo apoptosis, detectable por caspasa-3 (azul en B, gris en B'). C-C': ampliación de la región señalada en B y B', donde se observan células apoptóticas provenientes del dominio *rn* (GFP en verde en C, caspasa-3 activada en azul en C, C'). Estas células apoptóticas están asociadas a acumulaciones locales de Sqh1P (rojo en C, C'; señaladas por flechas rojas en C').

Sqh2P se mantiene en la región más apical del epitelio de la pata (Fig. R-15C, C''), tal y como habíamos descrito en discos de pata silvestres (comparar con Fig. R-7). En resumen, la presencia de P35 en las células apoptóticas de la articulación, promueve mayores niveles de actividad de Rho1 y mayor presencia de Sqh1P.

La inducción de muerte es suficiente para promover acumulaciones locales de Sqh1P en las células apoptóticas

Para conocer si la inducción de muerte es suficiente para promover la acumulación local de Sqh1P en las células apoptóticas del individuo silvestre, expresamos el gen proapoptótico *hid* en discos de pata de larva 3. Para ello, las larvas *UAS-hid; tub-Gal80^{TS}/+; rn-Gal4 UAS-GFP/+* fueron trasladadas de 17°C a 29°C al final del tercer estadio larvario (el dominio de expresión de la línea *rn-Gal4* en condiciones silvestres se muestra en la Fig. R-16A). Tras la expresión de *hid*, el dominio de expresión de *rn-Gal4* se elimina parcialmente (GFP en Fig. R-16B), detectándose células apoptóticas (Fig. R-16B'). En un detalle ampliado de la imagen (Fig. R-16C, C') observamos la aparición de células apoptóticas con la caspasa-3 activada en las que las acumulaciones discretas de Sqh1P se localizan tal y como habíamos visto en discos de patas silvestres (Fig. R-16C', comparar con el individuo silvestre en la Fig. R-8). Este fenómeno se observó en las células apoptóticas de todos los discos analizados (n=5). Estos datos sugieren que la expresión de *hid* es suficiente para promover acumulaciones locales de Sqh1P, tal y como se detectan en las uniones silvestres.

Altos niveles de la GTPasa Rho1 inducen acumulación de Sqh1P

Como decíamos en la introducción, la vía de la GTPasa Rho1 es capaz de activar procesos de muerte celular, como ocurre en el cierre dorsal del embrión (revisado en Harden, 2002). Hemos descrito que la disminución de niveles de Rho1 y de miosina II no muscular son capaces de modificar la activación de la apoptosis que ocurre normalmente en las uniones de patas prepupales silvestres (Fig. R-13), sugiriendo que Rho1 es capaz de modular la activación de la apoptosis en el disco de pata. Sabemos además, que cuando inhibimos la ejecución de la muerte celular expresando P35, la GTPasa Rho1 activa se acumula en las células "no muertas", colocalizando con la presencia de la forma Sqh1P (Fig. R-17). Esta observación

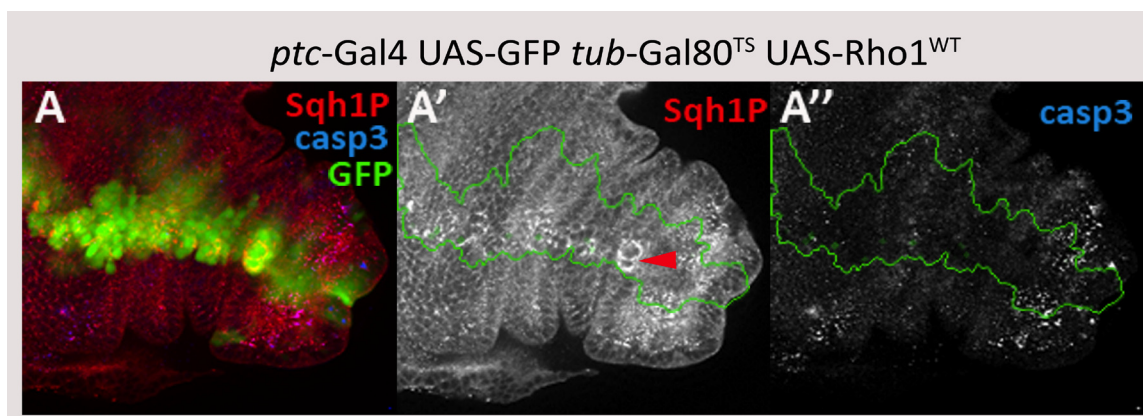


Figura R-17. Altos niveles de Rho1 promueven acumulación de Sqh1P sin inducir muerte celular. A-A'': Detección de caspasa-3 activada (azul en A, gris en A'') y Sqh1P (rojo en A, gris en A') en discos de prepupas *ptc-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Rho1^{WT}/ tub-Gal80^{TS}* que fueron trasladadas de 17°C a 29°C en el tercer estadio larvario (GFP en verde en A). Un aumento en los niveles de Rho1 produce acumulación de Sqh1P (punta de flecha en A') en las células del borde del dominio *ptc-Gal4* (indicado por la línea verde en A'). Sin embargo, no se detecta una activación de la caspasa-3 asociada a la región de *ptc* (A'').

indica que algún elemento de la cadena apoptótica precedente a la activación de la caspasa efectora Drice tal vez podría estar dirigiendo la activación de *sqh*. Una posibilidad sería que al menos alguna de las quinasas diana de la GTPasa Rho1 fuese la encargada de activar la correcta fosforilación de Sqh en respuesta a la activación de la apoptosis durante la formación de las uniones tarsales.

Sin embargo, desconocemos si la función de la GTPasa Rho1 en la modulación de la apoptosis no es sólo necesaria sino suficiente para inducir muerte celular (vía fosforilación de la miosina II). Para responder este aspecto, expresamos altos niveles de Rho1 en una banda de células a lo largo del eje A/P del disco de pata a partir del tercer estadio larvario. Observamos que elevados niveles de Rho1 aumentan la señal de Sqh1P (Fig. R-17A, A'), sin que se detecten células apoptóticas en este territorio (Fig. R-17A''). Esta observación indica que en el disco de pata, la fosforilación de Sqh es dependiente de la actividad de Rho1 (Fig. R-15) mientras que el incremento en los niveles de Rho1 producido por esta línea no es suficiente para producir apoptosis.

Resultados similares se observaron al expresar en el dominio de *ptc*-Gal4 una forma constitutivamente activa de Rho1, UAS-Rho1^{V14} (ver Material y Métodos). Para ello, las larvas *ptc*-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-Rho1^{V14}/*tub*-Gal80^{TS} fueron trasladadas de 17°C a 29°C en el estadio de larva 3 tardía. En discos de pata de este genotipo, que sufren una gran deformación, se ven también altos niveles de Sqh1P (Fig. R-18B, B''). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría cuando se incrementaban los niveles de la proteína Rho1, encontramos grupos de células apoptóticas asociadas al dominio de expresión de la línea *ptc*-Gal4, que probablemente estén delaminando para ser eliminadas, ya que se detectan en varios planos del disco imaginal (Fig. R-18B, B', B''' y B'''). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de la actividad de Rho1, y por tanto de la activación de sus genes diana, promuevan la fosforilación de Sqh y la muerte de las células, mientras que niveles inferiores de actividad de Rho1 son suficientes para fosforilar a Sqh pero sin llegar a inducir apoptosis.

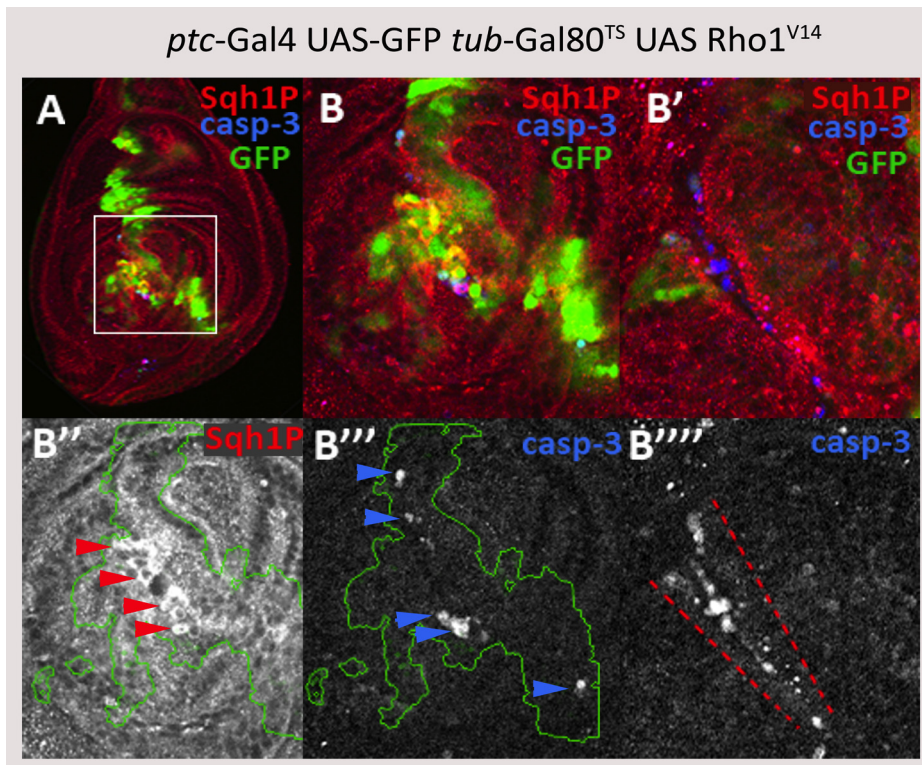


Figura R-18. La activación constitutiva de Rho1 induce mayor presencia de Sqh1P y apoptosis. A, B-B''': La expresión de Rho^{V14} en el dominio de *ptc*-Gal4 deforma la morfología del disco. En B y B' se observan dos planos de la región indicada en A. En A, B y B', Sqh1P se detecta en rojo, GFP en verde y caspasa-3 activada en azul. Rho1^{V14} aumenta los niveles de Sqh1P en las células de la región Gal4 (dominio Gal4 indicado por la presencia de GFP en verde en A, B, B', y contorneado en B''; Sqh1P en gris en B'', indicado por las puntas de flecha). Algunas de estas células mueren por apoptosis (caspasa-3 activada en gris en B''' y B''', señaladas por las puntas de flecha en B'''; mientras que en un plano confocal diferente (B''') se detectan más células apoptóticas, flanqueadas por una invaginación que se ha formado en el epitelio del disco (rojo en B', marcado por las líneas discontinuas en B''').

3. ESTUDIO DE NUEVAS FUNCIONES DEL GEN ZFH-2 EN LA MORFOGÉNESIS DE LOS SEGMENTOS TARSIALES

Dentro del proceso genético que dirige la formación de las uniones se ha descrito que el gen *zfh-2* se activa por la vía de Notch y se requiere para formar las articulaciones de la región distal de la pata. Se ha sugerido además, que *zfh-2* podría estar implicado en la regulación de la actividad de Dpp y en la inducción de apoptosis en estas uniones (Manjón, 2007)(Fig R-13 Introducción). En resumen, Zfh-2 controlaría la activación de la muerte celular así como la formación del pliegue en las uniones presuntivas, siendo un intermediario entre las señales instructoras de Dpp y Notch y los genes que desarrollan funciones celulares para la formación del pliegue en la futura unión (Manjón, 2007). Para conocer nuevos aspectos de la función de *zfh-2* en este proceso, en este capítulo describimos nuevos aspectos de su localización, regulación y función .

zfh-2 afecta únicamente al crecimiento y a la formación de los segmentos distales

Como hemos mencionado en la Introducción, la presencia de *zfh-2* en la región distal del disco durante las 78-96h de desarrollo (tercer estadio larvario) responde a la regulación por *Dll*. Sin embargo, desde el final del tercer estadio larvario en adelante, se restringe su dominio de expresión a las uniones presuntivas, tanto proximales como distales. Esta expresión tardía es la responsable del efecto de su falta de función en la formación de las articulaciones (Manjón, 2007) y la que hemos estudiado en más detalle en este apartado de resultados.

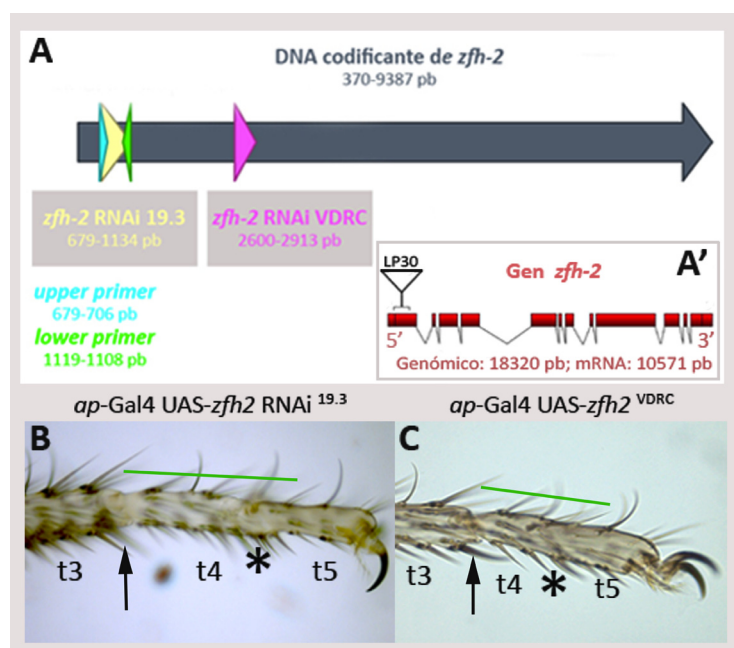


Figura R-19. Esquema de las regiones del cDNA de *zfh-2* reconocidas por las construcciones UAS-*zfh-2* RNAi y el efecto de su expresión en las patas adultas. A, A': Esquema del cDNA del gen *zfh-2* (flecha gris en A, de 370-9387 pb) y del mRNA del gen (10571 pb en A', tomado de Manjón, 2007). La línea UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} va dirigida contra el exón indicado en amarillo (670-1134 pb; en verde y azul se indican los cebadores o primers con los que se amplificó esta región; datos tomados de Terriente et al., 2008), mientras que la línea UAS-*zfh-2* RNAi^{VDRC} reconoce específicamente el exón de la posición 2600-2913 pb (en rosa, información cedida por Vienna Drosophila RNAi Center, ver Material y Métodos). B, C: La expresión de ambas líneas RNAi en el dominio *ap* (indicado por la barra verde en B, C) provoca la desaparición de la unión entre los tarsos t4 y t5 (* indica ausencia de unión en B y C; comparar con la unión silvestre entre t3-t4, señaladas con una flecha en B y C).

Para este análisis, disminuimos los niveles del gen mediante el uso de construcciones UAS-RNAi y diversas líneas Gal4. Para confirmar que la falta de función se debe exclusivamente a una disminución de los niveles de *zfh-2* mediante su RNAi, y no a un efecto en otros genes ("off-targets"), comparamos dos líneas: UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} (utilizada en Manjón, 2007) y UAS-*zfh-2* RNAi^{VDRC} (ver Material y Métodos). Cada una de las líneas está dirigida contra diferentes exones del RNA mensajero de *zfh-2* (Fig. R-19A, A'). El fenotipo de ausencia de articulación se obtiene con ambas líneas (Fig. R-19B y C), indicando que el efecto es debido exclusivamente a la falta de Zfh-2.

Para reducir la función de *zfh-2* únicamente en el compartimento posterior de la pata, utilizamos la línea *hh-Gal4*. En comparación con el individuo silvestre (Fig. R-20A, A') las uniones proximales no se ven

afectadas (Fig. R-20B, B'), pero sí las distales (el fenotipo en las uniones distales estaba ya descrito en Manjón, 2007; Fig. R-20C). Se observa igualmente un defecto en el crecimiento entre los segmentos tibia y tarso t1 (señalado en Fig. R-20C), más evidente al aumentar la reducción de *zfh-2* en combinación con la línea UAS-Dicer2 (Fig. R-20D). Con el fin de conocer si este defecto en el crecimiento se debe únicamente a la ausencia de Zfh-2 en las uniones, inactivamos el gen exclusivamente en las uniones, en el dominio de expresión de la línea *bib*-Gal4 (ver Introducción y Material y Métodos). En estas moscas se observa un claro defecto en el crecimiento de los segmentos presentes desde la tibia hasta la zona más distal de la pata, así como la ausencia de las uniones distales (Fig. R-20E, E'). Por otro lado, la combinación de las líneas UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} y *zfh-2*^{LP30}-Gal4 (Calleja et al., 1996) mostró un fenotipo más severo (Fig. R-20F, F'), ya que esta línea Gal4, al estar insertada en el gen *zfh-2* (Fig. R-19A'), además es mutante para este gen. La inactivación de *zfh-2* provoca también la ausencia de estructuras distales como las uñas (Fig. R-20C, D, F, F') y cambios en la polaridad de algunas quetas (Fig. R-20E, E', F).

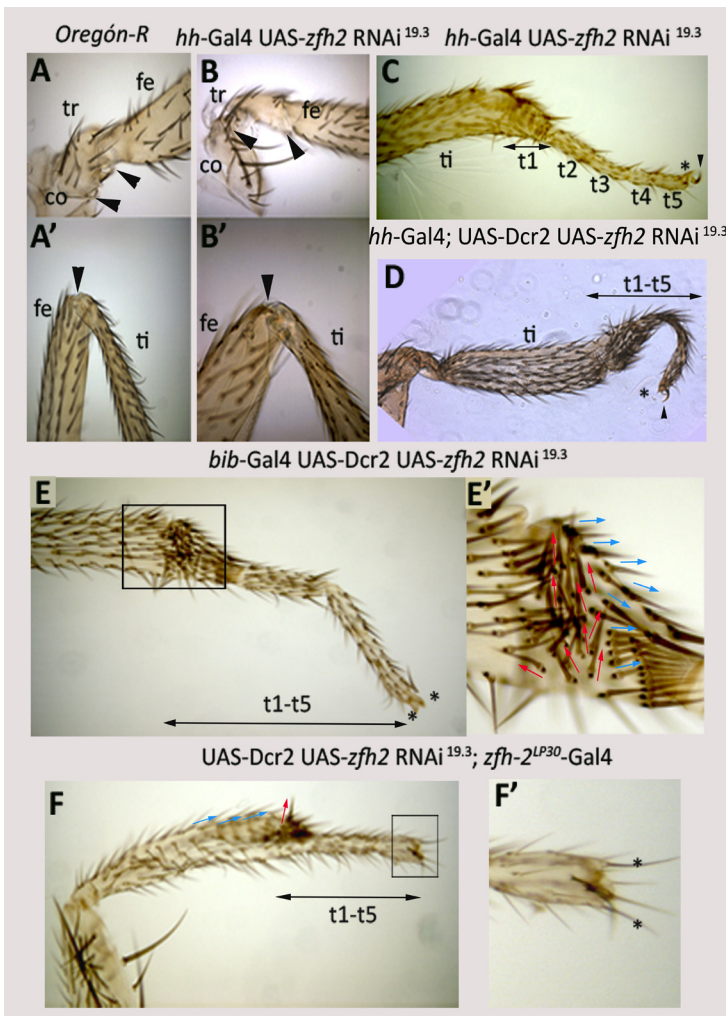


Figura R-20. Falta de función de *zfh-2* en el desarrollo de los tarsos y las uniones. A, A', B, B': las uniones entre los segmentos proximales de la pata (Co: coxa; Tr: trocánter; Fe: fémur; Ti: tibia) no se afectan ante la falta de función de *zfh-2* en moscas de genotipo *hh-Gal4/+*; UAS-*zfh2* RNAi^{19.3}/+ (B, B', comparar con las uniones silvestres, señaladas en A, A'). C, D: El efecto en el crecimiento de los tarsos (tamaño reducido del tarso t1 indicado por la flecha en C) se agrava cuando forzamos la actividad de la línea UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} en combinación con UAS-Dicer2 en moscas *hh-Gal4/+*; UAS-*zfh2* RNAi^{19.3}-UAS-Dicer2/+ (mayor reducción de los tarsos indicada por la flecha en D). En ambos casos desaparece la uña posterior (* indica la ausencia de uña frente a la señalada con la punta de flecha en C y D). E, E', F, F': menores niveles de Zfh-2 en las uniones (en los dominios de *bib* y *zfh-2*, respectivamente en E y F) afectan al tamaño de los tarsos (señalado por la flecha en E y F, comparar con patas Oregon R en las Fig. R-9, R-10 y R-11), y a la polaridad de algunas quetas (E' es una ampliación de la región indicada en la pata de moscas UAS-Dicer2/*bib*-Gal4; UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3}/ UAS-Gal4 (E: las flechas rojas indican quetas con polaridad modificada; comparar con quetas normales, señaladas por flechas azules). En moscas UAS-Dicer2/+; UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3}/+; *zfh-2*^{LP30}-Gal4 se trunca la parte distal de la pata y desaparecen más estructuras distales, fenotipo también observado en E (** indica ausencia de las dos uñas).

zfh-2 es necesario para la expresión de genes diana de N exclusivamente en los tarsos

Se sabe que *zfh-2* regula la actividad de algunos genes diana, entre los que se encuentran el gen *big brain* (*bib*) y los miembros del complejo *Enhancer of Split* (*E(spl)*). *E(spl)* se expresa en las células más distales de cada segmento de la pata, coincidiendo de manera precisa con el dominio de activación de la vía de N (de Celis et al., 1998; Bishop et al., 1999). Se ha demostrado que *zfh-2* está implicado en la activación de los genes diana de la vía Notch, como *E(spl)* y *bib* en la parte distal de los discos (Manjón, 2007), pero no en la proximal (Fig. R-21 B, B' y Fig. R-21D, D'; comparar con sus respectivos controles en Fig. R-21 A, A' y

Fig. R-21C, C'). Otro gen diana de N en la parte distal de los discos de pata es *dpn* (Mirth y Akam, 2002), cuya presencia en las uniones hemos observado que solapa con las células que expresan *zfh-2* (Fig. R-21E). Para conocer si existe alguna relación entre *dpn* y *zfh-2*, teñimos con un anticuerpo contra Dpn discos de pata de prepupas *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-zfh-2 RNAi^{VDRC}*. Los niveles reducidos de Zfh-2 provocan una disminución en la expresión de la proteína Dpn en 6 de 10 casos (Fig. R-21 G, G'; comparar con el control en Fig. R-21 F, F').

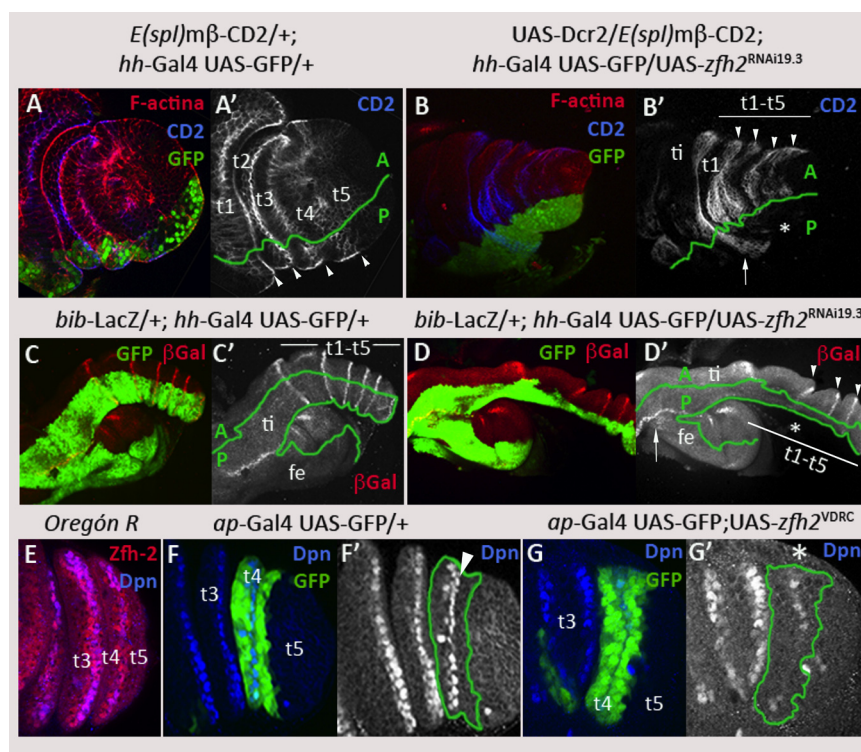


Figura R-21. La falta de *zfh-2* afecta a la expresión de genes diana de Notch. A, A': Discos control de prepupas *E(spl)mβ-CD2/+; hh-Gal4 UAS-GFP/+* donde CD2 (azul en A, gris en A') indica la expresión de *E(spl)* en las uniones (puntas de flecha en los tarsos, t1-t5, en A'). B, B': La falta de Zfh-2 en el compartimento posterior de discos de pata de prepupas *UAS-Dicer2/ E(spl)mβ-CD2; UAS-zfh2 RNAi^{19.3}/ hh-Gal4 UAS-GFP* (GFP en verde, F-actina en rojo y CD2 en azul en B; CD2 en gris en B') inhibe la expresión de *E(spl)* (* en B'), mientras que su expresión se mantiene en el compartimento anterior de los tarsos t1-t5 (señalado por las puntas de flecha en B') y en las uniones proximales (flecha). C, C', D, D': la expresión de *bib-LacZ* (β Gal en rojo en C, D, gris en C', D') disminuye ante la falta de Zfh-2 (D, D', * en D'); comparar con la expresión en los tarsos del individuo control, C, C', y con el compartimento anterior de individuos mutantes, señalado por las puntas de flecha en D'). La expresión normal se mantiene en los segmentos proximales (flecha en D'). E: Zfh-2 (rojo) y Dpn (azul) colocalizan en las células de las uniones presuntivas. F, F', G, G': La presencia de Dpn en los tarsos (en azul en F, G; en gris en F', G') se ve afectada ante la falta de función de *zfh-2* en el dominio *ap-Gal4* (GFP en G, delineado en G') en comparación con el control (F, F').

Regulación entre *dAP-2* y *zfh-2* en las uniones tarsales

zfh-2 es activado por la vía de Notch, pero solo conocemos parcialmente su relación genética con otros genes efectores de esta vía. El gen *Drosophila activator protein 2* (*dAP-2*) es regulado por Notch, se expresa en todas las células que formarán las articulaciones de la pata y su falta de función impide la formación de las mismas (Kerber et al., 2001, Monge et al., 2001, Ahn et al., 2011). Para estudiar la posible relación entre *dAP-2* y *zfh-2* estudiamos primero la presencia de Zfh-2 con un anticuerpo específico (Fortini et al., 1991, ver Material y métodos) en mutantes *d-AP2¹¹/d-AP2¹⁵* (ver Material y Métodos). En discos de este genotipo hay ausencia de pliegues (o son incompletos, y no se detecta proteína Zfh-2 (Fig. R-22B',

comparar con el fenotipo silvestre en Fig.R- 22A). Por contra, la reducción de *zfh-2* no cambia la expresión de *dAP-2* (Fig. R-22D, comparar con la expresión en individuos silvestres en Fig. R-22C).

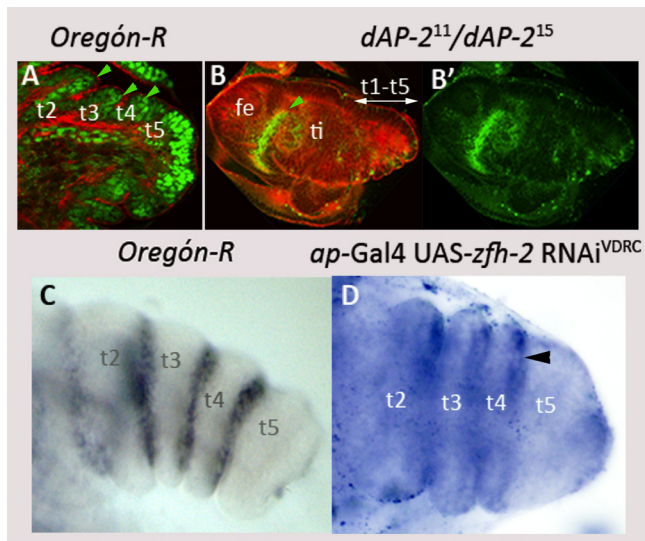


Figura R-22. Regulación entre *dAP-2* y *zfh-2* en las uniones tarsales. A: disco de pata silvestre donde se detecta la proteína Zfh-2 (verde) en la región mas distal de los futuros tarsos (F-actina se marca en rojo). B, B': Zfh2 (verde en B, B') desaparece en mutantes *dAP-2* (discos de individuos tranheterocigóticos para dos alelos mutantes del gen, *dAP2*¹¹ y *dAP2*¹⁵, nulo e hipomorfo, respectivamente). En estos discos los pliegues no se forman (F-actina en rojo en B). C, D: La disminución de Zfh-2 en discos de prepupas *ap-Gal4/+; UAS-zfh-2 RNAi^{VDRC}/+* no afecta a la transcripción de *dAP-2* (D, comparar con la expresión silvestre en C).

zfh-2 se activa ectópicamente en mutantes de polaridad planar *prickle spiny leg*

Los resultados anteriores parecen indicar que Notch, mediante la actividad del gen *dAP-2*, podría estar regulando la correcta expresión de *zfh-2* en las uniones presuntivas. En las patas de individuos mutantes para el gen de polaridad planar *prickle spiny leg* (*pk sple*) aparecen articulaciones ectópicas de polaridad invertida únicamente en la región tarsal de la pata (Held et al., 1986). En el trabajo de Bishop et al., 1999, describen este fenómeno en mutantes de polaridad planar *dsh*, donde demuestran que las uniones ectópicas se debe a la actividad ectópica de Notch. Notch es una proteína ubicua que, en los tarsos se activa únicamente en la región distal (ver Introducción; de Celis et al., 1998; Bishop et al., 1999; Rauskolb, 1998). Bishop y colaboradores sugieren que los genes de polaridad planar ejercen una función crucial en la especificación de las articulaciones ya que reprimen la activación de N en las regiones proximales de los tarsos (Bishop et al., 1999).

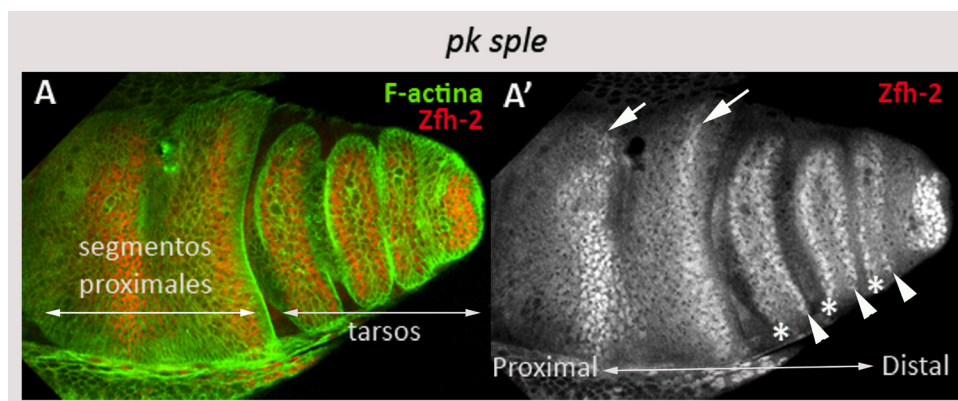


Figura R-23. Defectos en la polaridad planar afectan la expresión de *zfh-2* en los tarsos. A: detección de Zfh-2 (verde) y F-actina (rojo) en discos de prepupas *pk sple*. En los tarsos (indicados en A) la expresión de Zfh-2 se duplica (bandas ectópicas, señaladas con * junto a las silvestres, señaladas con puntas de flecha en A'). Este fenómeno no ocurre en los segmentos proximales (indicados en A) donde Zfh-2 se detecta únicamente en la región distal de los segmentos (flechas en A').

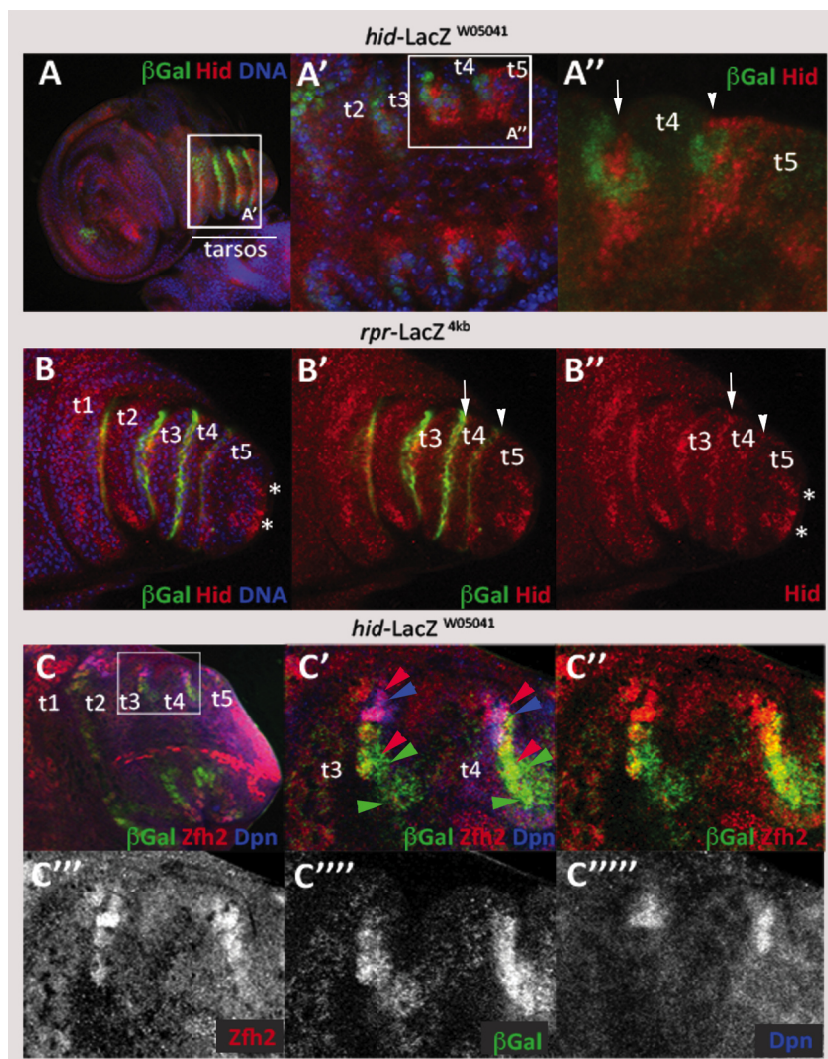


Figura R-24. Localización de Hid y Zfh-2 en las futuras articulaciones tarsales. A-A'': A' es una ampliación del recuadro en A, y A'' del de A'. La línea *hid-LacZ* se co-expresa con Hid en las uniones tarsales (β Gal en verde en A, A', A'', proteína Hid en rojo) antes (punta de flecha) y después (flecha) de formarse los pliegues de las futuras uniones entre los tarsos t4-t5 y t3-t4, respectivamente. B-B'': La proteína Hid (B, B'') colocaliza con las células que expresan la línea *rpr-LacZ* (β Gal en verde en B, B'). Hid se encuentra también en la región distal de la pata (rojo en B, B', señalado por **) mientras que las líneas *hid-LacZ* y *rpr-LacZ* no se expresan en esta zona (B'). En azul el DNA es marcado por Topro en A, A', B. C-C''''': Zfh-2 (rojo), Dpn (azul) y β Gal (verde) en las uniones tarsales de un individuo *hid-LacZ*. Una ampliación de la región señalada en C muestra la colocalización de Dpn y Zfh-2 (puntas de flecha azules y rojas, respectivamente, C'), y la colocalización de Zfh-2 y β Gal (puntas de flecha rojas y verdes, respectivamente, C') en las células más distales de los tarsos t3 y t4 en C', C''. Zfh-2 (C'''), β Gal (C''') y Dpn (C''') se muestran separadamente en gris.

En mutantes en genes de polaridad planar, de acuerdo con esta idea, las dianas de Notch como *zfh-2* deberían expresarse ectópicamente. En efecto, observamos en mutantes *pk sple* la presencia de bandas duplicadas de Zfh-2 dentro de cada tarso, localizándose un anillo en el extremo distal de cada futuro segmento y otro ectópico en posición más proximal (Fig. R-23). Asimismo, observamos en estos discos que esta expresión ectópica solo ocurre en segmentos distales, coincidiendo con la activación ectópica de Notch en los tarsos de discos de pata mutantes de polaridad planar (Bishop et al., 1999).

La expresión de *zfh-2* solapa parcialmente con la expresión de *hid*

La falta de función de *zfh-2* disminuye la expresión de *rpr-LacZ* (Manjón, 2007). Para estudiar en más detalle como regula *zfh-2* los genes pro-apoptóticos utilizamos la línea *hid-LacZ*, una inserción en el gen proapoptótico *hid* (Grether et al., 1995, ver Material y Métodos) así como un anticuerpo contra la proteína codificada por este gen (Shlevkov y Morata 2011). Tanto Hid como *hid-lacZ* muestran expresión en las células de las uniones tarsales. La proteína se encuentra en la unión, antes y después de formarse los pliegues tarsales, colocalizando con la expresión mostrada con *hid-lacZ* (Fig. R-24A-A''), así como con *rpr-LacZ* (Fig. R-24B-B''). Sin embargo, en la región más distal de la pata donde se detecta proteína Hid, no se expresan ninguna de las dos líneas indicadoras (FIG. R-24B-B'').

Para determinar la expresión de Zfh-2 con respecto a *hid*, utilizamos un anticuerpo específico contra Zfh-2 en prepupas *hid-LacZ*. Utilizamos además Dpn como marcador de la articulación, Observamos que Zfh-2 colocaliza con Dpn (Fig. R-24C, C', C'', C''') tal y como mencionábamos en la Fig. R-21. Aquí observamos,

además, que *Zfh-2* y *hid-LacZ* solapan en las células distales de los futuros tarsos pero que en las células formadoras del pliegue se expresa *hid-LacZ* pero no *Zfh-2* ni *Dpn* (Fig. R-24C, C', C'', C''', C''').

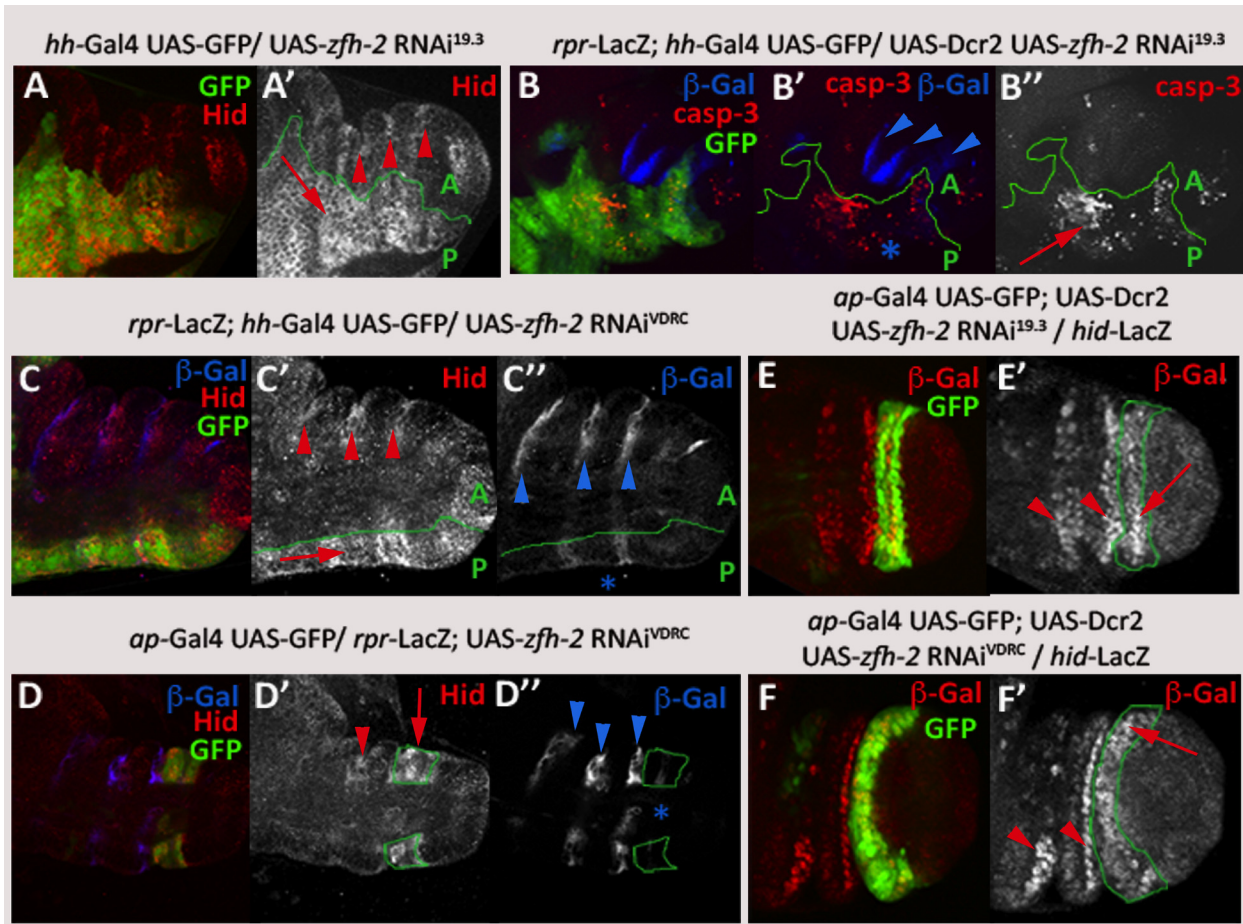


Figura R-25: *hid* y *rpr-LacZ* responden diferentemente a la falta de *Zfh-2*. A-A', B-B'': En un contexto *zfh-2* RNAi^{19.3} en el compartimento posterior (P) de discos *hh-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} (A-A') y *rpr-LacZ/+; hh-Gal4* UAS-GFP/ UAS-Dicer2 UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} (B-B'') se detectan altos niveles de muerte celular (comparar con el compartimento anterior (A)). En A y A' *Hid* aumenta en el compartimento posterior (en rojo en A, y en gris en A' indicado por la flecha; comparar con las puntas de flecha que señalan la expresión normal de *Hid* en las uniones del compartimento anterior). En B-B'' detectamos mayor número de células con caspasa-3 activada (rojo en B, B'; gris en B'' señalado por la flecha) pese a la disminución de la expresión de *rpr-LacZ* (azul en B, B'; * indica la ausencia de β Gal en B'; comparar con las uniones silvestres del compartimento anterior, indicadas por las puntas de flecha en B'). C-C'': Resultados similares se observan en discos de pata *rpr-LacZ/+; hh-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*zfh-2* RNAi^{VDRc} donde *rpr-LacZ* disminuye su expresión en el compartimento posterior (GFP en C, delineado en C', C''; * indica ausencia de β Gal, frente a la expresión de las uniones control, indicada por puntas de flecha en C''). D-D'': Bajo el control de la línea *ap-Gal4* (*ap-Gal4* UAS-GFP *rpr-lacZ/+; UAS-zfh-2* RNAi^{VDRc/+}) el fenotipo obtenido es el mismo (GFP en D, contorno en D', D''): *Hid* elevado (rojo en D, gris en D', señalado por la flecha; comparar con la unión control, indicada con la punta de flecha) y *rpr-LacZ* disminuido (azul en D, gris en D''; comparar la ausencia de azul, señalada como * en D'', frente a las uniones control, señaladas con puntas de flecha). E, E', F, F': la expresión de *hid-LacZ* aumenta en ausencia de *Zfh-2* (β Gal, ectópica, en rojo en E,F; gris en E', F') en el dominio *ap* (GFP en E, F; contorno en E', F') usando ambas líneas UAS-*zfh-2* RNAi (19.3 en E y E'; VDRc en F y F').

zfh-2 reprime la expresión de *hid*

Para saber si *zfh-2* regulaba a *hid* tal como hace con *rpr-lacZ* (Manjón, 2007), estudiamos su expresión en discos donde reducimos la expresión de *zfh-2*. Sorprendentemente, vimos proteína *Hid* en el compartimento posterior de discos *hh-Gal4* UAS GFP/ UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} (Fig. R-25A, A'). La ausencia de *Zfh-2* en el compartimento posterior también produce más células apoptóticas en comparación con el compartimento anterior pese a la disminución del gen indicador *rpr-LacZ* (Fig. R-25B-B'' y C, C''). Este aumento de caspasa-3, sin embargo, presenta cierta variación. Cuando usamos la línea UAS-*zfh-2* RNAi^{VDRc}

en el dominio de *hh*, el aumento de la presencia de la proteína Hid colocaliza en las células que reducen la expresión de *rpr-lacZ* (Fig. R-25C, C', C''), por lo que ambas líneas RNAi produjeron el mismo efecto en la presencia de la proteína Hid. Similares resultados se obtuvieron con la línea *ap-Gal4* (Fig. R-25D, D', D''). En experimentos en los que utilizamos la línea *hid-lacZ* en vez de un anticuerpo contra Hid y disminuimos los niveles de Zfh-2 con las líneas UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3} (Fig. R-25E, E') y UAS-*zfh-2* RNAi^{DRC} (Fig. R-25F, F') observamos un aumento de β -galactosidasa. Pese a que este aumento no se ve en todos los casos, es importante destacar que nunca observamos una disminución como la que se ve con la línea *rpr-lacZ* (comparar *hid-LacZ* en E', F' con *rpr-lacZ* en D''). Estos datos sugieren que *zfh-2* podría estar reprimiendo *hid* en las uniones silvestres, ya que la expresión de *hid-LacZ* y la presencia de la proteína Hid aumentan ante la falta de función de *zfh-2*.

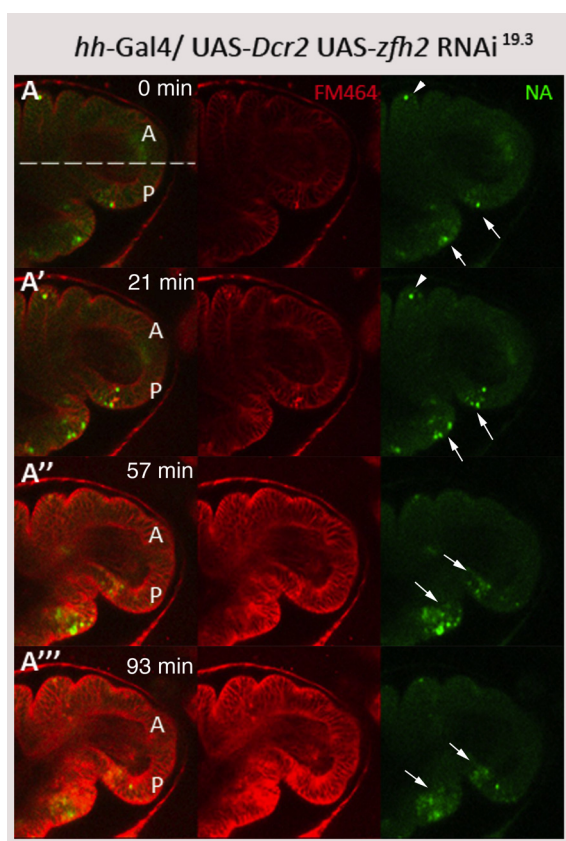


Figura R-26: La falta de Zfh-2 activa la muerte celular *in vivo*. A-A''': imágenes adquiridas de la película 6, en la que se muestra un disco de pata *hh-Gal4/+*; UAS Dicer-2 UAS-*zfh-2* RNAi^{19.3/+} a distintos tiempos (t=0, 21, 57 y 93 min.). El número de células apoptóticas (marcadas con Naranja de acridina, NA, en verde en A-A''') va incrementando (flechas), a medida que pasa el tiempo, en el dominio posterior (comparar con las uniones silvestres del compartimento anterior, donde las células apoptóticas se señalan con puntas de flecha; A, anterior; P, posterior). Aunque no podemos ver GFP al mismo tiempo que la naranja de acridina, diferenciamos el compartimento posterior por la ausencia de pliegues, característico de la falta de Zfh-2 (FM464, en rojo, permite ver la morfología celular). Las imágenes de esta película fueron adquiridas cada

Para comprobar que la muerte celular aumenta cuando reducimos los niveles de Zfh-2, cultivamos *ex vivo* discos imaginales de prepupas *hh-Gal4/ UAS-Dicer2 UAS-zfh-2* RNAi^{19.3} (que han crecido en medio de cultivo suplementado con Naranja de Acridina (ver Material y Métodos). Observamos a tiempo real que la muerte está activada de manera ectópica en muchas de las células mutantes del compartimento posterior (Fig. R-26 y Película 6, ver Anexo). Observamos además que estas células apoptóticas no son eliminadas del epitelio. Este resultado indica que bajos niveles de Zfh-2 provocan muerte celular que puede ser monitorizada *ex vivo*.

Elevados niveles de Zfh-2 suprimen las uniones de los tarsos y disminuyen la actividad de genes diana de la vía de Notch

Para estudiar el efecto producido por la expresión aumentada o ectópica de *zfh-2*, utilizamos una línea que expresaba el gen *zfh-2* bajo control UAS. Esta línea incrementa los niveles de Zfh-2 bajo control de Gal4: está inserta en la región 5' del primer exón de *zfh-2*, y contiene la secuencia codificante para mcherry (comunicación personal de F. J. Díaz-Benjumea, ver Material y Métodos). Así, al combinarla con una línea Gal4 induce la expresión de la proteína Zfh-2, marcando además su expresión con el fluoróforo mcherry.

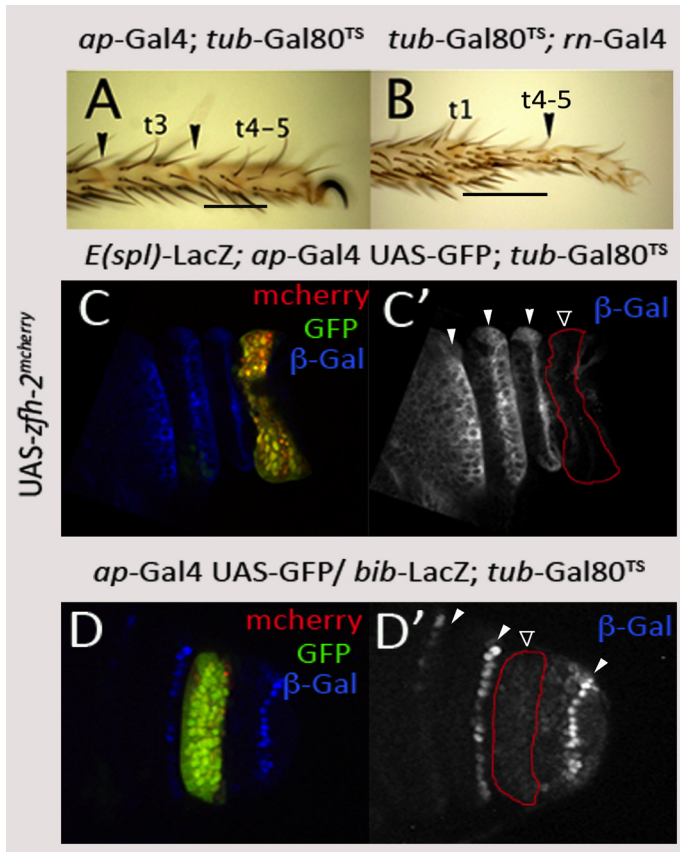


Figura R-27. Altos niveles de *Zfh-2* impiden la activación de *N* y el desarrollo de los tarsos. **A, B:** La expresión ectópica de *zfh-2* desde el tercer estadio larvario en los dominios de *ap* y *rn* en moscas *ap-Gal4;tub-Gal80^{TS}; UAS-zfh-2-mcherry* (A) y *tub-Gal80^{TS}; rn-Gal4; UAS-zfh-2-mcherry* (B) impide la formación de las uniones (las puntas de flecha indica las uniones que se han formado al no estar comprendidas en los dominios Gal4, indicados por las barras negras). Obsérvese también la disminución de tamaño en el caso de *rn* (B). **C, C' y D, D':** discos de pata de prepupas *E(spl)-LacZ; ap-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{TS}/+; UAS-zfh-2-mcherry/+* (C, C') y *ap-Gal4 UAS-GFP/ bib-LacZ; tub-Gal80^{TS}/+; UAS-zfh-2-mcherry/+* (D, D') que fueron pasadas de 17°C a 29°C durante el tercer estadio larvario (*mcherry* en rojo en C y D, delineado en C' y D'; GFP en verde). Observamos la disminución severa (puntas de flecha vacías) en la expresión de los genes diana *E(spl)* (en azul en C, gris en C') y *bib* (azul en D, en gris en D') en comparación con la expresión de las uniones control (puntas de flecha en C', D').

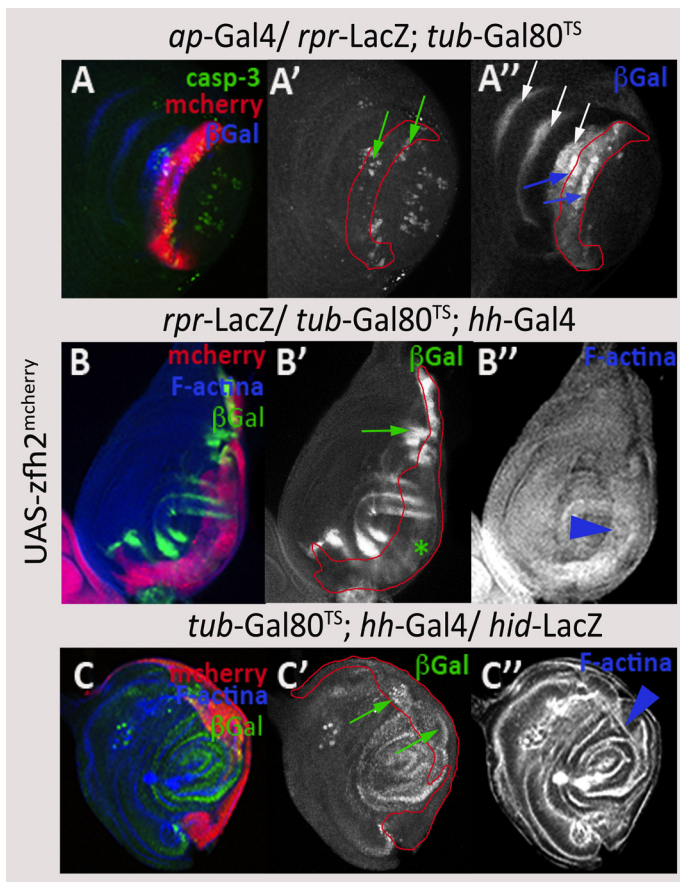


Figura R-28. Altos niveles de *Zfh-2* activan la apoptosis e inducen pliegues en el epitelio. **A-A'':** La expresión ectópica de *zfh-2* desde larva 3 en el dominio *ap* (*ap-Gal4/+; tub-Gal80^{TS}/+; UAS-zfh-2-mcherry* (rojo en A, delineado en A' y A'')) promueve la aparición de células con caspasa-3 activada, frecuentemente en el borde del dominio Gal4 (verde en A, gris en A', señalado por flechas verdes). Esta muerte va acompañada de la expresión ectópica de *rpr-LacZ* (azul en A, gris en A'') donde las flechas azules señalan las bandas ectópicas del gen indicador en el borde del dominio Gal4, (la expresión normal de *rpr-LacZ* se indica con flechas blancas en A''). **B-B'':** expresión de *zfh-2* en el dominio posterior del disco de pata a partir del tercer estadio larvario en discos de pata de prepupas *rpr-LacZ/ tub-Gal80^{TS}; hh-Gal4/+; UAS-zfh2-mcherry/+*. La expresión de *rpr-LacZ* disminuye en la región de los tarsos (indicado por * en B'), mientras que en la región proximal del disco se expresa ectópicamente (flecha en B') en el borde del dominio Gal4 (rojo en B, delineado en B'). **C-C'':** en condiciones similares de cambios de temperatura, (rojo en C, delineado en C' y C'') en prepupas *tub-Gal80^{TS}; hid-LacZ/ hh-Gal4; UAS-zfh-2-mcherry* la expresión de *hid-LacZ* en los tarsos no disminuye (verde en C, gris en C'), mientras que aparece *hid-LacZ* ectópico (flechas en C') en la parte proximal del disco, asociado al borde del dominio Gal4). El marcaje de F-actina (azul en B, C; gris en B'', C'') permite observar el pliegue producido ectópicamente (puntas de flecha en B'' y C'').

(F. D. Díaz-Benjumea, datos sin publicar). Denominamos a esta línea UAS-*zfh-2*-mcherry.

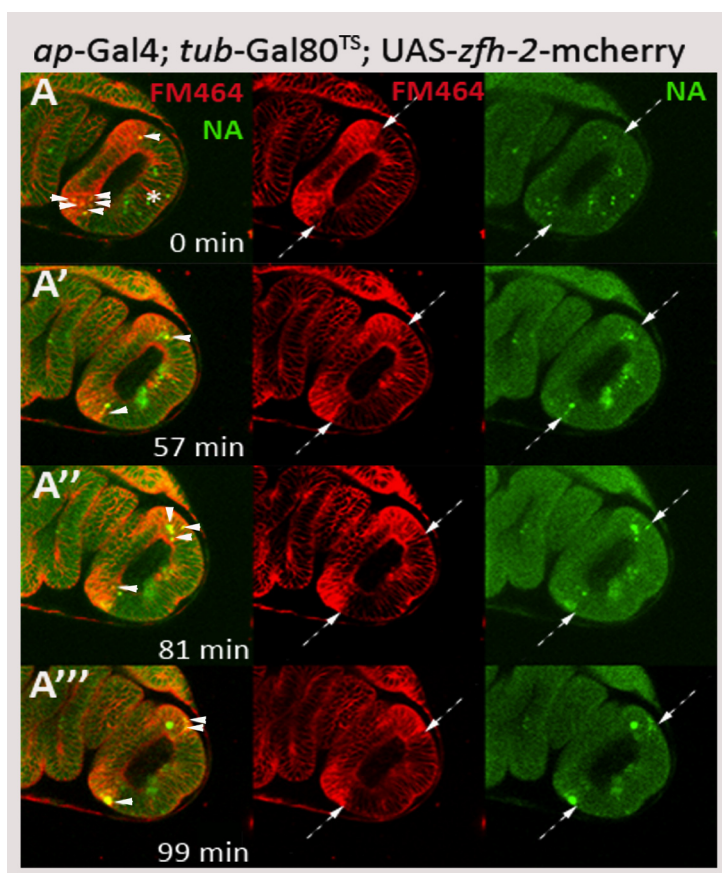


Figura R-29. Altos niveles de Zfh-2 inducen apoptosis en los futuros tarsos. A-A''': Imágenes de la película 7 tomadas a t=0, 57, 81 y 99 min (FM464 se muestra en rojo y Naranja de Acridina, NA, en verde). Aparecen células apoptóticas en la región más distal del dominio *ap* (en los sucesivos tiempos marcamos el límite del dominio Gal4 con flechas discontinuas en los paneles centrales y derechos, y las células apoptóticas están señaladas con puntas de flecha en los paneles de la izquierda). Además se observan las células apoptóticas características del pretarso (* en A). Imágenes adquiridas cada 3 minutos.

Cuando expresamos *zfh-2* en los dominios de *ap* y *rn*, las uniones entre los tarsos de estos dominios se eliminan (Fig. R-27A y B, respectivamente). Se observa además una reducción del tamaño de los tarsos, más evidente en patas de moscas *rn*-Gal4; UAS-*zfh-2*. Estos resultados sugieren que tanto la disminución como el incremento de los niveles de Zfh-2 producen la ausencia de articulaciones entre los tarsos.

Con el objetivo de entender el efecto de la sobreexpresión de *zfh-2* en las vías de señalización implicadas en el desarrollo de las uniones, quisimos estudiar los niveles de expresión de genes diana de la vía de N en este contexto. Para ello, disecamos discos de pata de prepupas en los que analizamos el efecto de la sobreexpresión de *zfh-2* en el dominio *ap* sobre la expresión de las líneas indicadoras *E(spl)*-LacZ y *bib*-lacZ. Observamos que los niveles de expresión de *E(spl)*-LacZ (Fig. R-27C, C'), o *bib*-LacZ (Fig. R-27D, D') disminuían al aumentar Zfh-2 en el 100% de los discos en el primer genotipo (n=11) y en el 78% de los casos en el segundo (n=14).

La sobreexpresión de *zfh-2* promueve muerte celular y pliegues ectópicos en el disco de pata

Hemos descrito que el efecto de incrementar los niveles de Zfh-2 impide la formación de las uniones tarsales, y que este efecto probablemente se debe a la disminución de los niveles de expresión de genes diana de la vía de N. Puesto que la falta de función de *zfh-2* modifica la activación de la cascada apoptótica, quisimos saber si un aumento de los niveles de Zfh-2 pudiera ser también capaz de modificar la correcta activación de la apoptosis.

El efecto que observamos en los niveles de expresión de *rpr*-LacZ cuando aumentamos la expresión de *zfh-2* es, sin embargo, complejo. Cuando expresamos *zfh-2* desde el tercer estadio larvario en este fondo genético se inducen altos niveles de β -Galactosidasa, encontrándose frecuentemente dos bandas de

expresión de *rpr-LacZ* en los límites del dominio *ap-Gal4* en un 48% de los casos, desapareciendo además el anillo de *rpr-LacZ* presente entre los tarsos t4 y t5 en el 85% de los casos (n=21)(Fig. R-28A, A''). Este fenotipo viene acompañado de un aumento de caspasa-3 activada en los límites del dominio Gal4 en el 90% de los casos (n=21)(Fig. R-28A, A'). Sin embargo, con la línea *hh-gal4* se observa una inhibición en la expresión de *rpr-Z* acompañada por su expresión ectópica en zonas proximales a los tarsos (n=11), en el límite entre células que expresan ectópicamente *zfh-2* y las que no lo hacen (Fig. R-28B, B'). En resumen, la respuesta a elevados niveles de Zfh-2 de *rpr-LacZ* es compleja, ya que varía en función de la línea Gal4 utilizada, así como en función de la región del disco (proximal o distal) donde incrementamos los niveles de Zfh-2. En discos de pata de prepupas donde expresamos *zfh-2* a partir del tercer estadio larvario en el dominio de *hh*, la expresión de *hid-LacZ* no disminuye claramente en el dominio *hh-Gal4* de los tarsos (Fig. R-28C, C') y observamos además una ligera activación de *hid-LacZ* en la región proximal del disco (Fig. R-28C, C').

Es interesante resaltar que cuando *zfh-2* se expresa en el compartimento posterior del disco, el marcaje con F-actina permite visualizar una indentación en el epitelio, sugiriendo que un pliegue ectópico puede aparecer en la región del disco donde altos y bajos niveles de *zfh-2* se enfrentan (Fig. R-28B'' y R-28C''). Sin embargo, en discos de pata donde *zfh-2* se expresa en el dominio *ap-Gal4*, el pliegue de la unión presuntiva entre los tarsos t4 y t5 nunca se forma (Fig. R-28A). Ya que ante falta de función de *zfh-2* la morfología de los pliegues desaparece o se ve alterada, estas observaciones sugieren que la formación de un pliegue puede requerir que altos y bajos niveles de *zfh-2* se enfrenten en las células de la unión presuntiva. La ausencia de tal pliegue ectópico cuando se expresa *zfh-2* bajo el dominio *ap*, sin embargo,

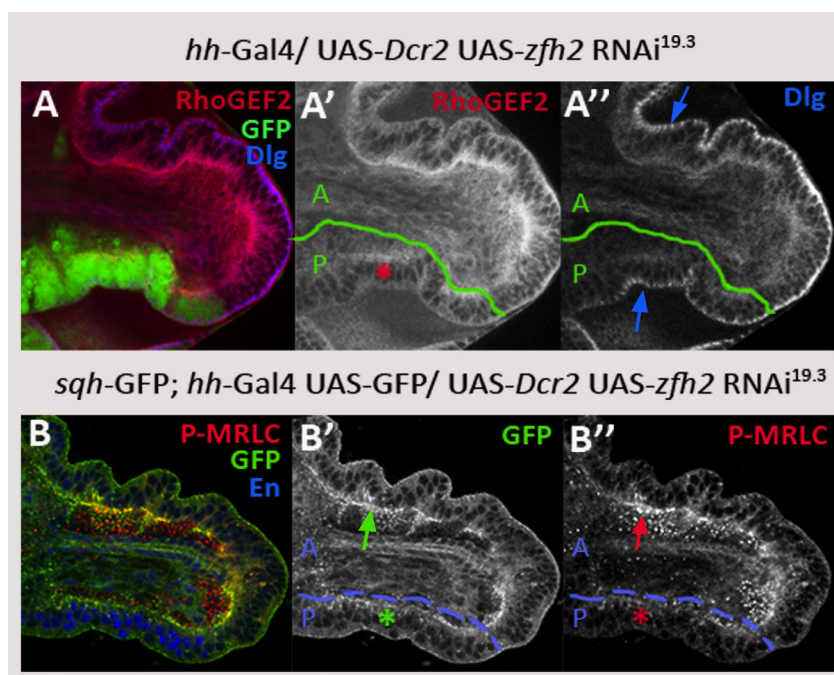


Figura R-30. Los niveles de RhoGEF2 y miosina II disminuyen cuando disminuye la expresión de *zfh-2*. A-A'': La falta de Zfh2 en discos de pata de prepupas *hh-Gal4 UAS-GFP/ UAS-Dcr2 UAS-zfh-2 RNAi^{19.3}* produce una disminución en la presencia de RhoGEF2 (rojo en A, gris en A') en la base de las células del compartimento posterior (indicado como *, comparar con el compartimento anterior). La presencia de Dlg (azul en A, gris en A'') sin embargo, es similar en ambos compartimentos (flechas). B-B'': La disminución de Zfh2 en discos de pata de prepupas *sqh-GFP/+; hh-Gal4/ UAS-Dcr2 UAS-zfh-2 RNAi^{19.3}* afecta a la presencia de la miosina II (en verde en B, en gris en B') en el compartimento posterior (marcado por la presencia de En, en azul en B, delineado en B', B''), encontrándose menos señal de *sqh-GFP* (* indica menos Sqh, comparar con la flecha en B'). Su actividad, además, se ve disminuida, ya que el estado de la fosforilación de las cadenas reguladoras de la miosina II (P-MRLC en rojo en B, en gris en B'') disminuye en el compartimento posterior (* indica su ausencia, comparar con el compartimento anterior, señalado por la flecha en B').

puede sugerir que las diferencias en los niveles de expresión de las células que se confrontan pueden ser importantes o que se requiere algún elemento adicional para este proceso.

Para profundizar en el estudio de las células que tienen altos niveles de *Zfh-2*, cultivamos *ex vivo* discos de prepupas *ap-Gal4/+; tub-Gal80^{TS}/+; UAS-zfh-2/+* crecidas en medio de cultivo con Naranja de Acridina (NA). Aunque tanto el marcaje de membrana con FM464 como la construcción *UAS-zfh-2-cherry* van marcadas en rojo, el dominio de *ap* se distingue por los mayores niveles de la señal emitida por la proteína mcherry (Fig. R-29A-A''' y Película 7, ver Anexo). Observamos un incremento de células apoptóticas en el dominio *ap* que se dirigen hacia la base del epitelio (Fig. R-29A-A''').

***zfh-2* se requiere para mantener altos niveles de miosina II en las uniones presuntivas de los tarsos**

Los resultados anteriores indican un papel de *zfh-2* en regular genes que conducen a procesos celulares implicados en la formación de pliegues en el epitelio, sugiriendo una relación con la activación de la miosina, tal y como definimos en los apartados anteriores de esta Tesis. Resultados recientes indican que diferentes activadores o inhibidores de GTPasas (RhoGEFs y RhoGAPs, respectivamente) se expresan en las uniones presuntivas, están regulados por la vía de Notch, y son necesarios para la formación de las mismas (Greenberg y Hatini, 2010).

Para conocer cómo se afecta la maquinaria celular que dirige la formación de pliegues en ausencia de *zfh-2*, estudiamos la distribución de RhoGEF2, un elemento en la vía de activación de *sqh* en discos de pata de prepupas *hh-Gal4/ UAS-Dicer2 UAS-zfh2 RNAi^{19.3}*. Los niveles de RhoGEF2 disminuyen en las células del compartimento posterior mutantes (Fig. R-30A, A' comparar con el compartimento anterior, A), mientras que los de la proteína de polaridad e integridad epitelial Disc large (Dlg) permanecen invariables, sugiriendo que la falta de *zfh2* no causa una desorganización general del epitelio (Fig. R-30A, A''). Ya que la distribución de RhoGEF2 se encuentra afectada, quisimos saber si esto implicaba cambios en la activación de la miosina II. En discos de pata de prepupas *sqh-GFP; hh-Gal4/ UAS-Dicer2 UAS-zfh2 RNAi^{19.3}* detectamos que disminuyen los niveles de la cadena reguladora de la miosina II (*sqh-GFP*, verde en la Fig. R-30B, en gris en B'), lo que se observa igualmente al medir su fosforilación (Fig. R-30B, B''). Resaltamos que la disminución de RhoGEF2 y de la miosina fosforilada ocurre de manera notable en la base de las células, pese a que en el resto del tejido se detecta una disminución más leve.

El conjunto de estas observaciones sugerirían que *zfh-2* podría ejercer un papel crucial en la unión entre la vía de señalización de Notch y la maquinaria celular requerida para la correcta morfogénesis de las articulaciones de los tarsos.

DISCUSIÓN

La investigación en *Drosophila* es una herramienta importante para el estudio de genes que se encuentran implicados en procesos como la proliferación, la apoptosis y la migración celular. Estos genes están muy conservados, y la desregulación de los mismos está presente en muchos procesos cancerosos, por lo que su estudio es de gran importancia. Pese a que la mosca no posee algunas de las características propias del hombre, que están mejor representados en los organismos vertebrados modelo, su simplicidad y la conservación funcional de muchos de sus genes han permitido grandes avances en el estudio de diversas patologías, trasladables al trabajo en organismos vertebrados modelo como el pollo o el ratón (Polesello et al., 2011).

En esta Tesis nuestro modelo de estudio son las uniones entre los segmentos tarsales de la pata, proceso que requiere la muerte celular (Manjón et al., 2007). Durante el desarrollo, la apoptosis no sólo funciona como un mecanismo de control del número de células, sino que también ejerce un papel activo durante la morfogénesis, permitiendo el modelado de los tejidos en desarrollo (Harden, 2002; Lohmann et al., 2002; Zuzarte-Luis y Hurle, 2005; Fuchs y Steller, 2011). En este trabajo demostramos que para el desarrollo de las articulaciones tarsales de la pata de *Drosophila*, la apoptosis y los mecanismos moleculares necesarios para el modelado del tejido están íntimamente asociados.

1. MODELO DE ACTIVACIÓN DE LA GTPASA RHO1, LA MIOSINA II Y LA APOPTOSIS EN LA FORMACIÓN DE LAS UNIONES

En muchos de los ejemplos en el desarrollo de órganos donde se requiere la formación de un pliegue en el epitelio, la constricción apical de la células precede a su eliminación del tejido por extrusión basal (Kiehart et al., 2000; Sawyer et al., 2009). En nuestro modelo, un grupo de células apoptóticas se extruyen del epitelio, seguido por la constricción apical de células que forman el pliegue que prefigura la unión presuntiva en el epitelio. Durante las 6h anteriores a la formación del pupario (0h APF) se inicia la morfogénesis de las articulaciones en el disco de pata (Mirth, 2005). El hecho de que la articulación que une los tarsos t4 y t5 comience su morfogénesis con un pequeño retraso en comparación al resto de articulaciones tarsales (Shirai et al., 2007), nos permite seguir su formación desde el inicio, no solo en muestras de tejido fijado sino en tiempo real. Esta técnica se utiliza por primera vez en el disco de pata, y ha servido para entender muchos de los aspectos relativos al proceso que estudiamos. Además, ya que la muerte celular es necesaria para todas las uniones tarsales por igual (Manjón et al., 2007) y que los fenotipos obtenidos no variaban de una articulación a otra, incluimos nuestros resultados en un modelo de morfogénesis para todas las uniones tarsales.

Según el modelo que proponemos, encontramos tres etapas en las que la apoptosis se activa y contribuye a la morfogénesis de la futura articulación. Así, la activación de la apoptosis (Fase 1) precede la activación de la GTPasa Rho1, que activa a la miosina II permitiendo el inicio del pliegue y la extrusión de las células apoptóticas (Fase 2). Una vez se han eliminado las células, se modela el pliegue (Fase 3), estructura que prefigura la futura unión (Figura D-1).

Fase 1: Activación de la apoptosis

El modelado del pliegue comienza una vez la muerte celular ha sido activada, y culminará tras la eliminación de las células apoptóticas. Las señales que activan el programa apoptótico son orquestadas por las vías de Notch y Dpp (Manjón et al., 2007). La expresión de *rpr-LacZ* precede a la acumulación de *Rho1-GFP* y *RhoGEF2* en las indentaciones del tejido. Además, ya que la expresión de *hid-LacZ* y la presencia de la proteína Hid se observan antes de que sucedan los cambios morfológicos de las células de la futura unión, el conjunto de los datos apoyan la idea de que la apoptosis se activa antes de comenzar la morfogénesis del pliegue.

Fase 2: Inicio del pliegue y extrusión de las células apoptóticas

Altos niveles de la GTPasa Rho1 y de su factor activador RhoGEF2 están presentes durante la formación del pliegue. La falta de Rho1 impide la formación del pliegue y de la articulación adulta, sugiriendo que su

presencia es necesaria para formar la articulación. La poca viabilidad de los clones de células mutantes para RhoGEF2 nos dificulta conocer la función de este gen en la formación de las articulaciones. La expresión de RhoGEF2 en una región mas amplia que la normal impide la formación de las uniones, sugiriendo que la distribución restringida de esta proteína a las uniones podría requerirse para su formación. Esta idea es apoyada por un trabajo reciente en el que se demuestra que la expresión ectópica en el dominio distal de la pata de un inhibidor de Rho1, RhoGAP68A, era capaz de inhibir la constricción apical de las células (Greenberg y Hatini, 2010). Además, de manera similar, la función de Rho1 y RhoGEF2 se requieren para la formación del pliegue del surco ventral del embrión, proceso necesario para la morfogénesis del mesodermo embrionario (Barret et al., 1997; revisado en Sawyer et al., 2009). El conjunto de sus observaciones y las nuestras apoyan la idea de que la falta de función de elementos reguladores de Rho1 produce la pérdida de los pliegues que prefiguran las futuras articulaciones.

La construcción UAS-RBD nos permite identificar las células donde Rho1 se encuentra activa en tejido fijado y en discos cultivados *ex vivo*. Encontramos tres tipos de células con la vía Rho1 activa: las células apoptóticas, antes y después del proceso de *blebbing*, la franja de células distales del pliegue y algunas células proximales del tarso adyacente. Dentro del dominio de expresión de *rpr-LacZ* distinguimos una región donde se acumulan altos niveles de *Rho1-GFP*; sin embargo, ya que no podemos ver *Rho1-GFP* y RBD simultáneamente (al depender ambas de la señal de GFP), pensamos que la acumulación de Rho1 ocurre únicamente en las células donde los niveles de activación de la GTPasa son mayores y por tanto no descartamos que la línea *Rho1-GFP* no nos esté mostrando las células con niveles moderados de Rho1. Para aclarar este aspecto, utilizamos un anticuerpo específico capaz de reconocer Rho1 (DSHB) pero no funcionó correctamente.

Durante la formación del pliegue en las futuras uniones, en las células apoptóticas donde Rho1 está activa, la miosina II no muscular se encuentra activada, específicamente en su estado Sqh1P. En las Películas 2 y 3 observamos que la miosina II está asociada a los cuerpos apoptóticos durante su extrusión en dirección apico-basal. La disminución de la expresión o función de distintos elementos implicados en la activación de la miosina II impide la correcta formación de los pliegues y de las articulaciones adultas. Estos resultados sugieren que la miosina II se requiere en la morfogénesis de las uniones tarsales.

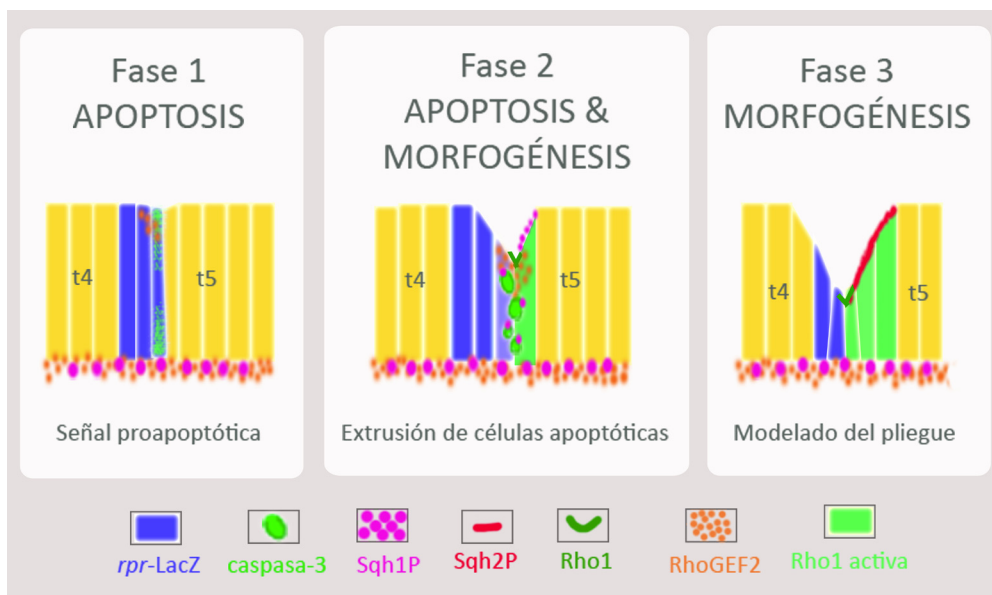


Figura D-1: Modelo de activación de la GTPasa Rho1, la miosina II y la apoptosis durante la formación de las uniones. La apoptosis se activa en la Fase 1. En la segunda fase, tiene lugar el inicio del pliegue así como la extrusión de las células apoptóticas. En la Fase 3 ocurre el modelado del pliegue en la unión presuntiva. Ver texto para conocer los detalles de cada fase.

Fase 3: Modelado del pliegue

Una vez el pliegue está formado y las células apoptóticas se han eliminado, la actividad de Rho1 se observa a mayores niveles en las células más distales formadoras del pliegue, mientras que RhoGEF2 ya no se detecta. Rho1 también se activa en las células proximales del tarso adyacente; así, el dominio de activación de Rho1 es coherente con la localización en el pliegue de la miosina II en su estado Sqh2P. La falta de función de Rho1, de los elementos implicados en activar *sqh* y la expresión ectópica de RhoGEF2 impiden el modelado del pliegue. En resumen, pensamos que la contractilidad mediada por Sqh2P (activado por la cascada anteriormente descrita) favorece el mantenimiento del pliegue, asegurando su posterior diferenciación en la fase de pupa.

2. RELACIÓN ENTRE RHO1, LA MIOSINA II Y LA APOPTOSIS

Activación de la miosina II y de la muerte celular

Nuestros experimentos indican que Rho1 y la activación de la miosina II son necesarios para la correcta activación de la muerte celular en las uniones presuntivas, ya que su falta de función modifica la distribución de la caspasa-3 activada. Las distintas distribuciones de caspasa-3 activada que observamos cuando inactivamos los genes necesarios para la correcta activación de Rho1 y de la miosina II (Fig. R-13G) pueden deberse a las diferentes reducciones de expresión o función causadas por las líneas UAS utilizadas. La falta de función de *Rho1* y *zipper* es capaz de desregular la activación de la apoptosis en comparación con individuos silvestres, mientras que no son suficientes para inducir la formación de un pliegue ectópico. Estas observaciones apoyan que, tal y como proponemos en nuestro modelo, una vez el programa apoptótico es activado (Fase 1), la muerte, Rho1 y RhoGEF2 se localizan en la unión presuntiva para dirigir la correcta eliminación de las células en la unión presuntiva (paso de la Fase 1 a la Fase 2). La ausencia de *Rho1* y *zipper* permite encontrar algunas células que han activado el programa apoptótico fuera de las uniones presuntivas, pero que sin embargo, según nuestro modelo, no se eliminan del epitelio al no disponer de la maquinaria necesaria para activar la miosina II y dirigir su extrusión del epitelio.

El porcentaje de discos que presentaban más caspasa-3 ectópica en el borde Gal4 se refiere a los genotipos que ven más comprometida la regulación de la miosina II, y coinciden con los casos donde aparece con mayor frecuencia un pliegue ectópico en el borde del dominio de expresión del Gal4, mientras que la falta de *Rho1* y *zip* únicamente impide la formación del pliegue. Resulta interesante que diferencias en la activación por fosforilación de Sqh entre células adyacentes en el borde de *ap* (fuera de la unión) son suficientes para inducir una indentación en el epitelio (29% de casos para *ROK RNAi*). Sin embargo, no somos capaces de explicar la distinta localización de caspasa-3 activada en las distintas combinaciones genéticas. Estos datos sugieren que la eliminación de las células apoptóticas junto con la contractilidad producida por la regulación por fosforilación de la miosina II es crucial para modelar un pliegue en el epitelio (paso de la Fase 2 a la Fase 3).

Apoptosis y activación de Sqh1P

La fosforilación de Sqh por ROK dependiente de apoptosis se requiere para el *blebbing* de las células apoptóticas en diversos contextos biológicos (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001; Wickman et al., 2012). Añadimos un aspecto nuevo a este respecto, ya que describimos por primera vez que la activación de Sqh en el contexto apoptótico ocurre específicamente en su estado Sqh1P. Esta activación se requiere para formar el pliegue ya que la expresión de su inhibidor MbsN300 impide su formación. En el disco imaginal de ala, Sqh1P se encuentra asociado a las uniones adherentes, mientras que Sqh2P se localiza en el dominio más apical de las células. La localización de Sqh1P en los pliegues del disco de ala, sugiere un posible papel iniciador de la contractilidad del tejido (Zhang y Ward, 2010). En la línea de estas observaciones, la GTPasa Rho1 podría promover la acumulación local de la miosina II en su estado Sqh1P en las células apoptóticas para su correcta extrusión en dirección apico-basal, pese a que desconocemos si además inicia la posterior contracción del tejido en la fase del modelado del pliegue.

Ya se había observado en células MDCK de mamífero y en la epidermis de los primordios de apéndice de embriones de pollo y ratón, que Rho1 tiene un papel importante en la homeostasis de tejidos monocapa en los que células apoptóticas se eliminan por extrusión. En este proceso, las células apoptóticas forman un anillo de actina y miosina II que permite su extrusión del epitelio. Estas células, antes de ser eliminadas, envían una señal inductora de Rho1 a las células vecinas que permanecerán en el tejido, encargada de aumentar la presencia de actina y miosina II, también necesaria para la extrusión de los cuerpos apoptóticos (Rossenblatt et al., 2001). Pese a que localizamos Sqh1P únicamente en las células apoptóticas, la activación de Rho1 parece restringirse a la zona distal del pliegue durante su formación. En nuestro modelo no tenemos evidencias de que las células induzcan *sqh* en las células adyacentes. Sin embargo, la confrontación de Dpn con el dominio de Rho1 activo sería coherente con una señal inductora proveniente de las células formadoras de la unión para promover la posterior activación de la miosina II (Sqh2P) en el pliegue.

Podríamos postular que la señal inductora de pliegue proveniente de las células formadoras de la unión, que precede a la activación de la caspasa-3, sea o de tipo mecánico o una señal instructora para la formación de cables de actina. Existen diversos trabajos relativos a la función de las forminas, grupo de proteínas estudiados en la mayoría de los organismos modelo (levaduras, hongos, gusanos y moscas), y que están implicados en la regulación de procesos dependientes de actina, tales como la citoquinesis (Wasserman, 1998). En *Drosophila*, el gen *diaphanous* (*dia*) codifica para una formina que está implicada en la activación de la miosina II durante diversos procesos del desarrollo embrionario (Afshar et al., 2000; Mulinari et al., 2008; Sawyer et al., 2009; Levayer et al., 2011). Sin embargo, la disminución de los niveles de *Dia* en el dominio distal de las patas no generó ningún defecto en la formación de las articulaciones tarsales mientras que inhibía el desarrollo de las quetas (datos no mostrados). Así, de manera diferente a lo que ocurre en otros procesos (Mulinari et al., 2008; Levayer et al., 2011; revisado en Sawyer et al., 2009) pese a que los cuerpos apoptóticos son de morfología redondeada (donde la actina se distribuye uniformemente), descartamos que la señal en las células apoptóticas para la correcta activación de la miosina II sea dependiente de *dia*. Posiblemente *dia* tenga un papel importante en etapas posteriores, durante la diferenciación de estructuras cuticulares de los segmentos tarsales, mientras que no muestra estar involucrada en la morfogénesis de las articulaciones.

La cascada apoptótica promueve la activación de Rho1 y la presencia de Sqh1P

Los experimentos en los que se impide la apoptosis al expresar P35 indican que en el citoplasma de las células destinadas a morir hay un aumento de la actividad de la GTPasa Rho1, de los niveles de expresión de *sqh* y de la presencia de Sqh1P. La inhibición de la muerte con P35 inactiva a la caspasa efectora DrICE (Hay et al., 1994; Callus y Vaux, 2007) en las células que reciben la señal para activar apoptosis (detectamos la caspasa-3 en su citoplasma), localizadas en la zona distal de los tarsos. En estas células, la GTPasa Rho1 se encuentra en un estado activado, de manera que promueve la fosforilación de las cadenas reguladoras de la miosina II en su estado específico Sqh1P. Estas observaciones sugieren que, durante la primera fase de la formación de las uniones, probablemente algún elemento de la cascada apoptótica anterior a DrICE tenga un papel crucial en la activación de Rho1 y de miosina II (Sqh1P), en contraste con el papel ya descrito, en otros organismos donde la caspasa-3 es la principal encargada de promover la fosforilación de Sqh (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). En resumen, postulamos que el elemento encargado de activar *Rho1* y *sqh* en las células apoptóticas puede encontrarse desde el nivel más inicial de la cascada apoptótica, a la altura de los genes proapoptóticos RHG, hasta el nivel de Dronc o su proteína adaptadora Apaf-1.

La eliminación de la caspasa iniciadora Dronc puede obtenerse en discos heterocigóticos para dos alelos mutantes del gen *dronc*. En este contexto genético, los pliegues son capaces de formarse, pero presentan pequeñas diferencias morfológicas en las células formadoras de la unión en comparación con las células de los pliegues silvestres. La disminución de Dronc en los tarsos mediada por la línea UAS-*Dronc* RNAi tampoco eliminaba los pliegues completamente (datos no mostrados). Estos resultados pueden deberse a que Dronc no sea totalmente eliminado en ambos contextos genéticos ya que ni los mutantes ni su RNAi

lo eliminen. Estas observaciones argumentan que elijamos en nuestros experimentos un contexto en el que expresamos la proteína P35 donde no se forma la articulación pero sí están activas las vías de Rho1 y de la apoptosis (hasta DrICE), lo que nos permite estudiar si *Rho1* y *sqh* están siendo regulados y activados por la muerte.

Dentro de la hipótesis que proponemos, que un elemento de la vía apoptótica diferente de DrICE active Sqh1P, es importante tener en cuenta algunos aspectos acerca de la respuesta celular en presencia de la proteína P35. Se ha descrito que la expresión de la proteína P35 en células de discos de ala que van a morir (por ejemplo, tras haber sufrido irradiación), causa la formación de células “no muertas” (“undead”) que activan la expresión de *wg* y *dpp* (Hay et al., 1994; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004). En los experimentos en que expresamos P35 en las células del disco imaginal de pata que van a morir, sin embargo, no detectamos ninguna presencia ectópica de *Wg*. Estas observaciones sugieren que estas células que no emiten *Wg* son quizás diferentes a las células no muertas producidas por situaciones de estrés.

Hemos comprobado que la expresión ectópica de la proteína Hid es capaz de inducir acumulaciones locales de Sqh1P, sugiriendo que la cascada apoptótica es suficiente para producir dichas acumulaciones de Sqh1P en las células apoptóticas de las uniones silvestres. Además, de acuerdo con lo observado en el contexto en el que expresamos P35, sugerimos que la activación de DrICE es necesaria para que las células pierdan su anclaje al epitelio y sean posteriormente eliminadas.

La actividad de Rho1 es suficiente para activar la miosina II y el programa apoptótico

Al igual que la cascada apoptótica es capaz de inducir la actividad de Rho1, quisimos saber si la activación de Rho1 es capaz de inducir apoptosis. La expresión de la forma silvestre de Rho1 y una forma constitutivamente activa de Rho1, Rho1^{V14}, promueven la acumulación de la forma Sqh1P de las cadenas reguladoras de la miosina II (MRLC). Estos resultados confirman en primer lugar, que la actividad de Rho1 promueve la fosforilación de Sqh en las uniones. En segundo lugar, únicamente la expresión de la forma Rho^{V14} es suficiente para promover la activación de la muerte celular en el tejido ya que promueve la aparición de un elevado número de células apoptóticas. Aunque estos datos son preliminares, apoyan la idea de que altos niveles de la actividad de Rho1 parecen ser suficientes para dirigir la muerte celular durante la formación de las uniones. Un papel similar de Rho1 como inductor de apoptosis se ha descrito en el disco de ala (Vidal et al., 2006), aunque cabe destacar que en un trabajo anterior, se ha descrito la activación de la apoptosis en el contexto opuesto, ante la expresión del dominante negativo de Rho1, Rho^{N19} (Bloor y Kiehart, 2002). Pese a estas discrepancias, hasta el momento el conjunto de los datos muestra que la apoptosis es suficiente para inducir la activación de la miosina II, y que la elevada actividad de Rho1 promueve la acumulación de la miosina II y la activación de la apoptosis.

Las células que mueren en la unión presuntiva, una vez han activado el programa apoptótico, delaminan desde la región apical hasta la basal, pasa ser finalmente eliminadas por extrusión a través de la lámina basal. La extrusión basal se ha descrito también en el epitelio del disco de ala cuando se generan clones de células mutantes para la vía de Dpp. Estos clones suelen ser extruídos y posteriormente eliminados, mientras que si se inhibe la apoptosis, las células no se extruyen del epitelio para eliminarse, llegando incluso a diferenciar (Gibson y Perrimon, 2005; Shen y Dahmann, 2005). Los autores explican que la extrusión de estas células es una consecuencia del estrés mecánico al que se someten las células de dentro y alrededor del clon. En este modelo, la extrusión sería consecuencia directa de los cambios de forma celular y de organización del citoesqueleto generados por la ausencia de señalización de Dpp. De hecho, mas tarde se describió que Dpp se requería para la organización del citoesqueleto y el mantenimiento de la forma celular en el disco de ala (Widmann y Dahmann, 2009). En el disco de ala, el gen que codifica para la GTPasa Rho1 es una diana de Dpp, encargado de mantener la morfología columnar de las células en la región central del disco de ala, frente a las células cuboidales de las regiones laterales del disco (Widmann y Dahmann, 2009). En la línea de este modelo, sería interesante estudiar si la presencia de Rho1 que describimos en la unión podría estar también regulada por la presencia de altos y bajos niveles

de Dpp, necesarios para la activación de la apoptosis en la formación de las uniones (Manjón et al., 2007), promoviendo la extrusión de las células apoptóticas exclusivamente en el dominio del pliegue frente a las regiones intertarsales. Es curioso resaltar que el dominio de activación de Rho1 coincide con el de genes diana de la vía de EGFR en el disco de pata prepupal, vía se requiere para la especificación y crecimiento de los tarsos (Galindo et al., 2005). La falta de función de esta vía genera fenotipos similares a los observados en la falta de función de elementos encargados de activar la miosina II, de manera que no descartamos que la vía de EGFR esté relacionada con la maquinaria molecular que dirige el modelado de los tarsos.

Trabajos recientes sugieren otra posible actividad de la GTPasa Rho1 y su activador RhoGEF2. En el sistema nervioso central (SNC) de pez cebra, las células apoptóticas son eliminadas siguiendo una clara migración direccional para ser finalmente fagocitadas por los macrófagos. En la migración de estas células apoptóticas, la GTPasa Rac (perteneciente a la subfamilia de pequeñas GTPasas, como Rho1) tiene un papel crucial y depende de la función de *elmo-1*, necesario para la correcta fagocitosis de las células apoptóticas. Se postula en el trabajo que *elmo-1* sería activado por las moléculas de tipo fosfatidilserina (BAI1), características de la membrana de los cuerpos apoptóticos, y sería el encargado de producir un factor de intercambio de nucleótidos de guanina o GEF (Park et al., 2007). Este GEF activaría a Rac en la correcta formación de la copa fagocítica de los fagocitos (van Ham et al., 2012). De manera análoga, en las uniones tarsales, RhoGEF2 podría contribuir a la eliminación por extrusión basal de las células apoptóticas. Hemos observado que, aparte de su acumulación en las células que inician la constricción apical y en la formación del pliegue, RhoGEF2 se acumula también en la base de las células del epitelio del disco (junto con la miosina II). Ya que las células son eliminadas por extrusión basal, no descartamos que la activación de Rho1 en la morfogénesis de las uniones pudiese estar mediando la correcta eliminación de las células apoptóticas, de manera similar al proceso descrito en el SNC de pez cebra (van Ham et al., 2012).

En el proceso que estudiamos, los experimentos de expresión ectópica de Rho1 y Rho1^{V14} muestran que el incremento de la expresión o actividad de Rho1 es capaz de promover la acumulación de Sqh1P en las células. De manera similar al proceso del cierre dorsal del embrión, donde se ha descrito que Rho1 activa la muerte celular vía JNK (Harden, 2002), hemos discutido antes que la activación de Rho1^{V14} es capaz de activar de manera ectópica la apoptosis en las células del disco de pata. Se sabe que la tensión mecánica es capaz de inducir muerte dependiente de JNK en muchos contextos biológicos, como el cierre dorsal del embrión (Harden, 2002; Mulyil et al., 2011) o el cierre del tórax de la mosca adulta (Martin-Blanco et al., 2000). En las uniones tarsales, JNK se expresa en respuesta a diferencias en la actividad de Dpp (Manjón et al., 2007), indicando que estas células posiblemente posean características promovidas por la actividad de esta vía, tales como un incremento en la tensión mecánica de sus membranas celulares o una posible diferencia en la adhesividad de las células promovida por Dpp (Glise y Noselli, 1997; Martin-Blanco et al., 2000; Fernandez et al., 2007). Así, no descartamos que JNK pudiese estar implicada en este proceso. El conjunto de nuestros datos, pese a ser preliminares ya que hemos analizado la activación de caspasa-3 únicamente, apoyan la idea de que Rho1 y Sqh puedan contribuir mediante la activación de JNK a los procesos de tensión y generación de fuerzas contráctiles y a la eliminación de las células apoptóticas, permitiendo así el posterior modelado del pliegue que prefigura la articulación tarsal. Para confirmar la hipótesis de que la activación de Rho1 promueve la vía JNK en las uniones, al igual que en el cierre dorsal del embrión, habría que confirmar que la vía JNK se activa en un contexto Rho1^{V14}.

No descartamos otras posibilidades diferentes en cuanto a la regulación de Rho1 sobre la vía JNK en las uniones, ya que se han propuesto diferentes mecanismos donde se requiere la relación de la vía JNK y Rho1 en el desarrollo de otros órganos de la mosca. En el disco de ala, por ejemplo, se ha propuesto que las proteínas de polaridad Fz y Dsh activan separadamente a JNK y Rho1 (Fanto et al., 2000), mientras que en el cierre dorsal del embrión, se propone a Rho1 como un elemento inductor de JNK en este proceso (Agnes y Noselli, 1999).

En resumen, las vías de señalización encargadas de promover la muerte celular en las uniones tarsales podrían estar dirigiendo las características mecánicas necesarias para eliminar células y viceversa, permitiendo el correcto modelado del pliegue en la unión presuntiva. Recientemente se ha propuesto

en el cierre dorsal del embrión que tanto la apoptosis como la miosina II son necesarias para dirigir este proceso, ya que ambos se requieren para ejercer la fuerza molecular en el tejido encargada de llevar a cabo este movimiento morfogénico (Mulyil et al., 2011; Teng y Toyama, 2011).

3. *zfh-2*: NUEVAS FUNCIONES EN LA FORMACION DE LAS UNIONES

Se ha demostrado que la vía de N es necesaria y suficiente para la formación de las uniones entre segmentos del disco de pata (Bishop et al., 1999; de Celis et al., 1998; Rauskolb y Irvine, 1999), y previamente se han descrito diversos genes que median esta función (Bishop et al. 1999; de Celis et al., 1998; Rauskolb y Irvine, 1999; Kerber et al., 2001; de Celis Ibeas y Bray, 2003; Galindo et al., 2005; Shirai et al., 2007; Pueyo y Couso, 2011). En esta parte de la tesis discutimos la función de otro gen diana, *zfh-2*, requerido en las uniones tarsales (Manjón, 2007) (resumido en la Figura D-2).

Zfh2 se expresa en el dominio distal de los futuros segmentos, al igual que otros genes diana de N, pero se requiere únicamente para la formación de las uniones distales. En este aspecto se asemeja al gen *defective proventriculuous (dve)*, que se expresa distalmente a todas las uniones, pero cuyo fenotipo de falta de función (que da lugar a la formación de uniones ectópicas) solo afecta a los tarsos (Ciechanska et al., 2007; Shirai et al., 2007). En relación a este aspecto, pensamos que sería interesante estudiar si existe una posible relación entre *dve* y *zfh-2*. Por otra parte, conocíamos que la vía de N es necesaria para activar *zfh-2* en las uniones distales (Manjón, 2007), pero se ignoraba la relación genética de *zfh-2* con otros genes moduladores de la vía de Notch. Nuestros resultados indican que la ausencia de *dAP-2* en el disco de pata, otro gen diana de Notch requerido para la formación de las articulaciones, provoca la ausencia de pliegues y la ausencia de la proteína *Zfh-2*. Sin embargo, la falta de función de *zfh-2* no afecta a la transcripción de *dAP-2*. Por tanto, Notch es probable que sea capaz de inducir *zfh-2* de forma indirecta, mediante *dAP-2*, aunque no se excluye que pueda hacerlo también, redundantemente, de forma directa.

Los genes de polaridad planar, como *pk* y *dsh*, inhiben proximalmente la actividad de N en cada segmento tarsal, y en mutantes para *dsh*, N se activa ectópicamente en zonas proximales a las uniones en los tarsos (Bishop et al., 1999). En mutantes *pk sple* la presencia de bandas duplicadas de *Zfh-2* dentro de cada tarso apoya esta idea. Observamos, sin embargo, que en estos discos la proteína *Zfh-2* no se expresa ectópicamente en los segmentos más proximales del disco de pata. Similarmente, los fenotipos que producen las mutaciones *pk sple* o *dsh* son exclusivos de la zona tarsal. Estos resultados apoyan la idea de que los genes de polaridad planar ejercen una actividad represora sobre N, y por tanto sobre *zfh-2*, en los dominios proximales de los tarsos mientras que no lo hacen en los segmentos proximales del disco de pata.

La expresión de *zfh-2* se requiere para la expresión de los genes diana de N, como *bib* y *E(spl)*, únicamente en las articulaciones distales. Además, observamos que la falta de función de *zfh-2* afecta a la expresión de *dpn*, un gen de expresión exclusivamente tarsal (Mirth y Akam, 2002). Curiosamente, la sobreexpresión de *zfh-2* es igualmente capaz de inhibir la expresión de *bib* y *E(spl)*, aunque desconocemos su efecto sobre *dpn* en este contexto genético. Teniendo en cuenta que *zfh-2* regula la expresión de uno de los ligandos de N, *Serrate* (Manjón, 2007) pensamos que de manera similar al mecanismo propuesto para *dAP-2* (Kerber et al., 2001) y *dve* (Ciechanska et al., 2007), *zfh-2* podría estar mediando la actividad de genes diana de Notch en su dominio de expresión mediando entre la activación de N tras la unión a su ligando, tal vez siendo *dpn* uno de los elementos mediadores de la función tarsal de *zfh-2*.

Recientemente se ha publicado que el gen policistrónico *tarsal-less (tal)* codifica para unos péptidos capaces de señalizar en el desarrollo embrionario y el desarrollo prepupal de los tarsos de la pata (Galindo et al., 2007; Pueyo y Couso, 2011). Los péptidos *Tal* aseguran la activación de N en la región distal de los tarsos, y se requieren para activar al factor de transcripción *shavenbaby (svb)*, que regula y es regulado por N. Pensamos que estudiar la relación entre *zfh-2* y *tal* sería interesante, ya que ambos ejercen su función exclusivamente en los tarsos.

zfh-2 y crecimiento

La actividad de N se requiere de forma no autónoma celular para el crecimiento de los segmentos de la pata (Hao et al. 2003; de Celis Ibeas y Bray, 2003; Zeidler et al. 2000; Kerber et al. 2001; Monge et al., 2001; Ciechanska et al., 2007; Greenberg y Hatini, 2009; Greenberg y Hatini, 2010; Pueyo y Couso, 2011). Se ha descrito igualmente que *dAP-2* se requiere de manera autónoma celular para la formación de los tarsos, y de manera no-autónomo celular para el crecimiento de los segmentos, tanto en la antena como en la pata (Kerber et al., 2001; Monge et al., 2001; Ahn et al., 2011). Ya que la expresión de *zfh-2* esta controlada por *dAP-2*, *zfh-2* podría ser un intermediario, no solo definiendo la estructura de la articulación sino también mediando su crecimiento. Hemos descrito que tanto la disminución como el incremento de los niveles de Zfh-2 producen la ausencia de articulaciones entre los tarsos y defectos en el crecimiento de éstos. De nuevo, este requerimiento demuestra una función similar a la descrita para genes como *dAP-2*, donde su sobreexpresión resulta en tarsos con defectos en crecimiento y ausencia de uniones (Monge et al., 2001).

La reducción de niveles de Zfh-2 durante todo el desarrollo afecta principalmente al crecimiento del tarso t1, así como al tamaño de los tarsos t2-t5. *zfh-2* tiene un patrón de expresión muy dinámico, pasando de expresarse en el dominio distal de la pata en etapas larvarias a detectarse restringido a las articulaciones en la fase de pupa. Ya que la unión tibia-tarso t1 delimita el dominio de expresión de *Dll*, cuyo dominio de expresión es similar al patrón temprano de *zfh-2*, pensamos que tal vez la ausencia de Zfh-2 durante las fases larvarias causa este fenotipo, mientras que la ausencia más tardía de Zfh-2 en la región de las uniones provoca la disminución de tamaño observada en los tarsos t2-t5. Se ha descrito la función de *lines* en la distalización del disco de pata, donde antagoniza la función de *bowl* (específico de la región proximal de la pata) promoviendo la expresión de *bab*, *ap* y *bar* en los tarsos. Además, la función de *lines* y *bowl* se requiere para el mantenimiento de DI en las células de las uniones distales, favoreciendo que así que DI intervenga en el crecimiento de los tarsos (Greenberg y Hatini, 2009). Ya que *lines* afecta el crecimiento en exclusiva de los tarsos, no descartamos que pueda tener alguna relación con *zfh-2* en este proceso.

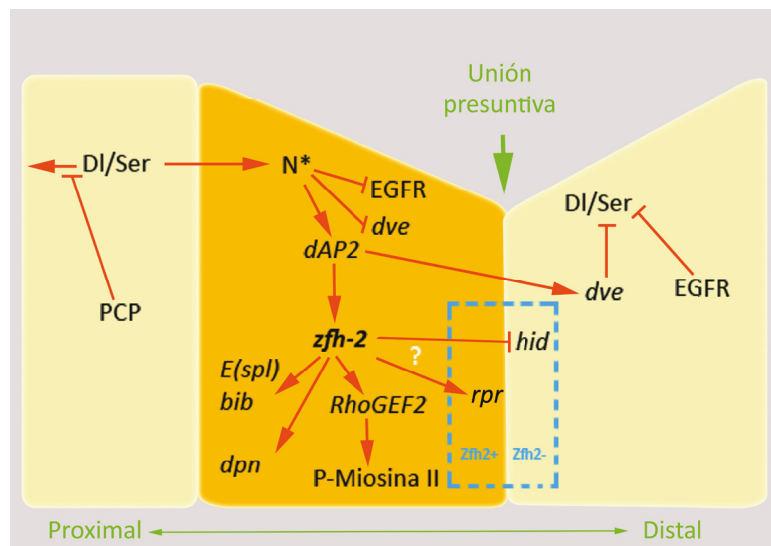


Figura D-2: Modelo de regulación de *zfh-2* en la formación de las uniones. Esquema basado en nuestros datos y en estudios previamente publicados. El control de *zfh-2* sobre RhoGEF2 se refiere fundamentalmente a la base del epitelio. Proponemos que la muerte celular ocurre en regiones donde células con Zfh-2 (+) se enfrentan a células sin Zfh-2 (-), basándonos en los experimentos de expresión ectópica de *zfh-2* realizados con la línea *hh-Gal4*. La regulación de *zfh-2* y la apoptosis posiblemente ocurra de manera directa regulando la actividad de *hid*, pese a las discrepancias descritas en diversos contextos genéticos para la línea indicadora *rpr-LacZ* (representado como “?” en el esquema).

***zfh-2* y muerte celular**

La muerte celular es una de las principales características de la formación de las uniones tarsales. Con el objetivo de definir mejor la activación de la muerte celular en los tarsos, quisimos conocer la localización de la proteína *Zfh-2* con respecto al gen proapoptótico *hid*. *zfh-2* se expresa en niveles más bajos en las células que expresan *hid-LacZ* y a niveles algo mayores en las células adyacentes proximalmente. Resultados similares habían sido descritos respecto a la expresión de *zfh-2* y *rpr-LacZ* (Manjón, 2007).

Nuestros experimentos de falta de función de *zfh-2* muestran resultados sorprendentes con respecto a la expresión de *hid*. Cuando los niveles de *Zfh2* se reducen en el dominio de *ap* o *hh*, la expresión de *rpr-LacZ* disminuye (Manjón, 2007 y nuestros resultados), mientras que la expresión de *hid* incrementa en muchas de las células entre las uniones.

Resulta extraño pensar que *rpr* y *hid* puedan estar diferentemente regulados por *zfh-2*. La expresión de *rpr* en ausencia de *Zfh-2* se deduce de la expresión del inserto *rpr-LacZ*. La expresión de éste coincide, en el individuo silvestre, con la de *hid* y con las células que expresan caspasa-3 activada y con Tunel (Manjón et al., 2007; Manjón, 2007 y esta Tesis). Por lo que parece, esta construcción reproduce fielmente el dominio de las células que van a entrar en apoptosis. Una explicación de la divergente expresión de *hid* y *rpr-LacZ* en ausencia de *Zfh-2* sería que la construcción de *rpr-LacZ* no reproduce el patrón de expresión de *rpr* en las uniones tarsales, pese a que sí lo haga en el embrión (Lohmann et al., 2002; Steller y Grether, 1994); es decir, que *rpr* no se expresara en las uniones y que el patrón de *rpr-LacZ* simplemente reflejara una respuesta correcta a la activación de la cascada apoptótica en el individuo silvestre, pero no en ausencia de *Zfh-2*. Ante la falta de anticuerpos contra la proteína *Rpr*, hemos intentado detectar la transcripción de *rpr* en las uniones presuntivas mediante hibridación *in situ*, y no hemos sido capaces de detectar señal en los discos de pata, mientras que sí la detectamos en la región cefálica de los embriones (Figura D-3)(Lohmann et al., 2002; Kolaghar et al., 2011).

Recientemente se ha descrito el papel de un bucle de retroalimentación positiva en la señalización apoptótica (Shlevkov y Morata, 2011). En este mecanismo se propone que las señales que inducen a *hid*, activan a *rpr*, y viceversa, de la misma manera que si falta *hid*, falta *rpr*, y viceversa. Siguiendo este modelo, otra explicación de que no detectemos la expresión en los discos de pata, sin embargo, es que los niveles de *rpr* sean bajos y difíciles de detectar por hibridación *in situ*. Para ayudar a aclarar la discrepancia de las respuestas de *rpr* y *hid* ante la falta de función de *zfh-2*, se podrían usar construcciones indicadoras de las diferentes regiones reguladoras de *rpr* (HRE)(Zhai et al., 2012). Podríamos postular acerca de la presencia de elementos reguladores modulables por *zfh-2* en la secuencia de *rpr* y *hid*, lo cual ayudaría también a entender las discrepancias que describimos.

La falta de *Zfh-2* y la consecuente elevada presencia de *Hid* se corresponde con un aumento de células con caspasa-3 activada en las uniones presuntivas y fuera de éstas, sugiriendo que la muerte está activada de manera ectópica en las células desprovistas de *Zfh-2*. Se ha descrito que las células destinadas a morir son las que expresan *rpr* y *grim*, mientras que, en el desarrollo del ojo de *Drosophila*, se ha explicado que el amplio número de células que expresan *hid* son viables gracias a la actividad de la vía Ras/MAPK, encargada de evitar la activación final de la apoptosis mediante mecanismos de modificación postraduccionales de la proteína *Hid* (Bergmann et al., 1998). Pudiera ser que las células que expresan *hid* ante la falta de *Zfh-2* en el disco de pata no lleguen a activar la caspasa-3 por este motivo. En el disco de pata prepupal, la MAPK es activada en respuesta a la vía EGFR en la región proximal de los tarsos desde el tercer estadio larvario tardío (Galindo et al., 2005). Ya que en discos donde *Zfh-2* está ausente, la presencia de *Hid* siempre era mayor que la de caspasa-3 activada, no descartamos que, en la línea de lo descrito en el ojo de *Drosophila*, *Hid* requiera de más elementos como MAPK para promover una muerte celular efectiva en el disco de pata.

Los experimentos de ganancia de función de *zfh-2* muestran actividad ectópica de *rpr-LacZ* y un aumento de caspasa-3 activada en los límites del dominio *ap-Gal4*. En el mismo contexto genético *hid-LacZ* no

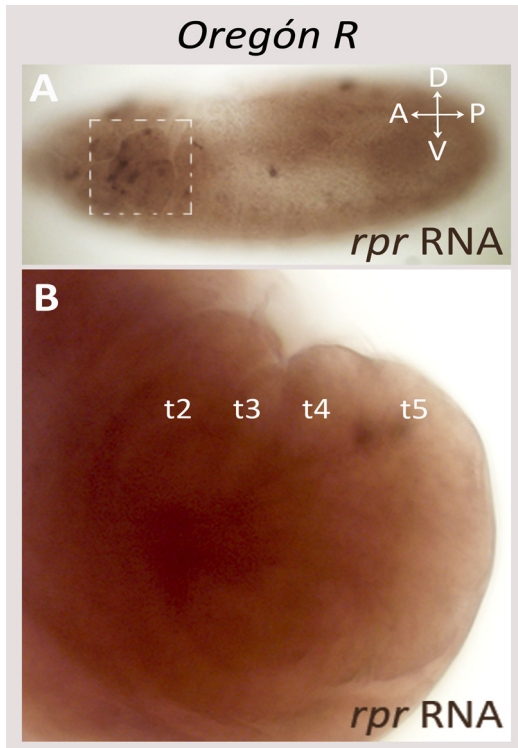


Figura D-3: Ausencia de señal de *rpr* en el disco de pata. En comparación con la activación transcripcional del gen *rpr* en la región cefálica del embrión (indicado por el recuadro en A), la transcripción de *rpr* no se detecta en las uniones entre los tarsos del disco de pata (B).

disminuye claramente, sugiriendo que al menos *rpr* y *hid* no son regulados por *zfh-2* de manera opuesta. Las imágenes adquiridas en tiempo real donde expresamos altos niveles de *Zfh-2* muestran la presencia de células apoptóticas en la región más distal del dominio Gal4 (en la región proximal de *ap* coincide con la unión entre los tarsos t3 y t4, donde también se detecta muerte, por lo que es difícil establecer diferencias entre la caspasa ectópica y la silvestre). Estas células se dirigen hacia la base del epitelio mientras que en el resto del dominio no se activa la muerte celular.

En base a la expresión ectópica de los genes proapoptóticos provocada ante un incremento de los niveles de *Zfh-2*, el conjunto de nuestros resultados apoyan la idea de que la muerte celular se induce en regiones donde se enfrentan células con *Zfh-2* frente a células sin *Zfh-2*, siendo posiblemente una regulación directa la de *Zfh-2* sobre *hid*.

***zfh-2* en el eje PD: algunos aspectos evolutivos**

Las uniones proximales y distales son diferentes a nivel morfológico, génico y evolutivo (Hao et al., 2003; Mirth y Akam, 2002; Rauskolb y Irvine, 1999; Casares y Mann, 2001). En el caso de *zfh-2*, cuyo dominio de expresión se restringe a las uniones proximales y distales tras las fases larvarias, su función parece ser necesaria únicamente para la formación de las uniones distales. En el caso del gen *dAP-2*, que se expresa en todas las futuras uniones de

pata, su regulación está mediada por múltiples “enhancers”, donde cada uno de éstos es responsable de la expresión de *dAP-2* en distintos territorios específicos dentro del disco de pata. En la región proximal del disco, *hth*, *exd* y la proteína homeótica *Antp* se unen a la región específica del enhancer que dirige la expresión de *dAP-2* de la coxa, trocánter y parte del fémur (Ahn et al., 2011). Sin embargo, otros elementos deberán unirse a los enhancers específicos que dirigen la expresión de *dAP-2* en la región distal de la pata. Éstas y otras diferencias apoyan la idea de que, desde un punto de vista evolutivo, el origen y los mecanismos moleculares que rigen en desarrollo de las uniones distales y proximales son independientes (Casares y Mann, 2001).

Existen evidencias que apoyan que *zfh-2* está conservado a lo largo de la evolución de los artrópodos. La falta de función del gen homólogo de *zfh-2* en *Tribolium castaneum* causa dos tipos de fenotipos: la desaparición de las uniones entre segmentos de la pata (fémur y tibia-tarsos pierden su articulación) y alteraciones en el crecimiento de las estructuras distales de la pata (Kittelman et al., 2009). Estos fenotipos son similares a los que describimos ante la falta de función de *zfh-2* en la pata. Es tentador especular acerca de la conservación de la función de *zfh-2* para el desarrollo específico de las uniones distales.

***zfh-2* y morfogénesis**

Nuestros resultados sugieren que *zfh-2* se requiere para la activación de la miosina II no muscular en la morfogénesis de las uniones distales. Hemos descrito que el activador de la actividad de Rho1, RhoGEF2, disminuye considerablemente ante bajos niveles de *zfh-2*. Recientemente se ha descrito la expresión restringida de RhoGEF2 en las uniones presuntivas de los tarsos, en un dominio aparentemente similar al ocupado por *zfh-2* (Greenberg y Hatini, 2010). Estos resultados sugieren que la función de *zfh-2* en la morfogénesis de las uniones distales podría estar mediada por la actividad contráctil de la miosina II. Así,

ante la falta de función de *zfh-2* los pliegues desaparecen. Hemos descrito la aparición de una indentación ectópica en el epitelio del disco de pata cuando inducimos altos niveles de *Zfh-2* en el compartimento posterior del disco. Sin embargo, en discos de pata donde *zfh-2* se expresa en el dominio *ap-Gal4*, el pliegue de la unión presuntiva entre los tarsos t4 y t5 rara vez se forma. En un trabajo reciente dirigido por E. Wieschaus (Martin et al., 2009), definen la función de los factores de transcripción Twist y Snail en la modulación de las contracciones pulsadas de la miosina II medial durante la formación del surco ventral del embrión. De manera similar, en nuestro modelo *zfh-2* sería un factor de transcripción capaz de modular la contractilidad mecánica de estas moléculas durante la morfogénesis. Postulamos que esta regulación podría estar mediada por Rho1, debido al efecto descrito en la distribución de RhoGEF2 ante la falta de función de *zfh-2*.

De nuevo, el conjunto de estos datos apoyan la idea de que los procesos necesarios para la formación de las uniones presuntivas podrían precisar la confrontación de células con *Zfh-2* frente a células sin *Zfh-2*. Así, tanto su ausencia como su presencia en exceso, son capaces de alterar los mecanismos que llevan a la morfogénesis de los tarsos en varios aspectos: regulación génica (vía de N y genes proapoptóticos), control del tamaño (efectos en el crecimiento), y morfología tisular (formación del pliegue). Sin embargo, la activación de *zfh-2* no permite obtener articulaciones completas ni la formación de un pliegue completo en algunos casos. Esto puede sugerir la necesidad de mecanismos adicionales que pueden estar coordinando entre muchos procesos, la contractilidad de la miosina II dependiente de la actividad de Rho1 y la cascada apoptótica, tal y como discutimos en la primera sección de este apartado. De hecho, desconocemos si *zfh-2* tiene alguna función en la regulación de los niveles de actividad de Rho1. Así, podríamos pensar que *zfh-2* esté modulando la actividad de Rho1 y de la muerte en la morfogénesis de las uniones.

Como conclusión de este trabajo pensamos que la formación de los tarsos es un modelo interesante para estudiar cómo una cascada de regulación génica controla diversos procesos relacionados con el papel de la apoptosis y la actividad de los motores celulares en el modelado del epitelio.

CONCLUSIONES

1. La acumulación de la GTPasa Rho1 y de su factor activador RhoGEF2 tiene lugar en la región donde se va a formar la articulación de los tarsos de *Drosophila*. Una vez se ha formado el pliegue, Rho1 permanece y RhoGEF2 no se detecta.
2. Rho1 se encuentra activa en tres tipos de células: 1º) en las células apoptóticas, antes y después del proceso de *blebbing*; 2º) en la franja distal de las células formadoras del pliegue, y 3º) en las células del dominio proximal del tarso adyacente que no forman parte del pliegue. Una vez el pliegue se ha formado, la activación de Rho1 se restringe a las células distales que forman el pliegue y al dominio proximal del tarso adyacente.
3. La miosina II no muscular se acumula localmente y se activa en su estado monofosforilado en las células apoptóticas que se extruyen del epitelio en dirección apico-basal durante la formación de la articulación. Una vez el pliegue se ha formado, la miosina II se activa en su estado difosforilado en las células del pliegue.
4. La función de Rho1, de su factor activador RhoGEF2 y de los elementos encargados de activar la miosina II no muscular son necesarios para formar las uniones entre los tarsos. Su falta de función impide la formación del pliegue en las uniones presuntivas del epitelio del disco y la morfogénesis de la articulación adulta. Rho1 y la maquinaria encargada de activar la miosina II también son necesarias para la correcta activación de la muerte celular en las uniones presuntivas, promoviendo la formación del pliegue durante la morfogénesis de las articulaciones.
5. La inducción de muerte por *hid* es suficiente para producir acumulaciones locales de miosina II en su estado monofosforilado tal y como se observan en las células apoptóticas del individuo silvestre.
6. Un aumento en la presencia de Rho1 promueve la fosforilación de Sqh en su estado monofosforilado. Sin embargo, únicamente los altos niveles de la actividad de Rho1 inducen apoptosis.
7. *zfh-2* afecta al crecimiento y a la formación de las uniones en los segmentos distales de la pata, posiblemente sirviendo de intermediario entre Notch y genes diana de esta vía como *E(spl)*, *bib* y *dpn*.
8. *zfh-2* parece reprimir la muerte celular en los tarsos ya que una disminución en su expresión desencadena un incremento en la expresión del gen proapoptótico *hid*.
9. Tanto la disminución como el incremento en los niveles de *zfh-2* impiden el desarrollo de las articulaciones y la correcta activación de la miosina II.
10. *zfh-2* podría ejercer un papel crucial en la unión entre la vía de señalización de Notch y la miosina II, posiblemente mediado por Rho1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shaar, M. y Mann, R. S. (1998) 'Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development', *Development* 125(19): 3821-30.
- Adachi-Yamada, T. (2002) 'Puckered-GAL4 driving in JNK-active cells', *Genesis* 34(1-2): 19-22.
- Adachi-Yamada, T., Harumoto, T., Sakurai, K., Ueda, R., Saigo, K., O'Connor, M. B. y Nakato, H. (2005) 'Wing-to-Leg homeosis by spineless causes apoptosis regulated by Fish-lips, a novel leucine-rich repeat transmembrane protein', *Mol Cell Biol* 25(8): 3140-50.
- Afshar, K., Stuart, B. y Wasserman, S. A. (2000) 'Functional analysis of the *Drosophila* diaphanous FH protein in early embryonic development', *Development* 127(9): 1887-97.
- Agnes, F. y Noselli, S. (1999) '[Dorsal closure in *Drosophila*. A genetic model for wound healing?]', *C R Acad Sci III* 322(1): 5-13.
- Ahn, Y., J. Zou, et al. (2011). "Segment-specific regulation of the *Drosophila* AP-2 gene during leg y antennal development." *Dev Biol* **355**(2): 336-348.
- Baehrecke, E. H. (2002) 'How death shapes life during development', *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10): 779-87.
- Aldaz, S., Escudero, L. M. y Freeman, M. (2010) 'Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32): 14217-22.
- Barrett, K., Leptin, M. y Settleman, J. (1997) 'The Rho GTPase y a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation', *Cell* 91(7): 905-15.
- Basler, K. y Struhl, G. (1994) 'Compartment boundaries y the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein', *Nature* 368(6468): 208-14.
- Bate, M. y Arias, A. M. (1991) 'The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*', *Development* 112(3): 755-61.
- Bergmann, A., Agapite, J. y Steller, H. (1998) 'Mechanisms y control of programmed cell death in invertebrates', *Oncogene* 17(25): 3215-23.
- Bier, E. (2005) '*Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics', *Nat Rev Genet* 6(1): 9-23.
- Bishop, S. A., Klein, T., Arias, A. M. y Couso, J. P. (1999) 'Composite signalling from Serrate y Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch', *Development* 126(13): 2993-3003.
- Blair, S. S. (1995) 'Compartments y appendage development in *Drosophila*', *Bioessays* 17(4): 299-309.
- Bloor, J. W. y Kiehart, D. P. (2002) '*Drosophila* RhoA regulates the cytoskeleton y cell-cell adhesion in the developing epidermis', *Development* 129(13): 3173-83.

- Brand, A. H. y Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates y generating dominant phenotypes', *Development* 118(2): 401-15.
- Brodu, V. y Casanova, J. (2006) 'The RhoGAP crossveinless-c links trachealess y EGFR signaling to cell shape remodeling in Drosophila tracheal invagination', *Genes Dev* 20(13): 1817-28.
- Brook, W. J. y Cohen, S. M. (1996) 'Antagonistic interactions between wingless y decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the Drosophila Leg', *Science* 273(5280): 1373-7.
- Bryant, P. J. (1975) 'Pattern formation in the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster: fate map, regeneration y duplication', *J Exp Zool* 193(1): 49-77.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G. (1996) 'Visualization of gene expression in living adult Drosophila', *Science* 274(5285): 252-5.
- Callus, B. A. y Vaux, D. L. (2007) 'Caspase inhibitors: viral, cellular y chemical', *Cell Death Differ* 14(1): 73-8.
- Campbell, G. (2002) 'Distalization of the Drosophila leg by graded EGF-receptor activity', *Nature* 418(6899): 781-5.
- Capdevila, J. y Guerrero, I. (1994) 'Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications y growth alterations in Drosophila wings', *The EMBO journal* 13(19): 4459-68.
- Casares, F. y Mann, R. S. (2001) 'The ground state of the ventral appendage in Drosophila', *Science* 293(5534): 1477-80.
- Ciechanska, E., Dansereau, D. A., Svendsen, P. C., Heslip, T. R. y Brook, W. J. (2007) 'dAP-2 y defective proventriculus regulate Serrate y Delta expression in the tarsus of Drosophila melanogaster', *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 50(8): 693-705.
- Cohen, B., Simcox, A. A. y Cohen, S. M. (1993) 'Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo', *Development* 117(2): 597-608.
- Cohen, B., Wimmer, E. A. y Cohen, S. M. (1991) 'Early development of leg y wing primordia in the Drosophila embryo', *Mech Dev* 33(3): 229-40.
- Cohen, S. M. (1990) 'Specification of limb development in the Drosophila embryo by positional cues from segmentation genes', *Nature* 343(6254): 173-7.
- Cohen, S. M. y Jurgens, G. (1989) 'Proximal-distal pattern formation in Drosophila: cell autonomous requirement for Distal-less gene activity in limb development', *The EMBO journal* 8(7): 2045-55.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. y Olson, M. F. (2001) 'Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I', *Nature cell biology* 3(4): 339-45.

- Condic, M. L., Fristrom, D. y Fristrom, J. W. (1991) 'Apical cell shape changes during *Drosophila* imaginal leg disc elongation: a novel morphogenetic mechanism', *Development* 111(1): 23-33.
- Corrigan, D., Walther, R. F., Rodriguez, L., Fichelson, P. y Pichaud, F. (2007) 'Hedgehog signaling is a principal inducer of Myosin-II-driven cell ingression in *Drosophila* epithelia', *Dev Cell* 13(5): 730-42.
- Dawes-Hoang, R. E., Parmar, K. M., Christiansen, A. E., Phelps, C. B., Brand, A. H. y Wieschaus, E. F. (2005) 'folded gastrulation, cell shape change y the control of myosin localization', *Development* 132(18): 4165-78.
- de Celis Ibeas, J. M. y Bray, S. J. (2003) 'Bowl is required downstream of Notch for elaboration of distal limb patterning', *Development* 130(24): 5943-52.
- de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. y Bray, S. J. (1998) 'Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg', *Development* 125(23): 4617-26.
- Diaz-Benjumea, F. J., Cohen, B. y Cohen, S. M. (1994) 'Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs', *Nature* 372(6502): 175-9.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S. et al. (2007) 'A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*', *Nature* 448(7150): 151-6.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y. y Horvitz, H. R. (1991) 'Mechanisms y functions of cell death', *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-98.
- Escudero, L. M., Bischoff, M. y Freeman, M. (2007) 'Myosin II regulates complex cellular arrangement y epithelial architecture in *Drosophila*', *Dev Cell* 13(5): 717-29.
- Estella, C., Rieckhof, G., Calleja, M. y Morata, G. (2003) 'The role of buttonhead y Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*', *Development* 130(24): 5929-41.
- Estella, C., Voutev, R. y Mann, R. S. (2012) 'A dynamic network of morphogens y transcription factors patterns the fly leg', *Curr Top Dev Biol* 98: 173-98.
- Etienne-Manneville, S. y Hall, A. (2002) 'Rho GTPases in cell biology', *Nature* 420(6916): 629-35.
- Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I. y Mlodzik, M. (2000) 'Nuclear signaling by Rac y Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye', *Current biology : CB* 10(16): 979-88.
- Fernandez, B. G., Arias, A. M. y Jacinto, A. (2007) 'Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa y in the epidermis', *Mech Dev* 124(11-12): 884-97.
- Fink, S. L. y Cookson, B. T. (2005) 'Apoptosis, pyroptosis, y necrosis: mechanistic description of dead y dying eukaryotic cells', *Infect Immun* 73(4): 1907-16.
- Fortini, M. E., Lai, Z. C. y Rubin, G. M. (1991) 'The *Drosophila* *zfh-1* y *zfh-2* genes encode

novel proteins containing both zinc-finger y homeodomain motifs', *Mech Dev* 34(2-3): 113-22.

- Fortini, M. E., Z. C. Lai, et al. (1991). "The *Drosophila* *zfh-1* y *zfh-2* genes encode novel proteins containing both zinc-finger y homeodomain motifs." *Mech Dev* 34(2-3): 113-122.
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S. y Hariharan, I. K. (2000) 'A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome', *J Cell Biol* 150(2): F23-30.
- Fox, D. T. y Peifer, M. (2007) 'Abelson kinase (Abl) y RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in *Drosophila*', *Development* 134(3): 567-78.
- Fuchs, Y. y Steller, H. (2011) 'Programmed cell death in animal development y disease', *Cell* 147(4): 742-58.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A. y Couso, J. P. (2005) 'Dynamic EGFR-Ras signalling in *Drosophila* leg development', *Dev Dyn* 233(4): 1496-508.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S. y Couso, J. P. (2002) 'Leg patterning driven by proximal-distal interactions y EGFR signaling', *Science* 297(5579): 256-9.
- Galindo, M. I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A., Couso, J.P. (2007) 'Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family', *PLoS Biol.* 5(5): 1052-62.
- García-Bellido, A. (1975) 'Genetic control of wing disc development in *Drosophila*', *Ciba Found symp* 0: 161-82.
- Gibson, M. C. y Perrimon, N. (2005) 'Extrusion y death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing', *Science* 307(5716): 1785-9.
- Giorgianni, M. W. y Mann, R. S. (2011) 'Establishment of medial fates along the proximodistal axis of the *Drosophila* leg through direct activation of *dachshund* by *Distalless*', *Dev Cell* 20(4): 455-68.
- Glise, B. y Noselli, S. (1997) 'Coupling of Jun amino-terminal kinase y Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis', *Genes Dev* 11(13): 1738-47.
- Gonzalez-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martinez, A. C., Mann, R. S. y Morata, G. (1998) 'Antagonism between extradenticle function y Hedgehog signalling in the developing limb', *Nature* 394(6689): 196-200.
- Gorfinkiel, N. y Blanchard, G. B. (2011) 'Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis', *Curr Opin Cell Biol* 23(5): 531-9.
- Gorfinkiel, N., Schamberg, S. y Blanchard, G. B. (2011) 'Integrative approaches to morphogenesis: lessons from dorsal closure', *Genesis* 49(7): 522-33.
- Goto, S. y Hayashi, S. (1999) 'Proximal to distal cell communication in the *Drosophila* leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning', *Development* 126(15): 3407-13.
- Greenberg, L. y Hatini, V. (2009) 'Essential roles for lines in mediating leg y antennal proximodistal patterning y generating a stable Notch signaling interface at segment borders', *Dev*

Biol 330(1): 93-104.

- Greenberg, L. y Hatini, V. (2010) 'Systematic expression y loss-of-function analysis defines spatially restricted requirements for Drosophila RhoGEFs y RhoGAPs in leg morphogenesis', *Mech Dev* 128(1-2): 5-17.
- Grether, M. E., J. M. Abrams, et al. (1995). "The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death." *Genes Dev* 9(14): 1694-1708.
- Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H. M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H. y Muller, H. A. (2005) 'RhoGEF2 y the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during Drosophila cellularisation', *Development* 132(5): 1009-20.
- Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. y Roote, J. (1999) 'The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in Drosophila imaginal discs', *Genes Dev* 13(17): 2315-27.
- Hacker, U. y Perrimon, N. (1998) 'DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes y controls cell shape changes during gastrulation in Drosophila', *Genes Dev* 12(2): 274-84.
- Hall, A. y Nobes, C. D. (2000) 'Rho GTPases: molecular switches that control the organization y dynamics of the actin cytoskeleton', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 355(1399): 965-70.
- Halsell, S. R., Chu, B. I. y Kiehart, D. P. (2000) 'Genetic analysis demonstrates a direct link between rho signaling y nonmuscle myosin function during Drosophila morphogenesis', *Genetics* 155(3): 1253-65.
- Hao, I., Green, R. B., Dunaevsky, O., Lengyel, J. A. y Rauskolb, C. (2003) 'The odd-skipped family of zinc finger genes promotes Drosophila leg segmentation', *Dev Biol* 263(2): 282-95.
- Harden, N. (2002) 'Signaling pathways directing the movement y fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in Drosophila', *Differentiation* 70(4-5): 181-203.
- Hay, B. A. y Guo, M. (2006) 'Caspase-dependent cell death in Drosophila', *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 623-50.
- Hay, B. A., Huh, J. R. y Guo, M. (2004) 'The genetics of cell death: approaches, insights y opportunities in Drosophila', *Nat Rev Genet* 5(12): 911-22.
- Hay, B. A., Wolff, T. y Rubin, G. M. (1994) 'Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila', *Development* 120(8): 2121-9.
- Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T. et al. (2002) 'GETDB, a database compiling expression patterns y molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps', *Genesis* 34(1-2): 58-61.
- Heilig, J. S., Freeman, M., Lavery, T., Lee, K. J., Campos, A. R., Rubin, G. M. y Steller, H. (1991) 'Isolation y characterization of the disconnected gene of Drosophila melanogaster', *The EMBO journal* 10(4): 809-15.
- Held, L. I., Jr., Duarte, C. M. y Derakhshanian, K. (1986) 'Extra joints y misoriented bristles

on *Drosophila* legs', *Prog Clin Biol Res* 217A: 293-6.

- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. y Schneuwly, S. (1997) 'GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy y development of the *Drosophila* central nervous system', *Cell Tissue Res* 290(1): 1-10.
- Jacobson, M. D. (1997) 'Programmed cell death: a missing link is found', *Trends Cell Biol* 7(12): 467-9.
- Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H. y Thummel, C. S. (2000) 'Asteroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis', *Mol Cell* 5(3): 445-55.
- Jiang, J. y Struhl, G. (1996) 'Complementary y mutually exclusive activities of decapentaplegic y wingless organize axial patterning during *Drosophila* leg development', *Cell* 86(3): 401-9.
- Karess, R. E., Chang, X. J., Edwards, K. A., Kulkarni, S., Aguilera, I. y Kiehart, D. P. (1991) 'The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by spaghetti-squash, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*', *Cell* 65(7): 1177-89.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. y Olsen, G. (1990) 'Molecular y genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*', *Adv Genet* 27: 309-62.
- Kerber, B., Monge, I., Mueller, M., Mitchell, P. J. y Cohen, S. M. (2001) 'The AP-2 transcription factor is required for joint formation y cell survival in *Drosophila* leg development', *Development* 128(8): 1231-8.
- Kiehart, D. P., Galbraith, C. G., Edwards, K. A., Rickoll, W. L. y Montague, R. A. (2000) 'Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*', *J Cell Biol* 149(2): 471-90.
- Kittelmann, M., Schinko, J. B., Winkler, M., Bucher, G., Wimmer, E. A. y Prpic, N. M. (2009) 'Insertional mutagenesis screening identifies the zinc finger homeodomain 2 (*zfh2*) gene as a novel factor required for embryonic leg development in *Tribolium castaneum*', *Dev Genes Evol* 219(8): 399-407.
- Kojima, T. (2004) 'The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis', *Dev Growth Differ* 46(2): 115-29.
- Kolahgar, G., Bardet, P. L., Langton, P. F., Alexandre, C. y Vincent, J. P. (2011) 'Apical deficiency triggers JNK-dependent apoptosis in the embryonic epidermis of *Drosophila*', *Development* 138(14): 3021-31.
- Kolsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G. J., Serrano, L. y Leptin, M. (2007) 'Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions y RhoGEF2', *Science* 315(5810): 384-6.
- Krammer, P. H. (2000) 'CD95's deadly mission in the immune system', *Nature* 407(6805): 789-95.
- Kubota, K., Goto, S., Eto, K. y Hayashi, S. (2000) 'EGF receptor attenuates Dpp signaling y helps to distinguish the wing y leg cell fates in *Drosophila*', *Development* 127(17): 3769-76.

- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. y Flavell, R. A. (1996) 'Decreased apoptosis in the brain y premature lethality in CPP32-deficient mice', *Nature* 384(6607): 368-72.
- Lai, E. C. (2004) 'Notch signaling: control of cell communication y cell fate', *Development* 131(5): 965-73.
- Lai, Z. C., Fortini, M. E. y Rubin, G. M. (1991) 'The embryonic expression patterns of zfh-1 y zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins', *Mech Dev* 34(2-3): 123-34.
- Lawrence, P. A. y Struhl, G. (1996) 'Morphogens, compartments, y pattern: lessons from drosophila?', *Cell* 85(7): 951-61.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. y Cohen, S. M. (1996) 'Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing', *Nature* 381(6581): 387-93.
- Lecuit, T. y Cohen, S. M. (1997) 'Proximal-distal axis formation in the Drosophila leg', *Nature* 388(6638): 139-45.
- Lee, A. y Treisman, J. E. (2004) 'Excessive Myosin activity in mbs mutants causes photoreceptor movement out of the Drosophila eye disc epithelium', *Mol Biol Cell* 15(7): 3285-95.
- Lee, C. Y., Simon, C. R., Woodard, C. T. y Baehrecke, E. H. (2002) 'Genetic mechanism for the stage- y tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in Drosophila', *Dev Biol* 252(1): 138-48.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A. y Lecuit, T. (2011) 'Spatial regulation of Dia y Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis', *Nature cell biology* 13(5): 529-40.
- Lewis, E. B. (1978) 'A gene complex controlling segmentation in Drosophila', *Nature* 276(5688): 565-70.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. y McGinnis, W. (2002) 'The Drosophila Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper', *Cell* 110(4): 457-66.
- Mandhavan, M. S., H. A. (1977) 'Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs y histoblasts nests during the larval development of Drosophila melanogaster', *Wilhem Roux Arch, devl biol* 183: 269-306.
- Manjón, C. (2007) 'Estudio de los mecanismos implicados en la morfología de las articulaciones distales de la pata de Drosophila', *Tesis Doctoral*.
- Manjón, C., Sanchez-Herrero, E. y Suzanne, M. (2007) 'Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for Drosophila leg morphogenesis', *Nature cell biology* 9(1): 57-63.
- Mann, R. S. y Morata, G. (2000) 'The developmental y molecular biology of genes that

subdivide the body of *Drosophila*', *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 243-71.

- Martin, A. C., Kaschube, M. y Wieschaus, E. F. (2009) 'Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction', *Nature* 457(7228): 495-9.
- Martín, F. A., Herrera, S. C. y Morata, G. (2009) 'Cell competition, growth y size control in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development* 136(22): 3747-56.
- Martín, F. A. y Morata, G. (2006) 'Compartments y the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development* 133(22): 4421-6.
- Martín-Blanco, E. (1998) 'Regulatory control of signal transduction during morphogenesis in *Drosophila*', *Int J Dev Biol* 42(3): 363-8.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. y Martínez-Arias, A. (1998) 'puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*', *Genes Dev* 12(4): 557-70.
- Martín-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. y Garcia-Bellido, A. (2000) 'JNK y decapentaplegic signaling control adhesiveness y cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(14): 7888-93.
- Martínez-Arias, A. y Lawrence, P. A. (1985) 'Parasegments y compartments in the *Drosophila* embryo', *Nature* 313(6004): 639-42.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. y Davis, R. L. (2003) 'Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*', *Science* 302(5651): 1765-8.
- Meier, P., Silke, J., Leivers, S. J. y Evan, G. I. (2000) 'The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1', *The EMBO journal* 19(4): 598-611.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martínez, C. y Torres, M. (1999) 'Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth', *Nature* 402(6760): 425-9.
- Mirth, C. (2005) 'Ecdysteroid control of metamorphosis in the differentiating adult leg structures of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol* 278(1): 163-74.
- Mirth, C. y Akam, M. (2002) 'Joint development in the *Drosophila* leg: cell movements y cell populations', *Dev Biol* 246(2): 391-406.
- Monge, I., Krishnamurthy, R., Sims, D., Hirth, F., Spengler, M., Kammermeier, L., Reichert, H. y Mitchell, P. J. (2001) '*Drosophila* transcription factor AP-2 in proboscis, leg y brain central complex development', *Development* 128(8): 1239-52.
- Morata, G. (2001) 'How *Drosophila* appendages develop', *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 89-97.
- Morata, G. y Ripoll, P. (1975) 'Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate', *Dev Biol* 42(2): 211-21.
- Moreno, E., Basler, K. y Morata, G. (2002) 'Cells compete for decapentaplegic survival

factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development', *Nature* 416(6882): 755-9.

- Mulinari, S., Barmchi, M. P. y Hacker, U. (2008) 'DRhoGEF2 y diaphanous regulate contractile force during segmental groove morphogenesis in the *Drosophila* embryo', *Mol Biol Cell* 19(5): 1883-92.
- Muliyl, S., Krishnakumar, P. y Narasimha, M. (2011) 'Spatial, temporal y molecular hierarchies in the link between death, delamination y dorsal closure', *Development* 138(14): 3043-54.
- Natori, K., Tajiri, R., Furukawa, S. y Kojima, T. (2012) 'Progressive tarsal patterning in the *Drosophila* by temporally dynamic regulation of transcription factor genes', *Dev Biol* 361(2): 450-62.
- Neisch, A. L., Speck, O., Stronach, B. y Fehon, R. G. (2010) 'Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane', *J Cell Biol* 189(2): 311-23.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. y Basler, K. (1996) 'Direct y long-range action of a DPP morphogen gradient', *Cell* 85(3): 357-68.
- Nikolaidou, K. K. y Barrett, K. (2004) 'A Rho GTPase signaling pathway is used reiteratively in epithelial folding y potentially selects the outcome of Rho activation', *Current biology : CB* 14(20): 1822-6.
- Ninov, N., Chiarelli, D. A. y Martin-Blanco, E. (2007) 'Extrinsic y intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis', *Development* 134(2): 367-79.
- Oppenheim, R. W. (1991) 'Cell death during development of the nervous system', *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Panganiban, G. (2000) 'Distal-less function during *Drosophila* appendage y sense organ development', *Dev Dyn* 218(4): 554-62.
- Panganiban, G., Irvine, S. M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L. S., Sherbon, B., Grenier, J. K., Fallon, J. F., Kimble, J., Walker, M. et al. (1997) 'The origin y evolution of animal appendages', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(10): 5162-6.
- Panganiban, G. y Rubenstein, J. L. (2002) 'Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes', *Development* 129(19): 4371-86.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. y Morata, G. (2004) 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling y developmental aberrations in *Drosophila*', *Development* 131(22): 5591-8.
- Park, D., Tosello-Tramont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W. y Ravichandran, K. S. (2007) 'BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module', *Nature* 450(7168): 430-4.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. y Morata, G. (2004) 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling y developmental aberrations in *Drosophila*', *Development* 131(22): 5591-8.

- Polesello, C., Roch, F., Gobert, V., Haenlin, M. y Waltzer, L. (2011) 'Modeling cancers in *Drosophila*', *Prog Mol Biol Transl Sci* 100: 51-82.
- Pouille, P. A., Ahmadi, P., Brunet, A. C. y Farge, E. (2009) 'Mechanical signals trigger Myosin II redistribution y mesoderm invagination in *Drosophila* embryos', *Sci Signal* 2(66): ra16.
- Pueyo, J. I. y Couso, J. P. (2011) 'Tarsal-less peptides control Notch signalling through the Shavenbaby transcription factor', *Dev Biol* 355(2): 183-93.
- Prasad, M., Jang, A. C., Starz-Gaiano, M., Melani, M. y Montell, D. J. (2007) 'A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging', *Nat Protoc* 2(10): 2467-73.
- Rauskolb, C. (2001) 'The establishment of segmentation in the *Drosophila* leg', *Development* 128(22): 4511-21.
- Rauskolb, C. y Irvine, K. D. (1999) 'Notch-mediated segmentation y growth control of the *Drosophila* leg', *Dev Biol* 210(2): 339-50.
- Royou, A., Field, C., Sisson, J. C., Sullivan, W. y Karess, R. (2004) 'Reassessing the role y dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos', *Mol Biol Cell* 15(2): 838-50.
- Rusch, J. y Levine, M. (1996) 'Threshold responses to the dorsal regulatory gradient y the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo', *Curr Opin Genet Dev* 6(4): 416-23.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. y Steller, H. (2004) 'Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK y the Wingless signaling pathways', *Dev Cell* 7(4): 491-501.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. y Morata, G. (1985) 'Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex', *Nature* 313(5998): 108-13.
- Sanson, B. (2001) 'Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation', *EMBO Rep* 2(12): 1083-8.
- Saunders, A. M. y Hubbard, R. C. (1966) 'Studies on pinnipeds. 1. Obstructive emphysema in an elephant seal (*Mirounga angustirostris*)', *Lab Anim Care* 16(3): 217-23.
- Sawyer, J. M., Harrell, J. R., Shemer, G., Sullivan-Brown, J., Roh-Johnson, M. y Goldstein, B. (2009) 'Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis', *Dev Biol* 341(1): 5-19.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. y Breard, J. (2001) 'Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation y apoptotic membrane blebbing', *Nature cell biology* 3(4): 346-52.
- Serrano, N. y O'Farrell, P. H. (1997) 'Limb morphogenesis: connections between patterning y growth', *Current biology : CB* 7(3): R186-95.
- Shearn, A. y Garen, A. (1974) 'Genetic control of imaginal disc development in *Drosophila*',

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71(4): 1393-7.

- Shen, J. y Dahmann, C. (2005) 'Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia', *Science* 307(5716): 1789-90.
- Shi, Y. B. y Ishizuya-Oka, A. (1996) 'Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis y remodeling during metamorphosis', *Curr Top Dev Biol* 32: 205-35.
- Shirai, T., Yorimitsu, T., Kiritooshi, N., Matsuzaki, F. y Nakagoshi, H. (2007) 'Notch signaling relieves the joint-suppressive activity of Defective proventriculus in the *Drosophila* leg', *Dev Biol* 312(1): 147-56.
- Shlevkov, E. y Morata, G. (2011) 'A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*', *Cell Death Differ* 19(3): 451-60.
- Simoes, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombria, J. C. y Jacinto, A. (2006) 'Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis', *Development* 133(21): 4257-67.
- Sonnenfeld, M. J. y Jacobs, J. R. (1995) 'Apoptosis of the midline glia during *Drosophila* embryogenesis: a correlation with axon contact', *Development* 121(2): 569-78.
- St Johnston, D. (2002) 'The art y design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*', *Nat Rev Genet* 3: 176-88.
- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K. et al. (2002) 'The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes', *Genome Res* 12(8): 1294-300.
- Steller, H. y Grether, M. E. (1994) 'Programmed cell death in *Drosophila*', *Neuron* 13(6): 1269-74.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M. y Martin, P. (2005) 'Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration', *J Cell Biol* 168(4): 567-73.
- Sullivan, W., Ashburner, M. y Hawley, R. S. (2000) '*Drosophila* protocols', *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Suzanne, M. y Steller, H. (2009) 'Letting go: modification of cell adhesion during apoptosis', *J Biol* 8(5): 49.
- Symons, M. y Settleman, J. (2000) 'Rho family GTPases: more than simple switches', *Trends Cell Biol* 10(10): 415-9.
- Tabata, T. y Kornberg, T. B. (1994) 'Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs', *Cell* 76(1): 89-102.
- Tajiri, R., Misaki, K., Yonemura, S. y Hayashi, S. (2010) 'Dynamic shape changes of ECM-producing cells drive morphogenesis of ball-and-socket joints in the fly leg', *Development* 137(12): 2055-63.

- Tan, J. L., Ravid, S. y Spudich, J. A. (1992) 'Control of nonmuscle myosins by phosphorylation', *Annu Rev Biochem* 61: 721-59.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. y Tabata, T. (2000) 'Hedgehog creates a gradient of DPP activity in Drosophila wing imaginal discs', *Mol Cell* 5(1): 59-71.
- Teng, X. y Toyama, Y. (2011) 'Apoptotic force: active mechanical function of cell death during morphogenesis', *Dev Growth Differ* 53(2): 269-76.
- Terriente, J., Perea, D., Suzanne, M. y Diaz-Benjumea, F. J. (2008) 'The Drosophila gene *zfh2* is required to establish proximal-distal domains in the wing disc', *Dev Biol* 320(1): 102-12.
- Vachon, G., Cohen, B., Pfeifle, C., McGuffin, M. E., Botas, J. y Cohen, S. M. (1992) 'Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the Drosophila embryo through the target gene *Distal-less*', *Cell* 71(3): 437-50.
- van Ham, T. J., Kokel, D. y Peterson, R. T. (2012) 'Apoptotic Cells Are Cleared by Directional Migration y elmo1- Dependent Macrophage Engulfment', *Current biology : CB* 22(9): 830-6.
- Vega, F. M. y Ridley, A. J. (2008) 'Rho GTPases in cancer cell biology', *FEBS Lett* 582(14): 2093-101.
- Vidal, M., Larson, D. E. y Cagan, R. L. (2006) 'Csk-deficient boundary cells are eliminated from normal Drosophila epithelia by exclusion, migration, y apoptosis', *Dev Cell* 10(1): 33-44.
- Wasserman, S. (1998) 'FH proteins as cytoskeletal organizers', *Trends Cell Biol* 8(3): 111-5.
- Weil, M., Jacobson, M. D. y Raff, M. C. (1997) 'Is programmed cell death required for neural tube closure?', *Current biology : CB* 7(4): 281-4.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. y Steller, H. (1994) 'Genetic control of programmed cell death in Drosophila', *Science* 264(5159): 677-83.
- Whitworth, A. J. y Russell, S. (2003) 'Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the Drosophila wing', *Dev Biol* 254(2): 277-88.
- Wickman, G., Julian, L. y Olson, M. F. (2012) 'How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies', *Cell Death Differ* 19(5): 735-42.
- Widmann, T. J. y Dahmann, C. (2009) 'Wingless signaling y the control of cell shape in Drosophila wing imaginal discs', *Dev Biol* 334(1): 161-73.
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D. y Luo, L. (2001) 'Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton', *Cell* 105(1): 81-91.
- Wu, J. y Cohen, S. M. (1999) 'Proximodistal axis formation in the Drosophila leg: subdivision into proximal y distal domains by Homothorax y *Distal-less*', *Development* 126(1): 109-17.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. y Currie, A. R. (1980) 'Cell death: the significance of apoptosis', *Int Rev Cytol* 68: 251-306.

- Xu, T. y Rubin, G. M. (1993) 'Analysis of genetic mosaics in developing y adult *Drosophila* tissues', *Development* 117(4): 1223-37.
- Yu, S. Y., Yoo, S. J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B. A. y Baker, N. E. (2002) 'A pathway of signals regulating effector y initiator caspases in the developing *Drosophila* eye', *Development* 129(13): 3269-78.
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S. y Kiehart, D. P. (1993) 'Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function', *Genes Dev* 7(1): 29-41.
- Zeidler, M. P., E. A. Bach, et al. (2000). "The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway." *Oncogene* 19(21): 2598-2606.
- Zhai, Z., Ha, N., Papagiannouli, F., Hamacher-Brady, A., Brady, N., Sorge, S., Bezdán, D. y Lohmann, I. (2012) 'Antagonistic regulation of apoptosis y differentiation by the Cut transcription factor represents a tumor-suppressing mechanism in *Drosophila*', *PLoS Genet* 8(3): e1002582.
- Zhang, L. y Ward, R. E. t. (2010) 'Distinct tissue distributions y subcellular localizations of differently phosphorylated forms of the myosin regulatory light chain in *Drosophila*', *Gene Expr Patterns* 11(1-2): 93-104.
- Zuzarte-Luis, V. y Hurlé, J. M. (2005) 'Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb', *Semin Cell Dev Biol* 16(2): 261-9.

ANEXO

Los experimentos de cultivo de discos imaginales de pata *ex vivo* mostrados a lo largo de esta Tesis, están incluidos en el CD adjunto, en formato .avi:

Película 1: *act*-Gal4 UAS-RBD (explicada en la Fig. R-3). Las imágenes fueron tomadas cada 2 min.

Película 2: *zip*-GFP (Fig. R-5). Las imágenes fueron tomadas cada 3 min.

Película 3: *sqh*-GFP (Fig. R-6). Las imágenes fueron tomadas cada 3 min.

Película 4: *ap*-Gal4 UAS-MbsN300 (Fig. R-13). Las imágenes fueron tomadas cada 2 min.

Película 5: *sqh*-GFP, *hh*-Gal4 UAS-P35 (Fig. R-14). Las imágenes fueron tomadas cada 1 min.

Película 6: *hh*-Gal4 UAS-Dcr2 UAS-*zfh*-2 RNAi^{19.3} (Fig. R-26). Las imágenes fueron tomadas cada 3 min.

Película 7: *ap*-Gal4; *tub*-Gal80^{TS}; UAS-*zfh*-2-mcherry (Fig. R-29). Las imágenes fueron tomadas cada 3 min.

AGRADECIMIENTOS

Si acabas de coger esta Tesis y no te interesan los elementos implicados en las vías de señalización que dirigen la muerte celular y el modelado del epitelio en las uniones de los tarsos, estás en el apartado correcto.

Desde que entré en el laboratorio, el apartado de agradecimientos siempre ha levantado revuelo, emoción, intriga, sorpresas y hasta alguna lagrimilla. Mucha gente hasta te dice: “yo ya he pensado en los agradecimientos de mi tesis”... y claro yo en esos momentos siempre pensaba, “pues mal vamos, porque a mi no se me ocurre qué poner”. Por una vez en mi vida, no tenía nada que decir!! Total, que eso no puede ser, así que ahora me enfrento a ello.

Ante todo me gustaría dejar presente que no creo que pueda daros las gracias por haberme acompañado durante toda la tesis en unas paginillas así “como quien no quiere la cosa”. Creo que lo importante es que en estos años hayáis sentido mi agradecimiento y mi cariño. Quiero dejar claro que cada uno de vosotros sois parte de esto, porque si una tesis es a veces un poco difícil, sin los demás sería imposible. Así que gracias por la ayuda que todos me habéis dado para aprender, compartir tubos de moscas, anticuerpos, risas, buenos y malos momentos,... y sobre todo, gracias por haber sido una gran compañía en el transcurso de esta tesis.

Ernesto, te merecerías un apartado de agradecimientos aparte. Dudo que exista en el mundo una persona más capaz de enseñar ciencia. Lo mío sin duda ha sido como adiestrar a un chimpancé, y sin ti no sé qué habría sido de mí, pero te aseguro que todo esto no estaría entre dos tapas. Ejemplo de buen docente y buena persona, con una persona sin piedad escondida que solo sale a la luz cuando hay que corregir la tesis..jeje.. Sin perder el humor, del que me gusta, aunque a veces duela. Gracias por enseñarme, aconsejarme, aguantarme, y por haberme apoyado en absolutamente todo.

A Pepe Bella, por promover el principio de esta historia, tus consejos y tu cariño, sin importar el paso de los años.

Ginés, que suerte haber podido discutir contigo gran parte de este trabajo, risas y retreats. Ernesto y tú juntos sois el blanco y el negro, una mezcla muy pero que muy recomendable para aprender. Ya se que nunca entenderás por qué me traigo tanta comida ni yo aceptaré tu opinión sobre Jennifer López... jejeje.

Magali, culpable de tantas cosas que sin ti estos años habrían sido otra historia. Tu optimismo, enseñanzas, consejos y tu forma de trabajar me han enseñado mucho. NY fue una experiencia vital, laboral y personalmente.

Jordi, siempre he valorado tu opinión morfogenética y me has ayudado mucho con el paso de los años. Gran maestro de retreats y del congreso de Badajoz.

Manolo, nadie como tú sabe explicar que la Nespresso es un producto de exclusividad para gente como tú. Más te vale estar aprovechando SFO para no estar en esta tesis...

Natalia, por los km. de membranas para dot blot que me habéis dejado y los consejos y buffers varios en el moleculéo del 422-424.

Angélica, siniora, me entiendo contigo como la seda, demasiado, me parto de risa y me transmites mucha tranquilidad. Tú podrías dominar el mundo y lo mejor es que lo sabes ;) Mollanura!

Rosa, la matriarca. Que rebotas paz por todas partes y te encargas de cuidarnos como si fuésemos tu familia, pese a que seamos una panda de desgraciados que maltratan sus pinzas!!

Folonda, que siempre te tengo presente aunque estés en la otra punta del mundo. Pocas personas son capaces de entender la maravilla de pingu y su idioma.. gracias por tu cariño y por la cultura musical que me has dado.. Cousteau, Cousteau, Cousteau, Cousteau, le comandant, le comandant!

Ainhoa, rizos preferida sin duda. Que te descubrí en NY y sin tí no habría conocido la mitad de Manhattan, las horas en el labo del Steller, las cenas merecidas en el Yuka, gran escritora de mails radio-patio over océano atlántico entre mil cosas más...

Javi, que no se cómo, siempre me pillabas cotilleando por los pasillos del labo. Sigo sin entender por qué muchachada nui no te contrató, lo que me he reído yo contigo. Tu te vas a comer el mundo pescanova chaval!

Fer, hallazgo niuyorkino .. me adoptaste de maravilla, esos cafés en el Java ;)

Paco, cuerpo!! PhD por excelencia, compañero de largas charlas sobre la miopía, se te echa de menos.

Lara, fitter, happier, more productive..maja!!

Vero, que tu y yo siempre hemos compartido la infidelidad al Leica del lab. Gran trabajadora que no quede ninguna duda.

Luis, Luis, que sabías desde el principio que esto iba a pasar y no me avisaste, canalla... Yo ahí preguntándote mil cosas en las prácticas de Genética.. Esas conchas codan de regalo te suman un plus que muy pocos tienen.

JR-Lomelo y Jose, me aguantáis "tol día" juntos, pues no os voy a separar aquí. ¡¡Mis nenas!! Sin vosotros no habría hecho ni una mini-prep, eso si, habría reducido los cotilleos, las risas y la cafeína consumida estos últimos años una barbaridad.. JR gran maestro de cosas moleculares, mi hermano mayor del 424, que hasta me has hecho sacar un gel de la basura, por dios! Eso es fé y lo demás son tonterías. Jose, tú que sabes de idiomas, compañero de vinagre, de neurosis de limpieza y de ing fifos, somos sufridores en silencio... que si el disco se ha movido, que hoy flotaba, que los vecinos... hombre ya!!

Raquel (Lab. 426), alma de payasa como la mía, pero metida en un cuerpo de una señora madre de dos hijos. Gran descubrimiento del labo de Paola, que ganas de volver a verte todos los días desfilando por los pasillos.

Paloma, aaaaaaaay dios miiiiiiiiiooo! la telepatía existe, tú y yo lo sabemos. Por el amooooor de esa mujeeeeeer, nunca le he pedido a nadie matrimonio tantas veces como a tí. Lo demás, ya te lo sabes.

Jeff, compañero apoptótico, cuantas discusiones quedaron pendientes de hid y jnk..

María, por los comienzos en el C-V y por haber formado parte de TGQ. Suerte en la nueva etapa que empiezas ahora que será un mundo nuevo!

Raquel, chiquitina como tú dirías, qué de menús compartidos en la cafetería del Rockefeller. Más maja que las pesetas, gran fichaje de la última temporada.

Luna, que me conociste de clown, mucho mejor que de predoctoral y dictadora-Epif, no? Mucha suerte en tu estancia, una pena que te pierdas este espectáculo.

Dani, pacaaaaaa!! Hemos llegado a compartir tanta vida entre dos lupas contiguas que he sentido de cerca lo que siente un matrimonio en sus bodas de oro... salvando las diferencias, eh si.. siento comunicarte que el ocular de la lupa no es un micrófono, y no, estas confundido, Shakira y Rosana no son las mejores cantantes del mundo. Por justicia cósmica espero que tu iTunes tenga nuevas incorporaciones en los próximos tiempos. Por los diálogos de Martes y 13, las recetas gastronómicas, el payasismo en sí, y mi admiración a los que os dedicáis al teatro.

Salva, Salveishon, Sarva! Un tesoro escondido.. que sabes hacer las cosas bien, que no es fácil de encontrar. Porque me encanta que te rías como si te fuese a dar un patatus... "mira lauren, yo se que tú me hablas, pero no te entiendo ná!"

Elise, ça va la moeuf? una de las pocas personas que conoce mi alma de "racaille". Que escuchas mas que hablas, y tan a gusto para los que hablamos de más. Te he dado las gracias por haberme invitado a tu boda verdad? JAJAJA...

Requena, Lequena, que sé que no lo asumes pero no puedes vivir sin el equipo cafetero. Yeaah meeeeeennn... amaziinggggg!!!! Creo que este año ha sido un lujazo tenerte a mano, fotografía nocturna incluida!!

Walter, que el día menos pensado te voy a pedir yo tabaco a ti...

Jesusito, otro con el que me he pasado toda la tesis.. Después de tanto tiempo al final nos hemos reído bastante pese a pertenecer sin duda a un orden contrario al mío, desquiciador de Luthiers y conductor de kayak por excelencia, jajaja.

Antonio, illo!!! Que pese a lo que insistes no pienso ir al gimnasio mas que en situaciones de urgente cuidado de la salud. Que canalices con suerte tu entusiasmo por la tesis, que ya pocos lo demuestran como tú. Sin duda en este tiempo ya tendras al menos una copia de la mitad de mis stocks.. jeje.

Carlos, que en tus inicios me preguntabas con mucho interés cosas del "limb" de *Drosophila* pese a las diferencias que tiene con el de vertebrados. Espero que te vaya muy bien tu aventura postdoc con la mosca, que parece que te gusta!

Noelia, últimas adquisición del 422 y nueva integrante de los cafés de sobremesa, muy bien!!!

Inés, contigo he compartido hasta compañeras de piso! Experta en lo que te propongas: yoga, productos del Lidl, objetos de bricolaje, horarios de autobuses, agente de viajes...

Delia, nueva aparición del labo, joyita prometedora, vendedora ambulante, mala enferma de tobillo, pero eso sí, siempre sonriente.

Pero bueno, menos rollo que hay un mundo fuera de los laboratorios.. y ese es el mundo de los

otros laboratorios, lleno de personas con las que también he compartido esta Tesis.

Anabel (Learte para mí), Natalia, Rocío y Bea, partícipes de mi sección VIP particular: anda que las cinco juntas camino de California formábamos una mezcla.. que ni los de los chistes de Lepe (un alemán, un ruso, y uno de Lepe)... no hay palabras para la vidilla que me habéis dado desde la vuelta de ese viaje.

José Felix, consejero Notch, que a tí y a mí nos gusta más hablar que a un tonto, mucho mejor si mientras nos fumamos un Golden Virginia.

María, y cía por las explicaciones para aprender a hacer in situs y lo bien que os salen!! El grupo de Baonza y vuestro afán por venir a preguntarnos como hacer películas a Jose y a mí todo el rato, jejejeje.

Estella (ex-paichon), por fin tengo un compi de pata en el pasillo!!!! Y lo mejor es que ya me has dejado mucha música y yo a ti menos mal que te he dado las gracias y stocks porque aún no te he dado ni un CD.. qué desastre..

Nicole, siempre con ganas de discutir constructivamente sobre miosinas y morfogénesis. A ti te agradezco especialmente la charla que tuvimos con Buzz Baum, que me ayudó mucho a entender un poco más mi propia Tesis.

Sonsoles, Chavela, y en general, a todos los moscólogos que no me caben aquí, Gracias!

Imposible no mencionar a la gente que hace posible que todo esto tenga una forma y funcione atendiendo a las mil cosas que siempre queremos hacer y no sabemos cómo: el Servicio de Microscopía Confocal y a José del Departamento de Diseño Gráfico.

Y bueno, los personajes PhD que han dado vidilla a toda esta historia: Ana Sastre como la mejor compi de estancia sin duda alguna, Chavo como el virólogo-motero-bunbury que me ha cuidado mucho. Y mención como no a los que nos vemos todos los días por el CBM: Nacho Amigo, Guzmán, Bricio.. seeee hermanooo, Lucas y su pasión por la música, la divulgación científica y cualquier otra cosa aunque ni le de tiempo a hacerlo, Noe recién africana sonriente como ella sola, Gonzalo postodc estrella de Australia, y Ana manzana, entre otros.

A Sigi y a la gente del labo de Steller. A Pepe Pastor-Pareja, por las horas de conversación científica y las mega-carcajadas del congreso de San Diego. A la gente del curso del EMBL, que me ayudaron a arrancar este año con la sensación de que en ciencia hay mucha más gente por todo el mundo que valen la pena.

Amigos, científicos y no tan científicos. TODOS los biólogos, mención especial a algunos: Irma y Olivia, evo-devo frikis de mi corazón; Jorge, Irene, Navas, Isma, apañeros de penas de Tesis; Mihi, Lu, Ana y Bea por la agenda cultural más molona. Olivia, mi perro tuerto favorito, parte de mi persona como si me la hubiesen cortado! Saca la espada de repente y clávasela a la serpiente! Los scouts, que habéis valorado mas que mucha gente lo que hago, en especial Borja y Ras, y mis chicas claro!!!! De hecho Irene parece que lo vive paso a paso como si fuese suya.. swein! A Guina, una rata parisina admiradora secreta de esta tesis. A las veritas, que me habéis animado tanto, hasta desde Dinamarca, Francia y Etiopía! A mis vecinas, a mi fisio, a Lucas y a las flores de Bach, y los anexos tan imprescindibles en mi vida como Emanuela, María Díez y Fufi, que conecto con vosotras muy fácilmente y me habéis acompañado en estos años como nadie.

Juanma, por compartir al 100 % contigo un año que no habría girado 360 ° sin ti, paelas, endengues, muchas risas, viajes, gastronomía, ánimo fundamental en los meses de escritura (bendita paciencia), muchísimos besos y muchísimo colorrrr. Quién nos lo iba a decir, al final resulta que los peces y las moscas hacen buena pareja, eh?

A mi familia; mis hermanos, sobris y cuñados que me habéis aguantado y animado mucho pese a estar lejos de la ciencia.

Y por encima de todos, esta Tesis se la dedico a mis padres. La portada va con dedicación especial porque habría sido mucho más bonita si la hubiese pintado mi padre, así que espero quedar a la altura. Mi madre, que me ha entendido y apoyado sabiendo perfectamente lo que es hacer una Tesis. Y a los dos, que me habéis criado en un entorno en el que estudiar es una manera de crecer, ser libre y sobre todo, me habéis enseñado que en la vida hay que hacer algo que nos guste por encima de todo.