

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



**Tumorigénesis y competición celular en
células con falta de función del gen
polyhomeotic en *Drosophila melanogaster***

Tesis Doctoral
Izarne Medina Azpiazu
Madrid, 2022

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Tumorogénesis y competición celular en
células con falta de función del gen
polyhomeotic en *Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por
Izarne Medina Azpiazu, Licenciada en
Biotecnología, para optar al grado de Doctora en
Biociencias Moleculares

Director de la Tesis: Prof. Ginés Morata Pérez
Tutora de la Tesis: Dra. Irene García Higuera

Tesis Doctoral realizada en el **Centro de Biología
Molecular Severo Ochoa (CBMSO)**



Ginés Morata Pérez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Tumorogénesis y competición celular en células con falta de función del gen *polyhomeotic* en *Drosophila melanogaster***” ha sido realizada bajo mi dirección por **Izarne Medina Azpiazu**, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares.




A mi mujer,
a Unaitxo,
mis vidas

A mi familia

Índice

■ Resumen/Summary	17
■ Abreviaturas	23
■ Introducción	29
1. Biología del desarrollo y cáncer	31
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	32
3. Información posicional en el desarrollo: organización segmental en el eje antero-posterior en <i>Drosophila</i>	33
4. Mantenimiento de la identidad posicional en <i>Drosophila</i> : genes del grupo Polycomb	35
5. Discos imaginales: el disco de ala	40
6. Control del ciclo celular en <i>Drosophila</i>	43
7. Programa apoptótico de <i>Drosophila</i> en respuesta a daño en el ADN	44
8. Vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)	46
9. Estudio del cáncer en <i>Drosophila</i>	48
10. <i>polyhomeotic</i> : potencial tumorígeno.....	49
11. Competición celular	50
■ Objetivos	55
■ Materiales y métodos	59
1. Sistema Gal4/UAS/Gal80 ^{TS}	61
2. Análisis clonal.....	62
2.1. Inducción de clones mutantes nulos <i>ph</i> ⁵⁰⁵	63
2.2. Inducción de clones con ARNi frente a <i>ph</i> : El método flip-out.....	65
3. Cultivo y mantenimiento de <i>Drosophila melanogaster</i>	67
4. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	67
5. Experimentos de cambio de temperatura	68
6. Tratamiento con Rayos X	68
7. Inmunohistoquímica	69
7.1. Tinciones de anticuerpos	69
7.2. Ensayos de incorporación de EdU.....	70
7.3. Detección in vivo de especies reactivas del oxígeno (ROS)	70
8. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	71
9. Adquisición y procesamiento de imágenes	72
10. Mediciones y análisis estadístico	72

Resultados	75
1. Análisis de la eliminación de <i>ph</i> en distintas regiones del disco de ala	77
1.1. Eliminación de <i>ph</i> en los compartimentos posterior y anteriores	78
1.2. Eliminación de <i>ph</i> simultáneamente en el apéndice y en el notum	80
1.3. Eliminación de <i>ph</i> exclusivamente en el notum	81
1.3.1. Efecto en la apoptosis de la eliminación de <i>ph</i> en el notum	82
1.3.2. Efecto en el ciclo celular de la eliminación de <i>ph</i> en el notum	83
1.4. Eliminación de <i>ph</i> en el apéndice	88
1.4.1. Efecto en el crecimiento y papel de la vía JNK	88
1.4.2. Células con falta de función de <i>ph</i> son refractarias a apoptosis	94
2. Análisis del comportamiento de clones de falta de función de <i>ph</i>	109
2.1. Descripción general de los clones <i>ph^{KD}</i>	109
2.2. Fenotipo de segregación de los clones <i>ph^{KD}</i> : caracterización de la interfase con las células vecinas	112
2.3. Análisis de los tamaños y de la capacidad proliferativa de los clones <i>ph^{KD}</i>	118
2.4. Competición celular en clones <i>ph^{KD}</i>	123
2.4.1. Mecanismos de evasión de la competición celular en clones <i>ph^{KD}</i>	125
2.4.2. Activación de JNK y ROS en clones <i>ph^{KD}</i> que sufren competición celular	128
2.4.3. Competición celular bidireccional en clones <i>ph^{KD}</i>	133
Discusión	135
1. La falta de función de <i>ph</i> produce efectos diferentes en distintas regiones del disco de ala	137
1.1. El efecto tumorigénico de la falta de <i>ph</i> se restringe a las células proximales del apéndice	138
1.1.1. La tumorigénesis está mediada por la activación ectópica de las vías JNK y JAK/STAT	139
1.1.2. La falta de función de <i>ph</i> induce proliferación celular no autónoma	140
1.1.3. La proliferación excesiva de las células <i>ph^{KD}</i> afecta negativamente a la proliferación de las células a distancia	141
1.2. La eliminación de <i>ph</i> en el notum tiene efectos opuestos al apéndice	142
1.2.1. En el notum no se produce activación conjunta de las vías JNK y JAK/STAT	143
1.2.2. La falta de <i>ph</i> en el notum disminuye la tasa proliferativa de las células	144
2. Los clones con falta de función de <i>ph</i> sufren competición celular pero muchos pueden evadirla	145
2.1. Las células con falta de función de <i>ph</i> son refractarias a apoptosis	147

2.2. La segregación de los clones ph^{KD} minimiza la interacción necesaria con las células de alrededor para que ocurra la competición celular	149
3. En discos con clones deficientes para ph la competición celular puede actuar en direcciones opuestas.....	150
 Conclusiones	153
 Bibliografía	157
 Anexo: Publicaciones	177



Resumen/Summary

polyhomeotic (*ph*) es un miembro del Grupo Polycomb (PcG), un conjunto de genes implicados en silenciamiento epigenético que se requieren para mantener la expresión correcta de genes que confieren la identidad característica de los diversos tipos celulares de un organismo. Mutaciones en *ph*, así como en otros genes PcG, generan tumores tanto en *Drosophila melanogaster* como en humanos.

En esta Tesis Doctoral hemos investigado el efecto tumorigénico de células con falta de función de *ph* (*ph^{KD}*) en distintas regiones del disco de ala de *Drosophila*. Hemos encontrado que los sobrecrecimientos se restringen a la región proximal del apéndice, probablemente debido a la función conjunta de las vías de señalización JNK y JAK/STAT en dicha zona. Por el contrario, la respuesta de la parte distal del apéndice y del notum es muy diferente, ya que sufren una disminución de tamaño. Hemos explorado más en detalle el comportamiento del notum y hemos visto que la falta de *ph* conduce a una acumulación moderada de las células en la fase G2 del ciclo celular, lo que podría contribuir a explicar dicha reducción de tamaño.

Además, hemos descubierto que las células *ph^{KD}* son parcialmente refractarias a la apoptosis inducida por Rayos X. Proponemos que esto se debe a los bajos niveles de fosforilación de la histona H2Av, uno de los eventos iniciales implicados en la respuesta a daño en el ADN tras radiación ionizante.

Finalmente, hemos analizado el comportamiento de clones *ph^{KD}* en relación al fenómeno de competición celular, un proceso homeostático responsable de la eliminación de células oncogénicas. En *Drosophila*, la regla general es que los clones de células tumorales (mutantes para *scribble*, *lgl*, *Rab5*, etc) son eliminados por competición celular, pero nuestros experimentos y otros descritos en la literatura indican que los clones *ph^{KD}* sobreviven y muchos incluso desarrollan sobrecrecimientos tumorales. No obstante, hemos mostrado que en realidad la competición celular sí opera en los clones *ph^{KD}*, ya que muchas células *ph^{KD}* de los bordes sufren estrés oxidativo, activan la vía JNK, las caspasas efectoras y mueren por apoptosis. A pesar de que la competición celular actúa sobre estos clones, en general no es suficiente para su eliminación. Sugerimos dos razones para explicar por qué muchos de estos clones son capaces de evadir el control de la competición celular: 1) las células *ph^{KD}* son parcialmente refractarias a la apoptosis y 2) la falta de *ph* altera de forma drástica la identidad de las células, de forma que los clones forman vesículas que se segregan del epitelio, minimizando el contacto con las células vecinas silvestres. Suponemos que esto dificulta las interacciones celulares necesarias para que la competición celular tenga lugar.

Sorprendentemente, también hemos encontrado que, aunque la mayoría de las veces son las células *ph^{KD}* las que se eliminan por competición celular, a veces las células silvestres producen ROS, activan la vía JNK y mueren cuando están rodeadas de células *ph^{KD}*, lo que indica que dentro de un mismo tejido mosaico la competición celular puede operar en direcciones opuestas.

polyhomeotic (*ph*) is a member of the Polycomb Group (PcG), a family of genes involved in epigenetic silencing that are required to maintain the correct expression of genes responsible for the appropriate identity of the various cell types in an organism. Mutations in *ph*, as well as in other PcG genes, give rise to tumours both in *Drosophila melanogaster* and in humans.

In this Doctoral Thesis we have first investigated the tumourigenic effect of cells lacking *ph* function (*ph^{KD}*) in different regions of the wing disc of *Drosophila*. We have found that overgrowths are restricted to the proximal region of the appendage, probably due to the joint activity of the JNK and JAK/STAT signalling pathways in that area. On the contrary, the response of the distal part of the appendage and the notum is very different, as they suffer a decrease in size. We have further explored the behaviour of the notum and found that the lack of *ph* leads to a moderate accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle, which may help to explain the size reduction phenotype.

Moreover, we have discovered that *ph^{KD}* cells are partially refractory to X-ray induced apoptosis. We propose that this is due to the low phosphorylation levels of the histone H2Av, one of the first events involved in DNA damage response to ionizing irradiation.

Finally, we have characterised the behaviour of *ph^{KD}* clones in relation to the phenomenon of cell competition, a homeostatic process responsible for the elimination of oncogenic cells. In *Drosophila*, the general rule is that clones of tumour cells (mutant for *scribble*, *lgl*, *Rab5*, etc) are eliminated by cell competition. Yet, our experiments and others reported in the literature demonstrate that *ph^{KD}* clones survive and many are also able to develop tumour overgrowths. Nevertheless, we have found that cell competition is indeed activated in *ph^{KD}* clones, as many *ph^{KD}* cells at the clone borders suffer oxidative stress, induce JNK at high level, acquire effector caspase activity and die by apoptosis. Although cell competition operates in *ph^{KD}* clones, in general it is not sufficient to eliminate them. We suggest two reasons to explain why many of these clones may evade the control of cell competition: 1) *ph^{KD}* cells are partially refractory to apoptosis and 2) the loss of *ph* drastically alters the identity of the cells, thus, *ph^{KD}* clones form cyst-like structures that segregate from the surrounding epithelium, minimising the contacts with their wild type neighbour cells. We surmise that this might impair the winner-loser cell interactions necessary for cell competition to occur.

Unexpectedly, we have also shown that, although *ph^{KD}* cells are generally those eliminated by cell competition, sometimes non-mutant cells are the eliminated ones when surrounded by *ph^{KD}* cells: they suffer oxidative stress, acquire JNK and caspase activity and die. This is a novel result indicating that within the same mosaic tissue cell competition may operate in opposite directions.



Abreviaturas

A/P	Anterior-Posterior (antero-posterior)
AbdB	Abdominal B
<i>act</i>	<i>actina</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALL	Leucemia linfoblástica aguda infantil
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
<i>avl</i>	<i>avalanche</i>
BDSC	Bloomington Drosophila Stock Center
BSA	Bovine Serum Albumin
Bsk	Basket
Cad	Caudal
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
Cyc	Ciclina
D	Dorsal
D/V	Dorsal-Ventral (dorso-ventral)
Dcp1	<i>Drosophila</i> cleaved caspase 1
DHE	Dihidroetidio
Diap1	Death-associated inhibitor of apoptosis 1
<i>dlg</i>	<i>discs-large</i>
DN	Dominante Negativo
DNMTs	ADN metiltransferasas
Dpp	Decapentaplegic
Drice	<i>Drosophila</i> interleukin converting enzyme
Dronc	Death regulator Nedd2-like caspase
E(Z)	Enhancer of Zeste
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
Egr	Eiger
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>ept</i>	<i>erupted</i>

Abreviaturas

ESC	Extra Sex Comb
<i>esg</i>	<i>escargot</i>
<i>ex</i>	<i>expanded</i>
Eyg	Eyegone
F24h tRX	Fijado 24 horas tras Rayos X
F48h tHS	Fijado 48 horas tras <i>heat shock</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
Fig	Figura
FLP	Flipasa
FRT	Flippase Recognition Target
GFP	Green Fluorescent Protein
Grnd	Grindelwald
H2AK119	Monoubiquitinación de la histona 2A en la lisina 119
H3K27me3	Trimetilación de la histona 3 en la lisina 27
H3K9me3	Trimetilación de la histona 3 en la lisina 9
H4K12Ac	Acetilación de la histona 4 en la lisina 12
Hep	Hemipterous
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>hid</i>	<i>head involution defective</i>
<i>hs</i>	heat-shock
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
JNK	c-Jun N-terminal Kinasa
LanB1	Laminina B1
LBCL	Linfomas B de células grandes
<i>Igl</i>	<i>lethal giant larvae</i>
M	<i>Minute</i>
Mmp1	Metaloproteasa 1
mRNA	ARN mensajero
Msn	Mishappen
<i>mys</i>	<i>myospheroid</i>
<i>nub</i>	<i>nubbin</i>

PBS	Phosphate buffered saline solution
PcG	Grupo Polycomb
PCL	Polycomblike
<i>ph</i>	<i>polyhomeotic</i>
Phal	Faloidina
PHE	Fosfo-histona 3
<i>ph^{KD}</i>	ARN de interferencia para <i>polyhomeotic</i>
Pho	Pleiohomeotic
PhoRC	Pleiohomeotic Repressive Complex
<i>pnr</i>	<i>pannier</i>
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRE	Elemento de Respuesta a Polycomb
PSC	Posterios sex comb
<i>puc</i>	<i>puckered</i>
RB	Retinoblastoma
RFP	Red Fluorescent Protein
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>rpr</i>	<i>reaper</i>
RX	Rayos X
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
SCE/dRING	Sex comb extra
SCM	Sex combs on midleg
<i>scrib</i>	<i>scribble</i>
<i>sqh</i>	<i>spaghetti squash</i>
Su(z)12	Supresor of Zeste 12
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TOPRO	To-Pro-3
trxG	Grupo trithorax
TSG	Gen Supresor de Tumores
TubGal80^{TS}	Tubulina Gal80 termosensible
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
Ubx	<i>Ultrabithorax</i>

Abreviaturas

<i>upd</i>	<i>unpaired</i>
V	Ventral
Vg	Vestigial
Vkg	Viking
Wg	Wingless
Wgn	Wengen
Yki	Yorkie



Introducción

1. Biología del desarrollo y cáncer

Tú, lector de esta Tesis, eres una colección de más de 40 billones de células que caminan, hablan, piensan y aprenden. Pero no siempre fuiste tan grande. Al igual que todos los demás seres humanos del planeta empezaste siendo una sola célula, llamada cigoto. Entonces, ¿cómo se formó tu complejo cuerpo?

La disciplina que tiene como objeto de estudio entender cómo se forma un organismo pluricelular a partir de una única célula es la Biología del desarrollo. El cigoto es una célula indiferenciada que se divide y cuyas células hijas dan lugar a los distintos órganos y tejidos de tamaño y forma adecuados que componen el individuo adulto, proceso denominado morfogénesis.

Para que este desarrollo ocurra se requiere un programa genético en el que procesos como la proliferación celular, la muerte celular programada o apoptosis, la comunicación intercelular y la diferenciación celular deben estar altamente coordinados y regulados. De hecho, fallos en estos procesos pueden dar lugar a defectos muy graves en el desarrollo o a enfermedades como el cáncer.

El cáncer es una enfermedad en la que grupos de células, generalmente originadas en un tejido concreto, proliferan desproporcionadamente, colonizan el tejido y frecuentemente emigran a otros tejidos, extendiendo el proceso por metástasis. Existen muchos tipos de cáncer que afectan a distintos tejidos y vías de señalización, sin embargo, se han descrito diez características comunes a todas las células tumorales: acumulan mutaciones y presentan inestabilidad genómica; reciben señales proliferativas de manera sostenida, evaden señales supresoras del crecimiento y se dividen de manera ilimitada (inmortalidad replicativa); resisten la apoptosis, viven en un entorno inflamado y evaden la destrucción por el sistema inmune; modifican su metabolismo, inducen angiogénesis para proveerse de oxígeno y nutrientes y activan su capacidad de invadir tejidos locales y lejanos (metástasis) (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

Se trata de una enfermedad prevalente en la especie humana, siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo: según la Organización Mundial de la Salud, se produjeron casi 10 millones de fallecimientos por cáncer en el año 2020. Dada la importancia médica y social de la enfermedad, el cáncer es objeto de investigación de muchos laboratorios en el mundo.

Uno de los descubrimientos más notables de la Biología del desarrollo a finales del Siglo XX es que los procesos y vías de señalización implicados en el desarrollo de los seres vivos se han conservado altamente a lo largo de la evolución. Esto implica que muchos aspectos del desarrollo y de enfermedades humanas

como el cáncer se pueden estudiar empleando distintos organismos modelo, que permiten llevar a cabo aproximaciones experimentales que no se podrían utilizar en la investigación de cánceres humanos.

2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A principios del Siglo XXI se secuenció el genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y se vio que la conservación evolutiva es tal que organismos tan separados filogenéticamente como una mosca y la especie humana comparten un 61% de su genoma (Adams *et al.*, 2000). Además, se describió que un 77% de los genes cuyas alteraciones dan lugar a enfermedades en el humano también se encuentran conservados en *Drosophila* (Reiter *et al.*, 2001), lo que la hace que sea un organismo modelo adecuado para el estudio de enfermedades humanas.

Drosophila fue adoptada como animal de experimentación genética por Thomas Hunt Morgan a principios del Siglo XX y en todo un siglo se han desarrollado una enorme variedad de tecnologías genéticas y moleculares que permiten estudiar procesos biológicos en esta especie. Además, *Drosophila* presenta un reducido número de cromosomas (4 pares) y posee una menor redundancia genética que la de organismos más complejos, lo que facilita asociar funciones a genes.

Otras ventajas experimentales que hacen que *Drosophila* sea un modelo muy útil son su corto tiempo de generación (10 días a 25°C, Fig. I1) y su numerosa progenie (cada hembra produce aproximadamente 400 huevos a lo largo de su vida), lo que acelera la investigación. Así mismo, es un animal pequeño (mide aproximadamente 3mm en su eje más largo), por lo que ofrece facilidad de almacenamiento y resulta también barato mantenerlo en el laboratorio.

Drosophila es un insecto holometábolo, por lo que sufre una metamorfosis completa durante su desarrollo. Su ciclo de vida consta de cuatro fases: desarrollo embrionario, larva, pupa y adulto (Fig. I1). Tras la fecundación, las hembras depositan los huevos y dentro se desarrolla el embrión. Al final del periodo embrionario, que dura 24 horas en condiciones normales (25°C), eclosiona una larva de primer estadio. La fase larvaria dura 4 días, se divide en tres periodos y en cada transición la larva sufre una muda de su cutícula. Durante todo este periodo larvario hay unas estructuras que se llaman discos imaginales (Fig. I5), que proliferan y darán lugar a las distintas estructuras cuticulares o exoesqueleto del adulto (cabeza, tórax, apéndices, analia y genitalia). Cuando la larva llega a su tercer estadio se inmoviliza y se encapsula en una pupa, donde se produce la metamorfosis durante 4-5 días. Al principio de la

metamorfosis, la mayoría de los tejidos larvarios se eliminan por apoptosis, los discos imaginales cesan su proliferación y constituyen los tejidos cuticulares del adulto, mientras que unas células llamadas histoblastos, que son las precursoras del abdomen, comienzan su proliferación. Tras esta fase pupal emerge la mosca adulta o imago, que está dividido en segmentos. En concreto, *Drosophila* se divide a lo largo de su eje antero-posterior (A/P) en 3 segmentos cefálicos, 3 torácicos y 8 abdominales (Lawrence, 1992).

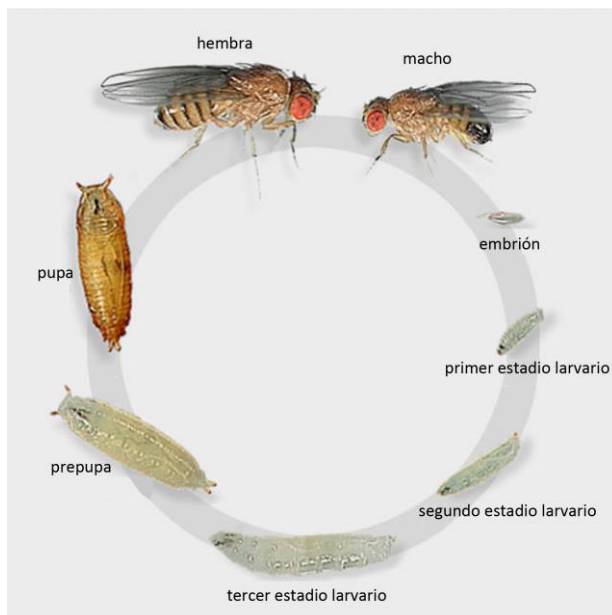


Figura I1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Esquema de las distintas fases que atraviesa la mosca a lo largo de su desarrollo, que dura 10 días a una temperatura de 25°C. Consta de una fase embrionaria, que dura 24 horas, tres periodos larvarios de 4 días y una fase de pupa de 4-5 días en la que tiene lugar la metamorfosis, que dará lugar a la mosca adulta fértil. Imagen adaptada de FlyMove.

3. Información posicional en el desarrollo: organización segmental en el eje antero-posterior en *Drosophila*

A lo largo del desarrollo las células de *Drosophila* tienen que conocer su posición dentro del organismo (ya sea en su eje anterior, posterior, dorsal o ventral) para que puedan diferenciarse correctamente y dar lugar a las estructuras que les corresponde: por ejemplo, para que se formen las patas en la zona ventral del tórax y no en la cabeza.

La manera en la que las células adquieren su identidad posicional es a través del gradiente de un morfógeno (Wolpert, 1994), una molécula que difunde desde su origen y que dependiendo de la concentración que recibe cada célula ésta responde mediante una expresión génica diferencial. El ejemplo

Introducción

más claro de información posicional por medio de un morfógeno es el de los genes maternos, que contribuyen a la definición del eje antero-posterior del embrión en distintos segmentos (Nüsslein-volhard and Wieschaus, 1980; Frohnhofer *et al.*, 1986). Los mRNA de *bicoid* y *nanos*, los llamados genes maternos, son depositados por la madre en el polo anterior y posterior del huevo, respectivamente (Fig. I2). Poco después de la fertilización del huevo, estos mRNA se traducen y se genera un gradiente de concentración inverso de estas dos proteínas, que desencadena una cascada de expresión diferencial de los denominados genes de segmentación cigóticos: primero se expresan los genes “Gap” y como consecuencia de estos los genes “Pair-rule”. La expresión de estos dos tipos de genes es transitoria, sin embargo, los genes “Pair-rule” activan a su vez a los genes de polaridad segmental, que se expresan durante toda la vida del individuo y que dividen el embrión en 14 segmentos a lo largo de su eje A/P (Lawrence, 1992).

Debido a la expresión diferencial del gen de polaridad segmental *engrailed (en)*, que otorga identidad posterior a las células, cada uno de estos segmentos embrionarios se divide en dos compartimentos: el compartimento posterior, formada por una población de células que expresa *en* y el compartimento anterior que carece de *en*. Los compartimentos son unidades de linaje celular independientes, es decir, una vez que se fija la identidad anterior o posterior en una célula ésta se perpetúa a través de su linaje, de tal manera que todas las células descendientes de ella heredan esa misma identidad y formarán parte del mismo compartimento (García-Bellido *et al.*, 1973; Morata and Lawrence, 1975; Lawrence and Morata, 1976). La adquisición de esta identidad celular hace que las células de cada compartimento adquieran unas propiedades de afinidad celular particulares que van a impedir que se mezclen con células del otro compartimento.

Una vez que está el embrión subdividido en segmentos por la acción de los genes de polaridad segmental, se tiene que generar una diversidad morfológica a lo largo de ese eje corporal A/P. Para ello, las proteínas codificadas por los genes “Gap”, “Pair-rule” y los de polaridad segmental interaccionan y regulan la expresión de otro tipo de genes: los genes Hox (Fig. I2), que codifican factores de transcripción y se agrupan en dos complejos: el complejo Antennapedia (contiene los genes *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex combs reduced*, *Antennapedia*, que especifican los segmentos de la cabeza y del tórax) (Kaufman *et al.*, 1990) y el complejo Bithorax (formado por *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A* y *abdominal-B*, que determinan los segmentos torácicos y abdominales) (Sánchez-Herrero *et al.*, 1985). La expresión restringida en dominios específicos de estos genes Hox define las estructuras que han de formarse en cada segmento (Lewis, 1963; Cabrera *et al.*, 1985; White and Akam, 1985).

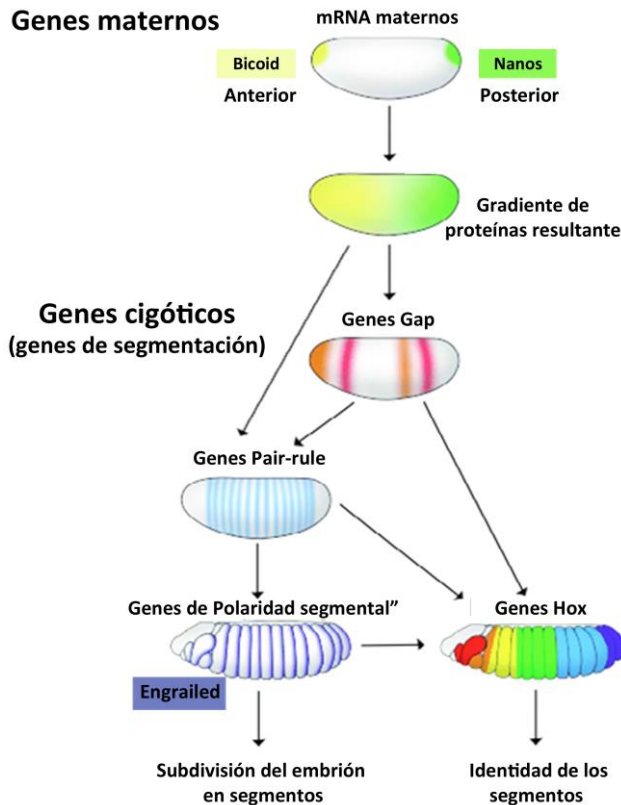


Figura I2: Cascada de regulación génica en la generación de un embrión de *Drosophila* segmentado a lo largo de su eje A/P. Los genes maternos codifican proteínas que forman gradientes y activan la expresión de los genes cigóticos “Gap” y “Pair-rule”, que a su vez determinan el patrón de expresión de los genes de polaridad segmental, dando lugar a un embrión que se subdivide en 14 segmentos. Todos estos genes, a su vez, establecen los dominios de expresión de los genes Hox, que determinan la identidad de los segmentos y por tanto la diversidad de estructuras que se forman a lo largo del eje A/P del cuerpo de *Drosophila*. Imagen adaptada de “Developmental Biology Edición 8 de Gilbert”.

Los genes de polaridad segmental como *engrailed* y los genes Hox se conocen también como genes selectores, que funcionan como una señal binaria de encendido (ON) o apagado (OFF), confiriendo una identidad diferente a las células que los expresan y a las que no lo hacen (García Bellido, 1975; Mann and Morata, 2000). Además, un aspecto importante de los genes selectores es que se utilizan en un modo combinatorio, consiguiéndose así todas las identidades celulares particulares (Mann and Morata, 2000). Por citar un caso, la combinación *Ubx*-OFF (resulta en un ala) y *en*-OFF especifica el compartimento anterior del ala.

4. Mantenimiento de la identidad posicional en *Drosophila*: genes del grupo Polycomb

Como hemos mencionado anteriormente, los genes “Gap” y “Pair-rule” implicados en el establecimiento del eje A/P se expresan solamente durante las 4 primeras horas de la embriogénesis y luego desaparecen (Jackle *et al.*, 1992), sin embargo, los genes Hox se expresan y se requieren durante todo el desarrollo.

Introducción

Por ello, una vez que los genes de segmentación establecen los dominios donde los genes Hox tienen que estar activados o reprimidos, existen otros mecanismos implicados en mantener la identidad celular de estos dominios a lo largo de las múltiples divisiones celulares que ocurren durante todo el desarrollo (Busturia and Morata, 1988). Esta función la llevan a cabo los genes del grupo Polycomb (PcG) y los genes del grupo trithorax (trxG). Por ello, se conoce que actúan como un sistema de memoria celular, asegurando que los estados de represión o activación se mantengan a largo plazo y de forma heredable de las células madre a las hijas (Schuettengruber et al., 2017). Concretamente, los genes PcG están implicados en el mantenimiento del estado transcripcional reprimido de los genes Hox (Jürgens, 1985), mientras que los trxG mantienen su estado activado (Kennison and Tamkun, 1988; Schuettengruber et al., 2011). Además, los PcG (Busturia and Morata, 1988; Kassis, 1994; Randsholt et al., 2000) y trxG (Breen et al., 1995; Bejarano and Milán, 2009) también mantienen el estado de represión y activación, respectivamente, de otros genes reguladores del desarrollo como *en* o *hedgehog* (*hh*).

En esta Tesis Doctoral estudiamos el comportamiento de células mutantes para el gen *polyhomeotic*, que pertenece al grupo Polycomb, por lo que a continuación hablaremos exclusivamente sobre la función de los genes PcG en el mantenimiento de la identidad celular posicional.

PcG son una familia de proteínas que se descubrieron en *Drosophila*, pero están evolutivamente muy conservados en todos los metazoos (Whitcomb et al., 2007) y plantas (Köhler and Hennig, 2010). Funcionan en complejos multiméricos de proteínas y, en *Drosophila*, se han descrito tres complejos PcG principales (Fig. I3): PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1): compuesto por Polycomb (PC), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex comb (PSC), Sex comb extra (SCE/dRING) y Sex combs on midleg (SCM); PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2): Extra Sex Comb (ESC), Enhancer of Zeste (E(Z)), Suppressor of Zeste 12 (Su(z)12), NURF55 y Polycomblike (PCL); y PhoRC (Pleiohomeotic Repressive Complex): Pleiohomeotic (Pho) y dSFMBT.

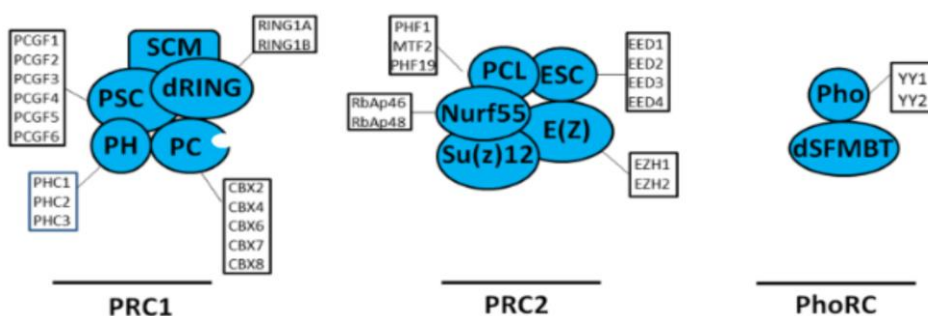


Figura I3: Complejos de proteínas PcG de *Drosophila*. Las proteínas PcG implicadas en silenciamiento génico actúan en complejos multiméricos. Se han descrito 3 complejos principales en *Drosophila*: PRC1, PRC2 y PhoRC. Las proteínas PcG de *Drosophila* que forman parte de cada complejo se indican en azul, mientras que los homólogos humanos están representados en blanco. *polyhomeotic (ph)*, el gen de interés en esta Tesis Doctoral, forma parte del complejo PRC1 y presenta 3 homólogos en humanos: PHC1, PHC2 y PHC3. Imagen tomada de (Khan *et al.*, 2018).

Las proteínas PcG son represores epigenéticos de la transcripción y llevan a cabo su función en tres pasos principales (Beisel and Paro, 2011): 1) reclutamiento de los complejos PcG a los genes diana a ser inactivados, 2) el proceso de silenciamiento génico per sé y 3) la propagación de la cromatina silenciada a través de la replicación del ADN y la mitosis a las células hijas.

Respecto al primer paso, es importante mencionar que las proteínas PcG son proteínas nucleares asociadas a la cromatina que tienen una expresión ubicua en las células del embrión y en los discos imaginales. Sin embargo, como venimos diciendo, los genes cuya expresión regulan las proteínas PcG tienen un patrón de expresión muy específico. Esto implica que deben existir mecanismos altamente selectivos para dirigir la represión mediada por las proteínas PcG a genes concretos. Se cree que hay dos mecanismos que controlan el reclutamiento de estas proteínas a sus lugares diana. En primer lugar, el reclutamiento de las proteínas PcG requiere unas secuencias de ADN denominadas Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs), que pueden estar cerca o lejos de los promotores, y que sirven como señales para que las proteínas PcG reconozcan los genes específicos sobre los que deben actuar (Chiang *et al.*, 1995; Horard *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001). Además, la represión por parte de las proteínas PcG requiere de un gen silenciado como plantilla, de manera que solamente actúan sobre genes que poseen secuencias PRE en células en las que el gen ha sido previamente silenciado por los genes de segmentación (Poux *et al.*, 1996, 2001). Hay varias proteínas PcG que tienen dominios de unión a ADN, sin embargo, en *Drosophila*, la única proteína PcG capaz de unirse a secuencias específicas de ADN es Pleiohomeotic (Pho) (Brown *et al.*, 1998), por lo que es el complejo Pho-RC el primero en unirse a los genes diana gracias a la capacidad de unión a las secuencias PRE de Pho.

Una vez que ocurre el reclutamiento, el mecanismo más aceptado por el que los complejos PcG llevan a cabo el silenciamiento génico es mediante la compactación de la cromatina en una estructura que se conoce como heterocromatina facultativa (Grossniklaus and Paro, 2014) (Fig I4). Tras la unión de Pho al ADN, es capaz de reclutar al complejo PRC2, de manera que Enhancer of Zeste (E(Z)), una histona metiltransferasa del complejo PRC2, cataliza la trimetilación de las histonas H3 en la lisina 27 (H3K27me3), una marca epigenética represiva. Es importante mencionar que Enhancer of Zeste también sirve como

Introducción

andamio para reclutar ADN metiltransferasas (DNMTs), otras enzimas que llevan a cabo la metilación del ADN para inhibir la transcripción génica (Viré *et al.*, 2006). A continuación, se recluta el complejo PRC1, debido a que la proteína Polycomb de dicho complejo tiene un cromodominio que es capaz de reconocer y unirse a la histonas H3 trimetiladas. Tras el reclutamiento de PRC1, la proteína dRING de este complejo, que es una E3 ubiquitin ligasa, monoubiquitina las histonas H2A en la lisina 119 (H2AK119), que es otra marca represiva de la cromatina que consolida aún más su compactación, quedando inaccesible a la maquinaria de transcripción (Fig. I4). Además de la compactación de la cromatina, se han descrito otros dos mecanismos por los que los complejos PcG pueden inhibir la transcripción (Francis and Kingston, 2001). Uno de ellos es la inhibición directa de la maquinaria de transcripción por parte de PRC1, donde dRING se une directamente a la ARN polimerasa II e inhibe su función (Grossniklaus and Paro, 2014). Además, se ha visto también que las proteínas PcG pueden reclutar los genes que se han de silenciar en un dominio nuclear único en el que se concentran las proteínas PcG (Lanzuolo and Orlando, 2007). Existen evidencias experimentales para los tres modelos, que no son excluyentes, por lo que posiblemente todos jueguen un papel importante en el silenciamiento génico llevado a cabo por las proteínas PcG.

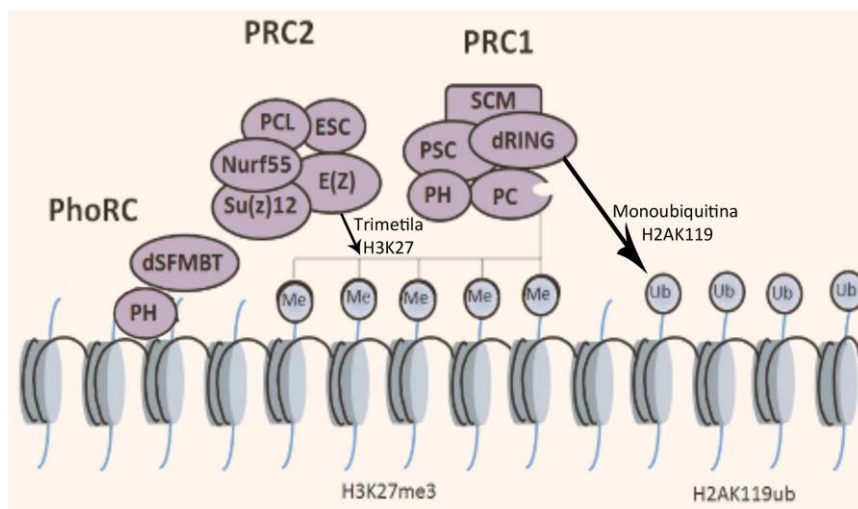


Figura I4: Mecanismo de silenciamiento epigenético de las proteínas PcG. Pleiohomeotic (Pho), del complejo PhoRC, es capaz de unirse a las secuencias PRE del ADN diana. Posteriormente, se recluta a PRC2, que lleva a cabo la trimetilación de H3K27 gracias a la actividad catalítica de Enhancer of Zeste (E(Z)). A continuación, el complejo PRC1 es reclutado debido a la afinidad de la proteína Polycomb (PC) a H3K27me3. Finalmente, la proteína dRING de PRC1 monoubiquitina H2K119. Todas estas modificaciones epigenéticas dan lugar a un estado de transcripción reprimido donde la cromatina se encuentra compactada. Imagen adaptada de (Khan *et al.*, 2018).

Una vez que se ha llevado a cabo el silenciamiento génico es imprescindible que los estados génicos reprimidos se transmitan, se hereden, a lo largo de las divisiones celulares a las células hijas. Son especialmente críticas la replicación del ADN y la mitosis, fases en las que la cromatina sufre muchos cambios y muchas histonas parentales con sus marcas epigenéticas se borran. Así, se han propuesto varios mecanismos por los cuales las proteínas PcG reestablecen la represión tras las divisiones celulares (Beisel and Paro, 2011; Steffen and Ringrose, 2014; Schuettengruber *et al.*, 2017). En primer lugar, se ha visto que las proteínas PcG podrían “sobrevivir” al proceso de replicación y permanecer unidas al ADN (Francis *et al.*, 2009). Además, se ha observado que, previo al comienzo de la replicación, ocurre un reclutamiento de proteínas PcG a las secuencias PRE (Lanzuolo *et al.*, 2011). Durante la mitosis, la mayor parte de las proteínas PcG sí se disocian, sin embargo, algunas proteínas residuales (menos del 2%) podrían permanecer en los cromosomas mitóticos y servir como “semillas” para reclutar a las demás proteínas PcG y reestablecer el patrón de cromatina silenciada (Buchenau *et al.*, 1998). Alternativamente, también se ha propuesto que a pesar de que las proteínas PcG se disocian de la cromatina durante la mitosis, dejan una modificación covalente en las histonas como marca o señal que desencadenaría el restablecimiento del estado reprimido. Por ejemplo, la propia H3K27me3 podría ser esta marca que se propaga de manera estable, ya que se ha propuesto que no solamente PRC1 sino que también PRC2 puede reconocer y unirse a H3K27me3 y continuar con su actividad histona metiltransferasa para reestablecer todas las marcas epigenéticas que quedan (Hansen *et al.*, 2008; Margueron *et al.*, 2009).

Además de la represión de los genes Hox, las proteínas PcG están implicadas en otros procesos biológicos. El hecho de que alteraciones en los genes Hox estén asociados con tumores humanos (Shah and Sukumar, 2010) puede sugerir un rol de los genes PcG en oncogénesis. En efecto, mutaciones en los distintos ortólogos del grupo PcG en humanos están asociados a una gran variedad de cánceres (Wang *et al.*, 2015). Conviene matizar que el hecho de que mutaciones en los genes PcG den lugar a tumores no indica en absoluto que la función normal de los genes sea la de suprimir tumorigénesis, sino que las mutaciones generan anomalías en el desarrollo que pueden resultar en cáncer. Las proteínas PcG están también involucradas en el mantenimiento del estado pluripotente de células madre embrionarias y específicas de tejido, pero también regulan procesos de diferenciación (Laugesen and Helin, 2014). En mamíferos, participan también en la inactivación del cromosoma X femenino (Olivier-Van Stichelen and Hanover, 2014).

5. Discos imaginales: el disco de ala

Al final de la embriogénesis, hay unos grupos discretos de células del ectodermo que se invaginan y se convierten en el primordio de los discos imaginales (Mandaravally Madhavan and Schneiderman, 1977), que crecen a lo largo del periodo larvario. Los discos imaginales son estructuras epiteliales en forma de saco que flotan en la hemolinfa de la larva y que tras la metamorfosis dan lugar a las distintas estructuras que forman el exoesqueleto de la mosca adulta (Fig. 15). *Drosophila* tiene 19 discos imaginales: dos series simétricas de 10 discos a cada lado del cuerpo que dan lugar a la cabeza y el tórax con sus respectivos apéndices (tres pares de apéndices ventrales - las patas- y dos pares de apéndices dorsales - las alas y los halterios) y un disco de simetría bilateral que da lugar a la analia y genitalia.

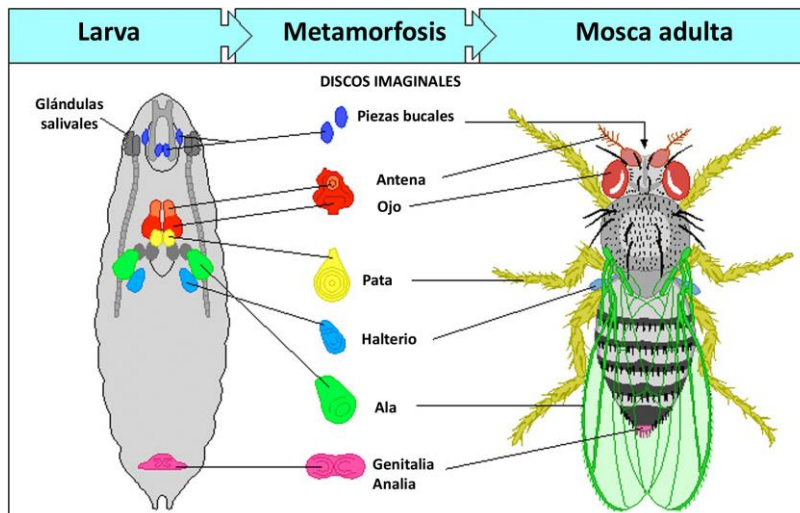


Figura 15: Discos imaginales de *Drosophila*. Esquema que ilustra la localización larvaria de los discos imaginales y las estructuras a las que dan lugar, tras la metamorfosis, en la mosca adulta. Imagen adaptada de (Wolpert, 2011).

Uno de los discos imaginales mejor caracterizados de *Drosophila* es el disco de ala, tejido que utilizamos como modelo experimental en este trabajo. Consta de dos capas de epitelio enfrentadas por su cara apical, dejando un lumen entre ambas: por una parte, el propio disco de ala, que es una monocapa de epitelio pseudoestratificado simple y, por otro lado, la membrana peripodial, formada por células epiteliales escamosas (Fig. 16 B). Tras la metamorfosis, los discos se evaginan y dan lugar a la región dorsal del segundo segmento torácico, que incluye el apéndice ala y el tronco mesotorácico (Fig. 16 C). El

apéndice se compone del ala propiamente dicho y una axila o región bisagra. Cada disco de ala da lugar a medio tórax o hemitórax (Fig. I6 C). La membrana peripodial no contribuye a la estructuras adultas.

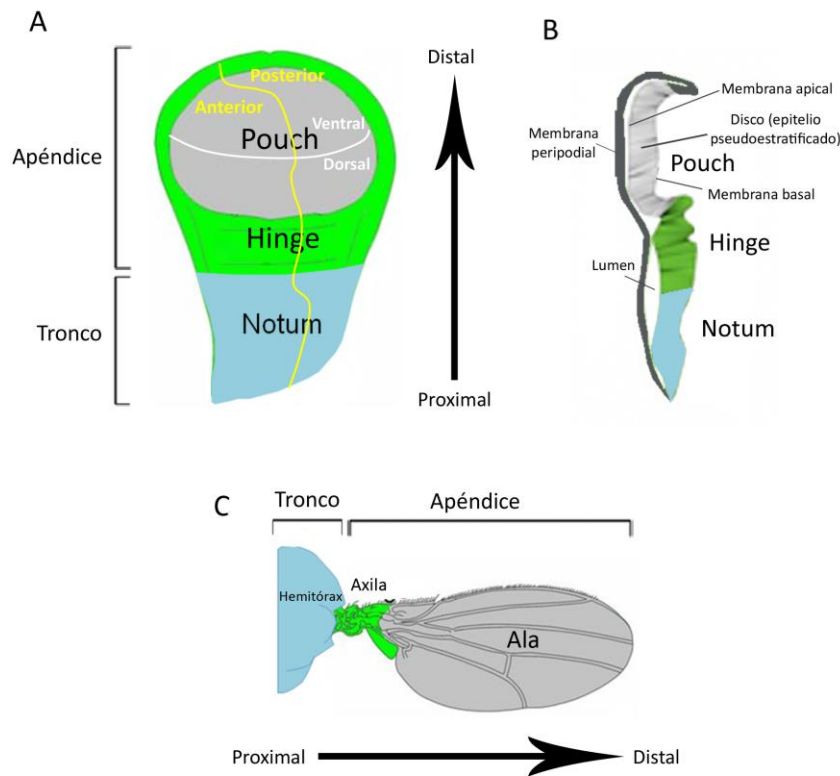


Figura I6: Disco imaginal de ala y su transformación en el adulto. A) Disco imaginal de ala larviano con diversas subdivisiones: compartimento anterior y posterior (amarillo); ventral y dorsal (blanco); pouch, hinge y notum (gris, verde y azul, respectivamente). El pouch y el hinge son estructuras que darán lugar al apéndice propiamente dicho, mientras que el notum es la estructura presuntiva del tórax o tronco. B) Vista lateral del disco imaginal larviano mostrando las distintas regiones y los dos epitelios que lo componen: el propio disco pseudoestratificado y la membrana peripodial, dejando un lumen entre medias. C) Tras la metamorfosis, el disco de ala se evagina dando lugar a medio tórax o hemitórax y un ala separadas por una axila. Se representan los ejes próximo-distales en todas las estructuras. Imagen adaptada de (Khan *et al.*, 2013).

El disco imaginal de ala tiene varios compartimentos: uno anterior y otro posterior (Fig. I6 A líneas amarillas) (García-Bellido *et al.*, 1973). Esta subdivisión es previa a la formación de los discos imaginales, ocurre en etapas embrionarias (Lawrence and Morata, 1977), ya que cada segmento del embrión se divide en dos poblaciones diferentes en base a la expresión diferencial del gen *en*, que confiere identidad posterior, tal y como hemos comentado previamente (Fig. I2). Así pues, los primordios del disco de ala,

Introducción

cuando se forman, ya contienen un compartimento anterior que carece de *en* y un compartimento posterior con células que sí lo expresan (Morata and Lawrence, 1975). Además, en el disco de ala existe una subdivisión más, que ocurre más tardíamente, durante el segundo estadio larvario, y que depende del gen selector *apterous* (*ap*), que confiere identidad dorsal, de tal manera que se divide el disco en un compartimento dorsal (D) con células que expresan *ap* y en uno ventral (V) que carece de *ap* (Fig. I6 A líneas blancas) (Cohen *et al.*, 1992; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993).

Los compartimentos no se corresponden necesariamente con divisiones anatómicas del cuerpo de la mosca, sin embargo, en el segundo estadio larvario tiene lugar una tercera subdivisión del disco en regiones que sí discriminan las estructuras a las que darán lugar en el adulto. Esta subdivisión del disco es la que separa el tronco mesotorácico, al que a partir de ahora nos referiremos como “notum” (es la región presuntiva del tórax), y el apéndice (Morata and Lawrence, 1979), entre los que existe una restricción de linaje. Dentro del apéndice se puede distinguir entre el “pouch”, que es la zona central del disco que va a dar lugar a la parte distal del ala – el ala propiamente dicho-, y el “hinge”, la región periférica o más proximal que da lugar a la axila o región bisagra (Fig. I6 A,C). No hay evidencia de que el pouch y hinge tengan un linaje diferente y por lo tanto no se consideran compartimentos diferentes. La división apéndice-tronco se debe a la actividad de la vía del factor de crecimiento epidérmico EGF, que induce la activación de genes del complejo Iro-C que confieren identidad de notum en la región dorsal proximal (Wang *et al.*, 2000; Zecca and Struhl, 2002a, 2002b). Por su parte, para el desarrollo del apéndice se requiere la expresión de *wg* (Williams *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 1996).

Los compartimentos no solamente separan células con una identidad diferente, sino que actúan también como centros organizadores del desarrollo, ya que en el borde entre compartimentos se genera una fuente de morfógenos que desempeñan una función importante en el crecimiento del tejido y en la formación de su patrón morfológico. En el compartimento posterior el factor de transcripción *en* desencadena la expresión del gen *hh*, que codifica un morfógeno de corto alcance. La actividad de *en* bloquea la función de Hh en el compartimento posterior, sin embargo, éste difunde hacia el compartimento anterior y provoca la activación de *dpp* en células anteriores adyacentes al borde del compartimento (Basler and Struhl, 1994; Tabata and Kornberg, 1994). Dpp es también un morfógeno, pero de largo alcance, que difunde a ambos lados del borde A/P formando un gradiente de concentración en base al cual las células expresan determinados genes diana, estableciéndose así el patrón en forma de bandas paralelas a dicho eje (Lecuit *et al.*, 1996; Nellen *et al.*, 1996). Por otro lado, en el borde entre el compartimento dorsal y ventral (D/V) se origina una banda estrecha de células que activan Notch, que a su vez induce la expresión de *wg* (Kim *et al.*, 1995), un morfógeno de largo alcance, que da lugar a la

formación de bandas de expresión más o menos anchas paralelas al borde D/V (Zecca *et al.*, 1996; Neumann and Cohen, 1997).

6. Control del ciclo celular en *Drosophila*

El primordio de los discos de ala consiste en 30-55 células al inicio del primer estadio larvario. Sin embargo, durante el desarrollo larvario estas células sufren 9 rondas de proliferación y los discos de ala alcanzan un tamaño de 30.000 células al final del tercer estadio larvario (Mandaravally Madhavan and Schneiderman, 1977; Martin *et al.*, 2009). Estas células se dividen siguiendo un ciclo celular clásico de cuatro fases, G1-S-G2-M, donde la entrada en una fase depende del progreso adecuado de la fase anterior (Fig. 17). La S es una fase de síntesis de ADN, mientras que en la fase de mitosis o fase M se segregan los cromosomas duplicados y se dividen las células. Por su parte, G1 y G2 son fases intermedias donde hay mucha síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento de la célula y su preparación para la siguiente fase. En la fase G1 las células pueden también salir del ciclo a una fase G0 en la que quedan en estado quiescente (Fig. 17).

La regulación del ciclo celular es fundamental para evitar, entre otras cosas, que las células se multipliquen de manera descontrolada y aparezcan enfermedades como el cáncer. Una correcta progresión del ciclo celular requiere la activación secuencial de complejos formados por la unión de quinasas dependientes de ciclina o Cdks, de expresión constante, con las proteínas reguladoras ciclinas, que varían su concentración a lo largo de las distintas fases del ciclo (Fig. 17). En la fase G1, la *ciclina D* es el primer gen que se transcribe en respuesta a señales mitogénicas. El factor de transcripción E2F se encuentra bloqueado por su unión a la proteína Retinoblastoma (RB), sin embargo, la hiperfosforilación de la proteína RB por parte del complejo Ciclina D-Cdk4/6 libera al factor E2F, pudiendo éste activar la transcripción de genes como la *ciclina E*, que regula la transición G1/S (Yamaguchi *et al.*, 1995; Duronio *et al.*, 1996; Royzman *et al.*, 1997). Los altos niveles de Ciclina E que se obtienen al final de la fase G1 permiten su unión a Cdk2 (Lehner and O'Farrell, 1990) para formar el complejo Ciclina E-Cdk2, que hiperfosforila aún más e inactiva a RB (Du *et al.*, 1996; Du and Dyson, 1999). La actividad del complejo Ciclina E-Cdk2 es necesaria y suficiente para inducir la transición de G1 a S (Knoblich *et al.*, 1994).

Al inicio de la fase S decaen los niveles de Ciclina E y comienza a acumularse Ciclina A, que junto con Cdk2 es la protagonista principal de la fase S. Ésta alcanza su pico de expresión en la etapa G2 temprana, momento en el que las células empiezan a sintetizar Ciclina B, que alcanza los niveles máximos a finales

Introducción

de G2. El complejo que forman Ciclina B y Cdk1, que necesita ser activada por la fosfatasa String (Edgar and O'Farrell, 1990), es fundamental en la transición G2/M. Finalmente, se produce la degradación de las Ciclinas mitóticas A y B y esto permite la salida de la fase M, completándose el ciclo celular y permitiendo la entrada de nuevo en fase G1.

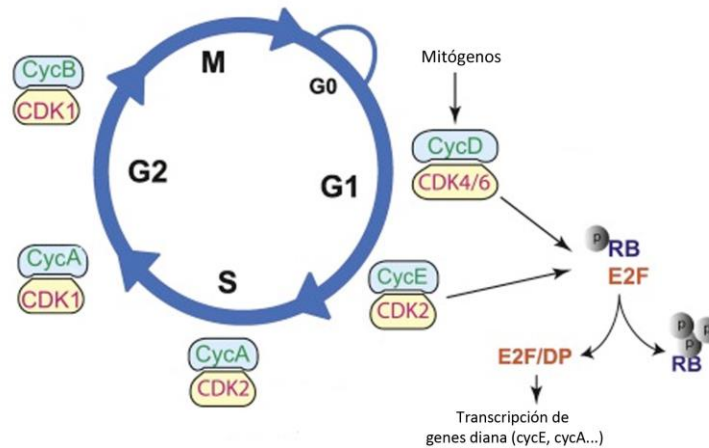


Figura 17: Fases y regulación del ciclo celular. Se representan las fases G1-S-G2-M del ciclo celular, incluyendo la salida del ciclo celular a G0 y se indican los complejos Ciclina-Cdk que actúan en cada fase. Las señales mitogénicas activan la expresión de Ciclina D, que junto con Cdk4/6 fosforila a la proteína RB, liberando así a la proteína E2F, que activa la transcripción de *ciclina E* y *ciclina A*, entre otros reguladores. El complejo Ciclina E-Cdk2 aumenta aún más la fosforilación de RB y es el encargado de la transición G1/S. Durante la fase S es importante el complejo Ciclina A-Cdk2, mientras que la regulación de la transición G2/M la llevan a cabo las Ciclinas A y B junto con Cdk1. Imagen adaptada de (Leal-Esteban and Fajas, 2020).

7. Programa apoptótico de *Drosophila* en respuesta a daño en el ADN

La integridad del genoma está bajo el ataque constante de agentes capaces de dañar el ADN y poner en riesgo la supervivencia celular. El daño al ADN se puede generar por procesos celulares endógenos como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o los errores que introduce la ADN polimerasa durante la replicación y también por medios externos como la radiación ultravioleta o la radiación ionizante. Para hacer frente a estos daños en el ADN las células ponen en marcha distintas rutas de señalización, que incluyen una parada del ciclo celular que permita la actuación de los mecanismos de reparación del ADN para evitar la transmisión de material genético erróneo y por tanto la susceptibilidad al cáncer (Zhou and Elledge, 2000; Jackson and Bartek, 2009). Sin embargo, si se ha sufrido demasiado daño se activa la apoptosis o muerte celular programada para provocar la eliminación de la célula (Roos and Kaina, 2006).

Se conoce que la vía de la quinasa ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) juega un papel crucial en respuesta al daño en el ADN. De hecho, se ha visto que la ausencia de ATM disminuye la apoptosis provocada por las rupturas en la doble cadena de ADN que induce la radiación ionizante (Duchaud *et al.*, 1996). La respuesta vía ATM se inicia cuando el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) es reclutado a la zona donde se ha producido el daño y activa a ATM (Paull, 2015) (Fig. 18). Tras el reclutamiento de ATM a la zona dañada, uno de los primeros eventos que ocurre es que fosforila a la histona H2Av (van Attikum and Gasser, 2009), lo que permite reclutar otras proteínas necesarias para que se desencadene la respuesta. Además, ATM fosforila a la quinasa Chk2 (Matsuoka *et al.*, 1998), el cual a su vez fosforila y estabiliza al factor de transcripción p53 (Aubrey *et al.*, 2018), que promueve la expresión de los genes proapoptóticos *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)* y *grim* (Brodsky *et al.*, 2000).

Además de p53, otra ruta fundamental implicada en la inducción de apoptosis es la vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK). Los Rayos X inducen daño en el ADN de manera directa, sin embargo, también lo hacen de manera indirecta a través de la formación de ROS (Wallace, 1998; Yamamori *et al.*, 2012), que activan consecuentemente la vía JNK (Santabárbara-Ruiz *et al.*, 2015). Se ha descrito que los factores de transcripción Jun y Fos de la vía JNK también se unen a los genes proapoptóticos (McEwen and Peifer, 2005a). Además, se sabe que p53 y JNK son capaces de estimularse mutuamente (Shlevkov and Morata, 2012) (Fig. 18).

La activación de las proteínas proapoptóticas por parte de p53 y de JNK desemboca en la activación de la caspasa iniciadora Dronc. En ausencia de estímulos apoptóticos, la proteína inhibidora de apoptosis de *Drosophila* Diap1, una E3 ubiquitin ligasa, ubiquitina a Dronc para enviarla a degradación (Wilson *et al.*, 2002). Sin embargo, los productos de los genes proapoptóticos se unen a Diap1 y lo antagonizan, impidiendo la degradación de la caspasa Dronc (Hay and Guo, 2006). Entonces, Dronc activa a las caspasas efectoras Dcp1 y Drice (Steller, 2008), que son proteasas que se expresan de manera ubicua pero en forma de zimógenos inactivos, de manera que, una vez activadas, proteolizan los componentes celulares provocando su apoptosis (Fig. 18).

p53 y JNK no actúan solamente *upstream* (por encima) de la ruta apoptótica, ya que se ha visto que también son activados por Dronc por proteólisis, dando lugar así a la existencia de un bucle que amplifica la respuesta apoptótica para asegurar la ejecución de la muerte celular tras un estímulo (Shlevkov and Morata, 2012).

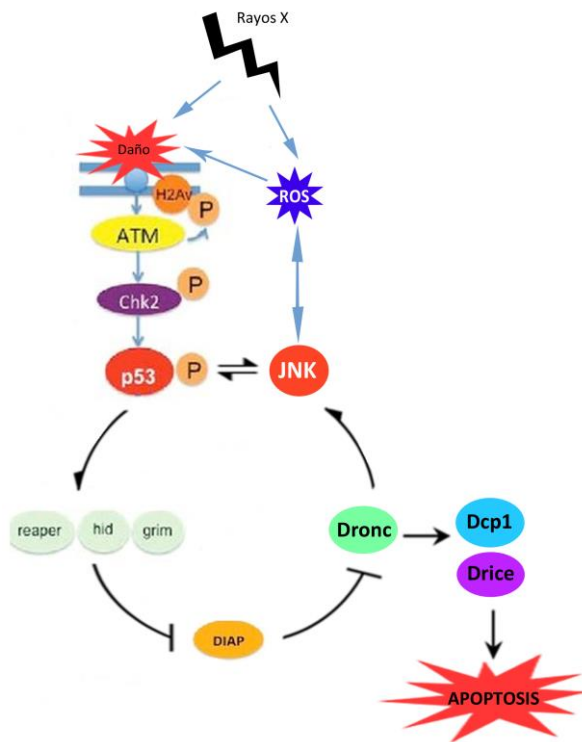


Figura I8: Ruta apoptótica en respuesta a daño en el ADN en *Drosophila*. Los Rayos X producen roturas en la doble cadena de ADN y conducen también a la liberación de ROS, que a su vez dañan el ADN. En respuesta a este daño, se recluta la quinasa ATM, que fosforila a la histona H2Av y a Chk2, que a su vez fosforila y activa a p53. En paralelo, JNK es activada por la presencia de ROS. p53 y la vía JNK activan la transcripción de los genes proapoptóticos *rpr*, *hid* y *grim*. Estos activan a la caspasa iniciadora Dronc por medio de la degradación de la proteína inhibidora de apoptosis Diap1. Dronc proteoliza y activa a las caspasas efectoras Dcp1 y Drice, que degradan las estructuras celulares, provocando así la muerte de la célula.

8. Vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)

La vía JNK es una ruta de señalización de la familia de las MAP quinasas conservada en vertebrados y que está implicada en diversas funciones, como la apoptosis, la migración celular, la proliferación celular y la regeneración.

Esta vía se activa por el Factor de Necrosis Tumoral alfa Eiger (Egr/TNF α) (Herrera and Bach, 2021) (Fig. I9). Este ligando activa a los receptores TNF (TNFR) Wengen (Wgn) y Grindelwald (Grnd), lo que desencadena una cascada de quinasas que se activan unas a otras a través de sucesivas fosforilaciones: Mishappen (Msn/JNKKKK), dTAK1 (JNKKK), Hemipterous (Hep/JNKK) y Basket (Bsk/JNK). La quinasa Bsk/JNK fosforila y activa a los factores de transcripción Jun y Fos, que en conjunto constituyen el heterodímero AP-1. Este factor regula la transcripción de numerosos genes diana, entre los cuales se encuentra *puckered (puc)*, una fosfatasa que defosforila e inhibe a Bsk/JNK, actuando así como un regulador negativo de la vía. A su vez, otros genes diana conocidos son: Metaloproteasa 1 (Mmp1), una proteasa que degrada la matriz extracelular; *unpaired (upd)*, que codifica una citoquina capaz de unirse y activar la vía de señalización JAK/STAT; y los mitógenos Wg y Dpp (Fig. I9).

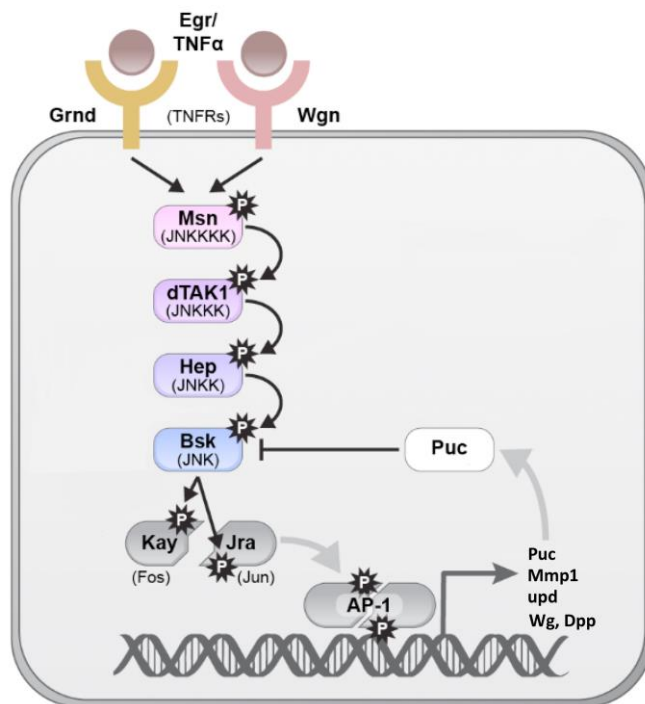


Figura I9: Vía de señalización de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK) en *Drosophila*. El ligando Eiger (Egr/TNF α) se une a los receptores TNF Grnd y Wgn, activando una cascada de quinasas: Msn/JNKKKK, dTAK1/JNKKK, Hep/JNKK y Bsk/JNK. Bsk/JNK fosforila a los componentes del factor de transcripción AP-1 Jun y Fos. Los genes diana de la ruta incluyen a *puc*, que codifica una fosfatasa que inactiva a Bsk/JNK, formando un bucle de retroalimentación negativa. Otros genes diana de la vía JNK son *Mmp1*, *upd*, *Wg* y *Dpp*. Imagen modificada de (Herrera and Bach, 2021).

Tal y como hemos mencionado en el apartado anterior, en *Drosophila*, la apoptosis inducida por Rayos X está en parte mediada por la vía JNK, ya que se ha visto que es capaz de provocar la activación del gen proapoptótico *rpr* (McEwen and Peifer, 2005a). Además, la apoptosis que se produce en la célula “loser” como consecuencia de la competición celular (ver apartado 11 de la Introducción) también se encuentra mediada por la vía JNK (Moreno *et al.*, 2002; De La Cova *et al.*, 2004; Moreno and Basler, 2004). Esta función proapoptótica de la vía JNK es autocrina, ya que produce la muerte de la célula que lo activa. Sin embargo, tiene además una función paracrina, ya que las células que expresan JNK secretan señales proliferativas que estimulan el crecimiento de las células de alrededor, siendo responsables del desarrollo de muchos tumores (Pinal *et al.*, 2019). Estas señales proliferativas que dependen de la vía JNK parecen estar mediadas por vías de señalización *downstream* (por debajo) como JAK/STAT, Wg y Dpp (Huh *et al.*, 2004; Pérez-Garijo *et al.*, 2004, 2009; Ryoo *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010; La Fortezza *et al.*, 2016). Esta función paracrina fue originalmente descubierta en un modelo de células no muertas o células “undead”, que permanecen vivas de manera indefinida porque tienen el programa apoptótico activo pero incapaz de ser completado. Sin embargo, esta capacidad paracrina de estimular la proliferación celular es una propiedad intrínseca de la vía JNK que no depende de su función apoptótica, ya que una activación persistente de la vía en células deficientes para apoptosis también induce tumorigénesis (Pinal *et al.*, 2018).

9. Estudio del cáncer en *Drosophila*

Drosophila es un organismo apropiado para estudiar los aspectos genéticos y moleculares de la tumorigénesis. A pesar de tener una vida adulta corta (unos 40 días a 25°C) en comparación con los mamíferos, envejece y sus células acumulan mutaciones, lo que aumenta la probabilidad de adquirir una transformación maligna. De hecho, se ha descrito que las moscas desarrollan de forma natural tumores en los testículos y el intestino y que la incidencia de estos tumores aumenta con la edad (Salomon and Rob Jackson, 2008).

El tamaño mínimo detectable de un tumor por los métodos que se utilizan en clínica es de aproximadamente 10^9 células, por lo que es evidente que el tumor ha estado creciendo durante mucho tiempo antes de haber podido ser detectado (Moreno, 2008; Campbell *et al.*, 2010; Yachida *et al.*, 2010). Esto revela la gran importancia de analizar las primeras etapas del desarrollo tumoral, que no son accesibles al análisis experimental en vertebrados. Sin embargo, este problema se puede solventar fácilmente en *Drosophila*, donde es posible, gracias a los métodos de mosaicos genéticos (ver Materiales y Métodos: Análisis clonal), seguir el desarrollo de un tumor desde su comienzo como una sola célula oncogénica.

Además, muchos de los genes asociados con cáncer en humanos existen también en *Drosophila* y están a su vez asociados con la formación de tumores (Adams *et al.*, 2000), por lo que se ha convertido en un modelo útil para explorar las bases genéticas del cáncer.

La mayor parte de la información sobre tumorigénesis en *Drosophila* proviene de estudios de una serie de mutaciones letales que causan sobrecrecimientos tumorales durante el periodo larvario. Se trata de mutaciones en genes que colectivamente se conocen como Genes Supresores de Tumores (TSGs) y que controlan diferentes procesos celulares que no son directamente la proliferación celular (Hariharan and Bilder, 2006; Morata and Calleja, 2020). Algunos ejemplos son los genes *scribble* (*scrib*), *lethal giant larvae* (*lgl*) y *discs-large* (*dlg*), donde las proteínas codificadas por ellos están implicados en el mantenimiento de la polaridad apico-basal de las células epiteliales, necesario para las uniones célula-célula (Bilder, 2004; Menéndez *et al.*, 2010). Además, mutaciones en genes implicados en endocitosis como *rab5*, *erupted* (*ept*), *avalanche* (*avl*) y *vsp25* también provocan sobrecrecimientos tumorales en *Drosophila* y se agrupan en la categoría de TSGs (Lu and Bilder, 2005; Moberg *et al.*, 2005; Vaccari and Bilder, 2005; Menut *et al.*, 2007).

Una característica común de estos TSGs es que son mutaciones letales pero permiten el desarrollo larvario, de hecho, las larvas crecen durante un periodo muy extenso durante el cual las células continúan proliferando y dan lugar a sobrecrecimientos dramáticos en los discos imaginales y tejidos nerviosos, hasta que finalmente la larva gigante muere. No se comprende por completo por qué el mal funcionamiento de procesos como la polaridad celular o la endocitosis provocan tumorigénesis, pero es de interés que muchos de estos genes de *Drosophila* tienen homólogos humanos que también están asociados con diversos tipos de cáncer (Morata and Calleja, 2020).

10. *polyhomeotic*: potencial tumorígeno

Otro ejemplo de Gen Supresor de Tumores en *Drosophila* es el gen *polyhomeotic* (*ph*), que pertenece al complejo PRC1 del PcG. Tiene tres ortólogos en humanos: PHC1, PHC2 y PHC3 (Fig. 13). El papel de PHC2 en cáncer no se ha investigado con claridad (Hu *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha visto que los niveles de expresión de PHC1 están disminuidos en un subtipo de Linfomas B de células grandes (LBCL) (Raaphorst *et al.*, 2004), uno de los tipos de linfomas más frecuentes y agresivos en el adulto. Además, también se ha descrito una falta de expresión de PHC1 en la leucemia linfoblástica aguda infantil (ALL), que se asocia a una pérdida de heterocigosidad del gen (Tokimasa *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha visto que PHC3 también actúa como TSG en osteosarcomas humanos, un tumor óseo que afecta principalmente a niños y a adolescentes, que se ha visto asociado tanto con una pérdida de heterocigosidad de PHC3 (Deshpande *et al.*, 2007) como con una mutación con cambio de sentido en dicho gen (Iwata *et al.*, 2010).

Estudios genéticos en *Drosophila* muestran que, al igual que en humanos, la falta de función de *ph* da lugar a la formación de tumores neoplásicos en los discos imaginales. Se han realizado investigaciones para comprender el papel tumorígeno de las mutaciones en *ph*, mayormente en los discos de ojo y de ala (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011; Beira *et al.*, 2018). En estos trabajos se ha descrito que la falta de función de *ph* conduce a la derepresión de las vías de señalización JNK, JAK/STAT y Notch. Es de interés que la activación ectópica de JAK/STAT y JNK contribuyen al crecimiento de estos tumores de forma independiente, mientras que Notch actúa mayormente downstream de JNK (Beira *et al.*, 2018). Otras vías de señalización mitogénicas como EGFR, Ras, Hippo y Myc no se han visto significativamente alterados en tumores provocados por la falta de función de *ph* (Classen *et al.*, 2009).

Por otra parte, análisis del perfil de expresión génica de células *ph* mutantes tumorales de la larva han determinado que éstas pierden su identidad larvaria para adquirir una identidad embrionaria, donde la

activación ectópica de factores de transcripción embrionarios como *knirps* juega un papel importante en el comportamiento tumorigénico de dichas células (Torres *et al.*, 2018). Se ha descrito que la falta de *ph* también confiere una actividad ectópica de genes Hox y otros genes selectores que modifica la identidad de las células imaginales (Randsholt *et al.*, 2000; Beuchle *et al.*, 2001; Oktaba *et al.*, 2008)

11. Competición celular

Si se considera el número total de células del cuerpo humano, el número de genes y la frecuencia de mutación somática por célula, es claro que en cualquier momento de su vida, los tejidos de un individuo contienen numerosas células mutantes que son aberrantes o malignas y que podrían comprometer la viabilidad del organismo (Martincorena, 2019). Esto indica que, muy probablemente, existen mecanismos específicos de tejido de eliminación de estas células, además del proporcionado por el sistema inmune.

Uno de estos mecanismos es la competición celular (Morata, 2021), un proceso homeostático que se describió en *Drosophila* (Morata and Ripoll, 1975) pero que hay evidencia de su conservación en el reino animal (Oliver *et al.*, 2004; Oertel *et al.*, 2006; Clavería *et al.*, 2013; Sancho *et al.*, 2013; Penzo-Méndez *et al.*, 2015; Ellis *et al.*, 2019). Se trata de una interacción entre dos tipos de células viables (“winner” y “loser” (Abrams, 2002)) que conduce a la eliminación por apoptosis de uno de los dos tipos, la “loser”. Es un mecanismo dependiente de contexto, ya que las células “loser” son perfectamente viables cuando están rodeadas por otras del mismo genotipo y solamente mueren cuando se rodean por las células “winner” (Fig. I10). Es importante mencionar que el factor crítico en la inducción de apoptosis en competición celular es la activación de la vía JNK en las células “loser” (Moreno *et al.*, 2002). Otra característica importante de la competición celular es que es un mecanismo de corto alcance, ya que ocurre entre células que se encuentran muy próximas (Simpson and Morata, 1981; Levayer *et al.*, 2015). Sin embargo, cabe destacar que la competición celular no ocurre en el borde de compartimentos A/P, a pesar de que las células de ambos compartimentos están en contacto físico a lo largo del borde (Simpson, 1976; Simpson and Morata, 1981). Se sabe que existen diferencias de afinidades celulares entre compartimentos y regiones diferentes del disco de ala (García-Bellido, 1966; Morata and Lawrence, 1975) y se ha propuesto (Morata, 2021) que estas diferencias podrían impedir o dificultar las íntimas interacciones necesarias entre las células “winner” y “loser” para que ocurra la competición celular.

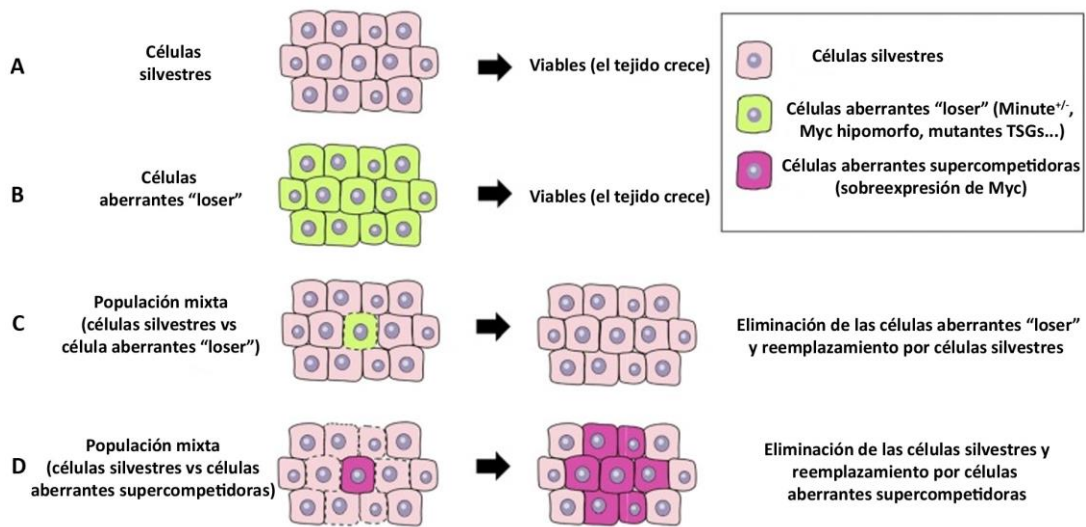


Figura I10: Competición celular. Se ejemplifican las distintas respuestas de un tejido que es capaz de eliminar por competición celular células silvestres y células aberrantes “loser”, que rodeadas de sí mismas son viables (A,B), pero no cuando se encuentran en una población mixta de células (C,D). En el escenario clásico de competición celular son las células aberrantes “loser” (por ejemplo células *Minute*^{+/-}, hipomorfas para Myc o mutantes para algún Gen Supresor de Tumores) las que son eliminadas (C), pero en ocasiones son las células aberrantes las que adquieren una ventaja proliferativa (por ejemplo células con altos niveles de Myc) y eliminan a las células silvestres, en un fenómeno que se conoce como supercompetición (D). Imagen adaptada de (Kim and Jain, 2020).

Las primeras descripciones del fenómeno de competición celular (Morata and Ripoll, 1975; Simpson, 1979; Simpson and Morata, 1981) procedieron del análisis de mutaciones dominantes llamadas *Minute* (*M*) de *Drosophila*. Los genes *M* codifican proteínas ribosomales, de modo que sus mutaciones afectan a la traducción y disminuyen la capacidad de síntesis de proteínas. Las larvas heterocigóticas para *M* (*M*^{+/-}) son viables y dan lugar a adultos fértiles, que únicamente presentan cierto retraso en el desarrollo. Sin embargo, lo interesante es que se observó que cuando los clones de células *M*^{+/-} se rodean de células *M*^{+/+} silvestres son eliminadas. Más adelante, se describieron también otros escenarios fisiológicos que implican la eliminación por competición celular de células viables pero con niveles metabólicos mas bajos de lo normal, como es el caso de células mutantes para alelos viables del gen *dmyc* (el ortólogo en *Drosophila* del oncogen Myc de vertebrados), que codifica un factor de transcripción implicado en proliferación celular (Johnston *et al.*, 1999), y también el caso de células mutantes para el gen *chico*, que codifica el sustrato del receptor de la insulina (Böhni *et al.*, 1999). La competición celular no solo se ha descrito en los discos imaginales durante el desarrollo, sino también en clones generados en el intestino adulto de *Drosophila* (Kolahgar *et al.*, 2015).

Introducción

La competición celular es un mecanismo de control de calidad que identifica y elimina de los tejidos células viables que son subóptimas o incluso células normales que adquieren una identidad posicional incorrecta en el tejido, como es el caso de células con niveles incorrectos de Dpp o del gen *spalt* (Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Milán *et al.*, 2002). Es un mecanismo de gran relevancia fisiológica que contribuye a la homeostasis general del cuerpo animal y cuya existencia se ha visto que aumenta la esperanza de vida en *Drosophila* (Merino *et al.* 2015).

Además, la competición celular realiza una función muy importante en identificar y eliminar células que adquieren mutaciones tumorales, que también se detectan como diferentes en comparación con sus vecinas. Esta propiedad establece la función supresora de tumores de la competición celular, que opera para eliminar células mutantes para los TSGs mencionados anteriormente (*scrib*, *lgl*, *dlg*, *rab5*, *ept*, *avl* y *vsp25*), donde la norma general es que mientras que dominios completos o compartimentos mutantes para cualquiera de estos genes desarrollan grandes sobrecrecimientos tumorales, los clones aislados se comportan como “loser”, siendo eliminados por apoptosis mediada por JNK (Igaki *et al.*, 2009; Menéndez *et al.*, 2010; Tamori *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Ballesteros-Arias *et al.*, 2014). También se han encontrado evidencias de este rol supresor de tumores de la competición celular en mamíferos (Norman *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2017).

A pesar de que una función principal de la competición celular es la eliminación de células tumorales, se ha visto que en determinadas circunstancias puede estimular el crecimiento tumoral. Un mecanismo en el que la competición celular favorece la progresión tumoral es el de protección de grupo (Menéndez *et al.*, 2010; Ballesteros-Arias *et al.*, 2014; Morata and Calleja, 2020). Esto ocurre cuando se genera un grupo suficientemente grande de células tumorales, un “microambiente”, en el que las células del interior del grupo están protegidas, evaden la competición celular y continúan proliferando. Esto se debe a que la competición celular es un mecanismo de corto alcance, que en estas condiciones solo ocurre en la periferia del grupo. Las células del borde son eliminadas por apoptosis y emiten señales proliferativas que estimulan la proliferación de las células de su alrededor. El borde se mantiene de forma continua, por lo que existe una secreción permanente de señales proliferativas que alimentan el crecimiento del tumor. Así pues, el crecimiento del tumor depende de que haya apoptosis y esta apoptosis deriva de la competición celular en la periferia del tumor.

Otro mecanismo que puede contribuir a tumorigénesis deriva del fenómeno de supercompetición celular (De La Cova *et al.*, 2004; Moreno and Basler, 2004), que proviene de la observación de que células modificadas con altos niveles de *dmyc* son capaces de eliminar a células silvestres con la dosis normal de

dmyc, actuando así como “loser” (Fig. 110 D). El hecho de que *dmyc* es un oncogen hace muy atractiva la idea de que la supercompetición puede funcionar como un mecanismo pro-tumorigénico que contribuye a que las células tumorales colonicen el tejido (Rhiner and Moreno, 2009; Casas-Tinto *et al.*, 2011). La evidencia más sólida a favor de esta hipótesis viene de experimentos en adenomas intestinales dirigidos por mutaciones *APC^{-/-}* en *Drosophila*, que demuestran que el crecimiento de los tumores está condicionado por la eliminación de las células “loser” silvestres del tejido (Suijkerbuijk *et al.*, 2016). Posteriormente, se han descrito también otros ejemplos de supercompetición en células con activación elevada de la vía JAK/STAT (Rodrigues *et al.*, 2012) o que sobreexpresan Yorkie (Yki) (Ziosi *et al.*, 2010) o Wg (Vincent *et al.*, 2011). Sin embargo no hay evidencia de que los sobrecrecimientos que se observan en estas células dependan directamente de la competición celular, es decir, que su crecimiento se deba a la eliminación de las células “loser”. En el caso de la sobreexpresión de Yki, por ejemplo, las células afectadas tienen mayor nivel proliferativo que las silvestres y podrían generar tumores por sus propiedades superproliferativas.

Un aspecto que aún no está resuelto son los mecanismos moleculares implicados en la competición celular. Existe una primera etapa de naturaleza desconocida en la que las células interaccionan y adquieren el estatus “loser” o “winner”. Las células “loser” generalmente son células subóptimas, que tienen una identidad diferente o que son malignas. Dado que la interacción ocurre entre células que están muy cercanas o en contacto físico, es probable que las estructuras funcionales de las membranas celulares estén implicadas en este mecanismo de reconocimiento. Un evento temprano pero posterior al paso de reconocimiento es que las células “winner” y “loser” expresan distintas isoformas de la proteína transmembrana Flower (Rhiner *et al.*, 2010).

Una vez que se establecen los estados “loser” o “winner” de las células, se produce la apoptosis mediada por JNK en la célula “loser”. Para ello, se han descrito varios mecanismos responsables, como es el caso del sistema receptor/ligando Sas/PTP10D, que conduce a la eliminación vía JNK de células mutantes para *scrib* (Yamamoto *et al.*, 2017) y también el caso de los altos niveles de estrés oxidativo (ROS) en células mutantes para *M*, *mahjong* y *scrib*, que determinan su estado “loser” (Kucinski *et al.*, 2017; Pinal *et al.*, 2019) y activan la vía JNK (Santabábara-Ruiz *et al.*, 2015).

A pesar de los diversos mecanismos que se han descrito en los distintos escenarios de competición celular (Nagata and Igaki, 2018) aún no se ha encontrado un modelo unificado. Es posible que actúen varios mecanismos diferentes, dependiendo del contexto local.



Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto tumorigénico de células con falta de función del gen *polyhomeotic* (*ph*) y su relación con el fenómeno de competición celular en el disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar los efectos provocados por la falta de función de *ph* y, en especial, la respuesta tumorigénica, en diferentes regiones del disco de ala:
 - Eliminación de *ph* en la región torácica (*notum*)
 - Eliminación de *ph* en el apéndice
- 2) Analizar el comportamiento de clones de falta de función de *ph* generados en un contexto de función normal de *ph* y estudiar su respuesta al fenómeno de competición celular.

Materialles y métodos

1. Sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS}

Los experimentos de esta tesis se realizaron utilizando el sistema genético Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993), que permite controlar la expresión de un transgén de interés en regiones específicas de un tejido. El método consiste en cruzar una línea parental que tiene una secuencia *Gal4* y otra línea parental con la secuencia *UAS* (*Upstream Activation Sequence*), de manera que en la descendencia F1 se combinan ambos elementos (Fig. MM1 A). La secuencia *Gal4* codifica el factor activador transcripcional Gal4 y se coloca bajo el control del promotor de un gen conocido, que dirigirá la transcripción de este factor a su correspondiente región de expresión. Por otro lado, el *UAS* es una secuencia reguladora activadora que consiste en sitios de unión para el factor Gal4 y que se coloca delante del transgén de interés que queremos expresar. De esta manera, cuando se produce la proteína Gal4 en una determinada región y momento, ésta es capaz de unirse a la secuencia *UAS*, activando así la expresión del transgén de interés específicamente en esa región (Fig. MM1 A).

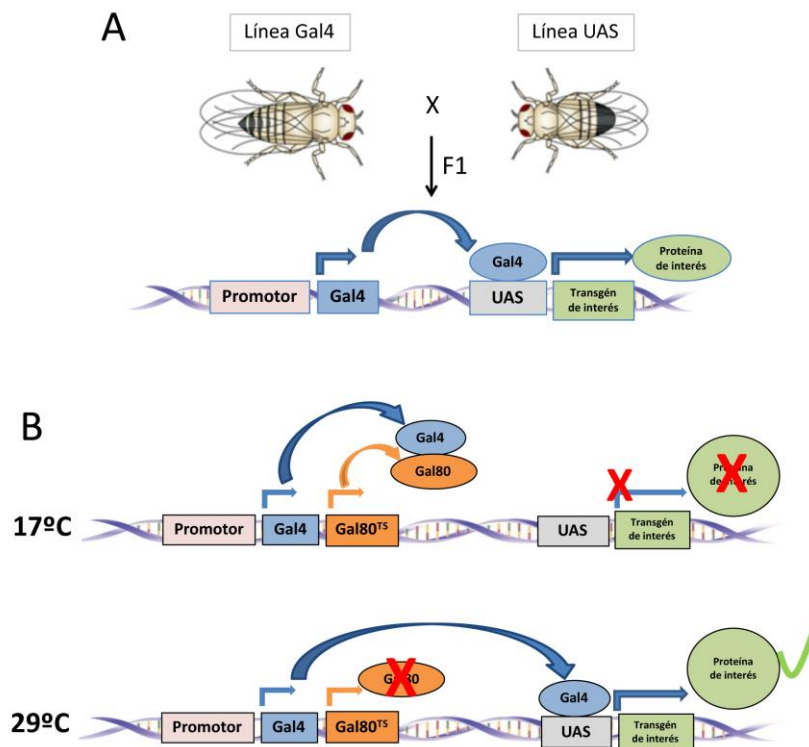


Figura MM1: Sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS}. A) El sistema Gal4/UAS es un sistema de expresión génica muy utilizado en *Drosophila* que consiste en combinar una estirpe con una secuencia *Gal4* unida a un promotor específico con otra línea que lleva un transgén de interés bajo el control de la secuencia *UAS*. En la descendencia F1, que poseerá ambos elementos, el activador transcripcional Gal4 se une a su secuencia diana *UAS*, promoviendo así la transcripción del transgén de interés específicamente en el tejido que determina la región reguladora del factor Gal4. B) Además de este control espacial, el uso de la construcción *Gal80^{TS}* (presente en todas las células al expresarse bajo el control del promotor *tubulina*) añade un control temporal al sistema Gal4/UAS. Se trata de una proteína termosensible que es funcional a 17°C y que actúa uniéndose e inhibiendo al factor Gal4, de manera que a esta temperatura no se produce la transcripción del transgén de interés bajo el *UAS*. Por el contrario, a 29°C la proteína Gal80^{TS} se inactiva y el sistema Gal4/UAS funciona con normalidad.

Este sistema permite sobreexpresar ectópicamente una determinada proteína y también realizar experimentos de falta de función de una proteína, ya sea utilizando como transgén de interés un ARN de interferencia (moléculas de ARN de doble cadena que permiten el silenciamiento de genes debido a la degradación de sus ARN mensajeros, Fire et al., 1998) o mediante la expresión de una forma dominante negativa de la proteína en cuestión.

Para aumentar la precisión del sistema Gal4/UAS y controlar temporalmente el momento del desarrollo en el que se quiere expresar el transgén de interés se puede añadir un tercer elemento, el Gal80^{TS}. Se trata de una secuencia que codifica la proteína termosensible Gal80 y que se coloca bajo el control de la región reguladora del gen *tubulina*, de modo que se expresa en todas las células de la mosca (McGuire et al., 2003). Esta proteína actúa uniéndose al factor de transcripción Gal4 e impidiendo su función. El Gal80^{TS} es una proteína sensible a la temperatura, de manera que a la temperatura permisiva de 17°C es funcional y boquea al factor Gal4, que no puede unirse a la secuencia *UAS* y por tanto la expresión del transgén de interés queda impedida (Fig. MM1 B). Por el contrario, a una temperatura restrictiva de 29°C la proteína Gal80^{TS} se inactiva, no inhibe el Gal4 y por tanto permite el funcionamiento del sistema Gal4/UAS (Fig. MM1 B). Durante los experimentos basta con mantener las moscas a 17°C y pasarlas a 29°C en el momento y durante el periodo de tiempo en el que queramos tener activa la expresión del transgén de interés.

2. Análisis clonal

Para analizar el comportamiento de grupos de células genéticamente diferentes a las células del resto del tejido se indujeron clones mediante el sistema FLP/FRT (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993).

Las secuencias *FRT* (Flippase Recognition Target) son las secuencias diana de la enzima recombinasa Flipasa (FLP), que produce la recombinación entre dichas secuencias, dando lugar a un tejido mosaico con clones.

La expresión del gen que codifica la Flipasa se puede controlar de varias maneras (Struhl and Basler, 1993). Por una parte, se puede utilizar una construcción *hs-flp122* en la que la Flipasa se encuentra bajo el control de un promotor sensible a la temperatura (promotor “heat-shock”, *hs*), que induce su expresión a temperaturas superiores a 34°C. Por tanto, para que se produzca la recombinación entre las secuencias *FRT* y se generen clones basta con someter a las larvas a un choque térmico en el momento del desarrollo que deseamos inducirlos y durante un tiempo determinado. Es importante mencionar que a mayor temperatura y tiempo se obtendrán más clones y que éstos se encontrarán distribuidos en todos los tejidos del individuo.

Por otro lado, la expresión de la Flipasa también puede controlarse mediante la combinación del sistema FLP/*FRT* con el método Gal4/*UAS*. Esta técnica permite dirigir su expresión y, por tanto, la recombinación y la inducción de clones a una región concreta del individuo, ya que la Flipasa se coloca bajo el control de una secuencia *UAS* (*UAS-flp*) y el factor Gal4 determina el lugar donde ocurrirá la transcripción de la misma.

Para la realización de esta tesis indujimos dos tipos de clones mediante la técnica FLP/*FRT*, en función de la localización de las secuencias *FRT*:

2.1. Inducción de clones mutantes nulos *ph*⁵⁰⁵

Las secuencias *FRT* (representadas por el signo “>” en los genotipos) pueden estar localizadas en varias posiciones. Por una parte, se pueden localizar en la misma posición de brazos cromosómicos homólogos, en cuyo caso la Flipasa induce una recombinación en “trans” en esa misma posición, dando lugar a células homocigóticas para ese brazo cromosómico. La inducción de estos clones requiere que ocurra una división celular, para que se pueda producir la recombinación mitótica entre los cromosomas homólogos.

Este fue el método que utilizamos para la generación de clones mutantes para el alelo nulo *ph*⁵⁰⁵ (Fig. MM2). El genotipo de las larvas de partida fue *hs-flp122, ph*⁵⁰⁵, *FRT19A/H2Av-GFP, FRT19A*. Esto implica que partimos de un disco imaginal de ala con células heterocigóticas para la mutación *ph*⁵⁰⁵ (en la imagen, rectángulo rojo) y para el marcador de histonas *H2Av-GFP* (rectángulo verde), que se expresa de manera

Materiales y métodos

ubicua en todas las células, por lo que las células del disco serán verdes y silvestres para el gen *ph* (mantienen una copia normal del gen). Además, estas células llevan la construcción *hs-flp122*, de manera que un choque térmico permite la producción de la Flipasa y la formación de clones por todo el disco imaginal de ala.

Durante la fase S del ciclo celular se produce la duplicación de las cromátidas, que se emparejan en la fase G2 (Fig. MM2). Tras el choque térmico, la Flipasa producirá la recombinación mitótica en “trans” entre las secuencias *FRT19A* de los cromosomas homólogos, que se segregarán dando lugar a dos células hijas genéticamente diferentes: por un lado, una célula homocigótica para la mutación *ph*⁵⁰⁵ que se marca por la ausencia de GFP (0XGFP) y que tras varias divisiones celulares dará lugar al “clon *ph*⁵⁰⁵”, y, por otra parte, una célula homocigótica para el gen silvestre *ph* que se diferencia del resto de las células del disco imaginal (1XGFP) por tener dos copias del marcador GFP (2XGFP). Esta célula dará lugar al denominado clon gemelo o “twin” silvestre, que servirá como control interno de los clones mutantes inducidos exactamente en el mismo momento (Fig. MM2).

Salvo que se especifique lo contrario, las condiciones experimentales para inducir estos clones fueron las siguientes: las larvas se mantuvieron a 25°C durante todo el desarrollo, salvo durante el choque térmico que dimos de 30 minutos a 37°C tres días después de la puesta de embriones. A continuación, las larvas se fijaron al menos 3 días tras la inducción de los clones *ph*⁵⁰⁵.

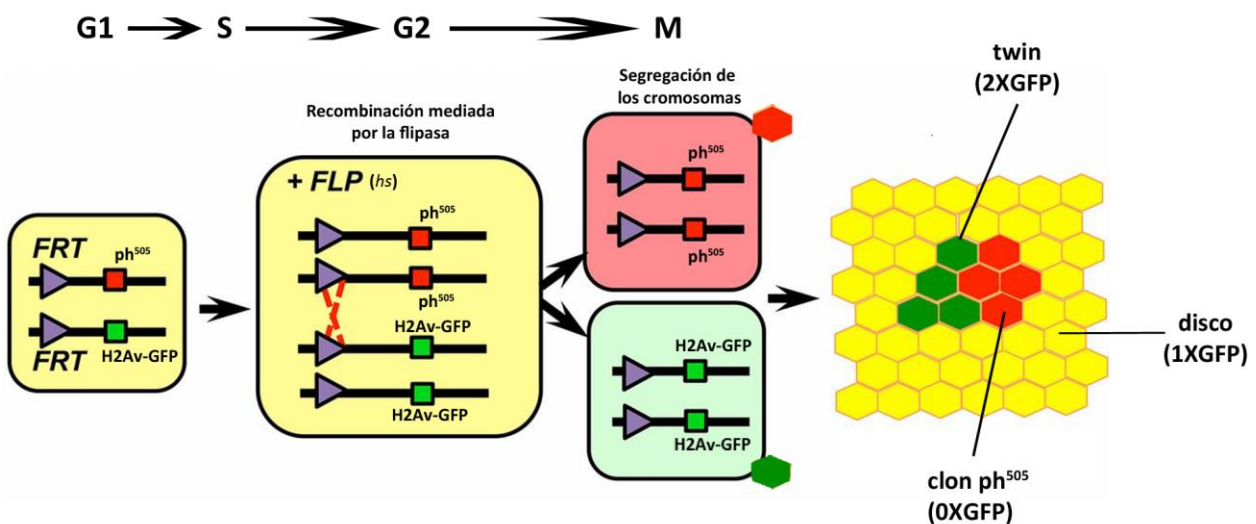


Figura MM2: Sistema FLP/FRT para la inducción de clones mutantes nulos ph^{505} mediante recombinación mitótica en “trans”. Partiendo de una célula heterocigótica $ph^{505}/H2Av-GFP$ y, tras la duplicación de las cromátidas hermanas en la fase S, se induce mediante un choque térmico (hs) la producción de la recombinasa Flipasa, que producirá la recombinación mitótica entre dos secuencias FRT del mismo brazo de cromosomas homólogos. Tras la segregación de los cromosomas en la mitosis se producirán dos tipos de células hijas, que tras su división darán lugar a dos tipos de clones: clones con dos copias de la mutación ph^{505} marcados por la falta de GFP (representados por rombos rojos) y clones “twin” silvestres con dos copias de GFP (rombos verdes), mientras que el resto de las células del disco permanecerán heterocigóticas para ph y con una única copia de GFP.

Mediante este método de recombinación de la Flipasa en “trans” también indujimos clones ph^{505} específicamente en el dominio Spalt (Sal), en lugar de hacerlo en todo el disco. Para ello, las larvas experimentales que se utilizaron tenían el siguiente genotipo: $ph^{505}, FRT19A/hs-flp122, ubi-RFP, FRT19A; sal^{EPV}>GFP, UAS-flp$. En este caso, las moscas llevaban una construcción $hs-flp122$ pero no nos interesaba hacer uso de ella, por lo que mantuvimos los tubos a 17°C durante todo el desarrollo para evitar que el promotor hs se activase accidentalmente. Este experimento no requiere dar un choque térmico a las larvas, y la manera de controlar la expresión de la Flipasa fue mediante una secuencia $UAS-flp$ bajo el control del factor Gal4 regulado por el promotor del gen sal . Esto hace que la Flipasa solo se exprese en el dominio Sal, marcado por GFP, y por tanto sea la única región del disco en el que se inducen los clones ph^{505} , marcados por la ausencia de RFP, ya que el marcador que llevamos en heterocigosis en este caso es la $ubi-RFP$.

2.2. Inducción de clones con ARNi frente a ph : El método flip-out

Por otro lado, las secuencias FRT también pueden estar colocadas en el mismo brazo cromosómico y se dice que la Flipasa produce una recombinación en “cis” (Fig. MM3). En este caso, la célula no necesita que haya una mitosis para que se produzca la recombinación y es un método que se utiliza para eliminar de manera controlada de la célula la secuencia de ADN comprendida entre las secuencias FRT , dando lugar a clones que se conocen como clones “flip-out” (Struhl and Basler, 1993).

El genotipo de las larvas en las que indujimos los clones fue el siguiente: $ywhs-flp122; act>y^+, STOP>Gal4, UASGFP; UASph^{KD}$, pudiendo estar el cassette $act>y^+>Gal4, UASGFP$ en el cromosoma III o estar recombinado con un $UAS-RFP$ (Fig. MM3). El factor Gal4 está regulado por el promotor de la *actina* (*act*), que se expresa de forma ubicua, sin embargo, llevamos un codón de parada (STOP) entre ellas, lo que hace que el promotor de la *actina* no pueda dirigir la expresión del factor Gal4. Por tanto, en

Materiales y métodos

condiciones normales el sistema Gal4/UAS está impedido. En cambio, si se induce un choque térmico, en algunas células del disco se producirá la Flipasa y producirá la recombinación entre las secuencias *FRT*, permitiendo la eliminación del codón de parada y el funcionamiento de la *act-Gal4* de forma indeleble en esa célula y en su descendencia. Estas células expresarán por tanto los transgenes de interés GFP y el ARNi de *ph*, lo que dará lugar a la generación de clones verdes con falta de función de *ph* en un tejido silvestre (Fig. MM3). En algunos experimentos, generamos clones control con ganancia de GFP únicamente y en otros casos generamos clones doble mutantes para *ph* y algún otro gen.

Salvo que se especifique lo contrario, las condiciones experimentales para inducir estos clones fueron las siguientes: las larvas se mantuvieron a 25°C durante todo el desarrollo, salvo durante el choque térmico que dimos de 8 minutos a 37°C tres días después de la puesta de embriones. A continuación, las larvas se fijaron al menos 3 días tras la inducción de clones.

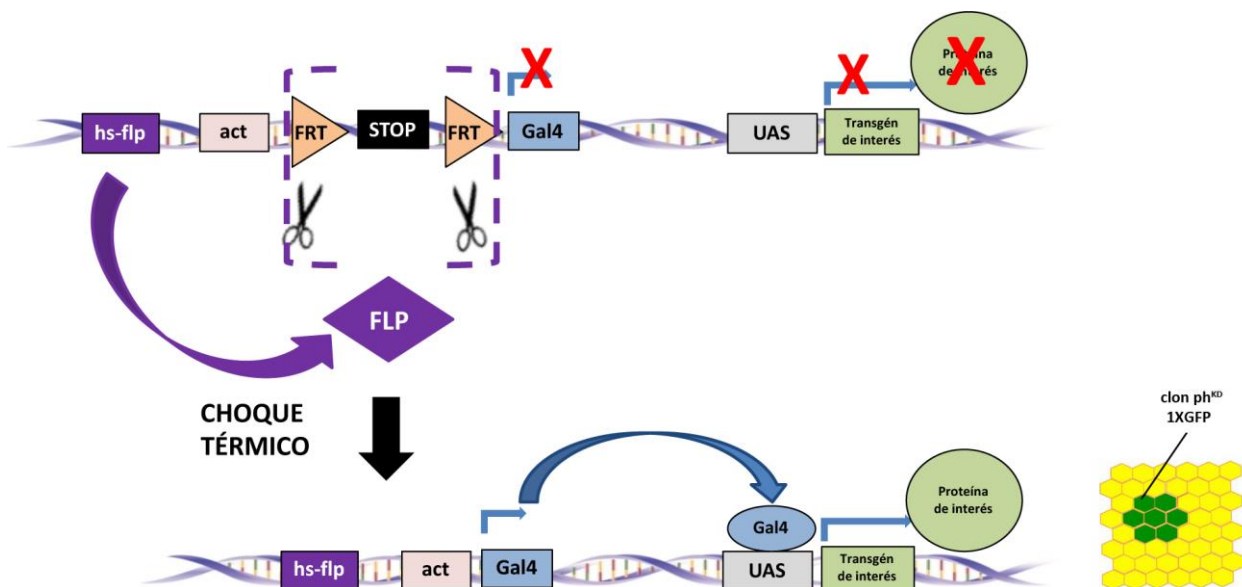


Figura MM3: Sistema FLP/FRT para la inducción de clones con ARNi frente a *ph* mediante recombinación en "cis" o "flip-out". Las células del disco de ala poseen una construcción *act-Gal4* que está flanqueada por unas secuencias *FRT* y un codón *STOP*, de manera que el sistema Gal4/UAS está impedido. Sin embargo, tras la inducción de un choque térmico a 37°C se produce la proteína Flipasa, que induce la recombinación entre las secuencias *FRT* y la eliminación del codón de parada, permitiendo la transcripción del factor Gal4 por el promotor de la *actina* y por tanto la transcripción del transgén de interés bajo el *UAS*.

3. Cultivo y mantenimiento de *Drosophila melanogaster*

Las distintas líneas de *Drosophila* se criaron en tubos con medio de cultivo preparado a base de harina, glucosa, agar, levadura y ácido propiónico. Las moscas se mantuvieron en cámaras de incubación en condiciones de humedad relativa (75%) y temperatura controlada (17°C, 25°C y 29°C, según el experimento) y fueron sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas.

4. Estirpes de *Drosophila melanogaster*

Las líneas Gal4 empleadas para dirigir la expresión génica en determinadas regiones del disco de ala fueron las siguientes: *esg-Gal4* (Goto and Hayashi, 1999), *hh-Gal4* (Tanimoto *et al.*, 2000), *ci-Gal4* (Crocker *et al.*, 2006), *hth-Gal4* (Wernet *et al.*, 2003), *41D11-Gal4* (Bieli *et al.*, 2015), *nub-Gal4* (Calleja *et al.*, 1996), *248-Gal4* (Calleja *et al.*, 1996), *pnr-Gal4* (Calleja *et al.*, 1996), *sal^{EPV}-Gal4* (en adelante *sal-Gal4*) (Cruz *et al.*, 2009) y *en-Gal4* (cedido por T Tabata, IMBC Tokyo).

Las líneas UAS utilizadas fueron: *UAS-phRNAi* (en adelante *UAS-ph^{KD}*) (Vienna Drosophila Resource Center, VDRC #50027), *UAS-GFP* (Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC), *UAS-lacZ* (BDSC), *UAS-Bsk^{DN}* (BDSC), *UAS-y⁺* (Calleja *et al.*, 1996), *UAS-hid* (descrito en Flybase), *UAS-hep^{CA}* (descrito en FlyBase), *UAS-p53* (Colección Consolidar), *UAS-flp* (BDSC), *UAS-lanB1RNAi* (VDRC), *UAS-mmp1* (Page-McCaw *et al.*, 2003), *UAS-mysRNAi* (BDSC) y *UAS-sqhRNAi* (BDSC).

Se utilizaron las siguientes líneas reporteras de expresión: *TRE:RFP* (Chatterjee and Bohmann, 2012), *10xSTAT-GFP* (Bach *et al.*, 2007) *ex-lacZ* (*ex⁶⁴⁷*), *diap1-lacZ* (*diap1^{J5C8}*), *hid-GFP* (BDSC), *p53-GFP* (BDSC), *sqh-GFP* (cedido por María Dolores Martín Bermudo, CABD), *LanB1-GFP* (cedido por María Dolores Martín Bermudo, CABD) y *Vkg-GFP* (Morin *et al.*, 2001).

Otras estirpes utilizadas fueron: *ph⁵⁰⁵*, *FRT19A* (Martinez *et al.*, 2009), *hs-flp122*, *H2Av-GFP*, *FRT19A* (BDSC), *hs-flp122*, *ubi-RFP*, *FRT19A* (BDSC), *act>y⁺*, *STOP>Gal4*, *UASGFP* (BDSC), *act>CD2*, *STOP>Gal4*, *UASRFP* (BDSC) y *tubGal80^{TS}* (McGuire *et al.*, 2003).

5. Experimentos de cambio de temperatura

Salvo que se especifique lo contrario en el apartado de Resultados, se detalla a continuación el protocolo que seguimos para inactivar el gen *ph* con cada una de las líneas Gal4 que utilizamos.

La activación del sistema Gal4/UAS es mayor a 29°C, por lo que los experimentos de falta de función de *ph* con las líneas *41D11-Gal4*, *nub-Gal4*, *248-Gal4*, *pnr-Gal4* y *sal-Gal4* siguieron el siguiente protocolo: los embriones se recogieron durante un día a 25°C y a continuación las larvas se pasaron a 29°C, para ser fijados 5 días después del cambio de temperatura.

Para transformar los dominios especificados por las líneas *esg-Gal4*, *hh-Gal4*, *ci-Gal4*, *hth-Gal4* y *en-Gal4* se añadió un control temporal al sistema mediante la *tubGal80^{TS}*. Se conoce que la falta de función de *ph* es letal embrionaria (Dura *et al.*, 1987), de modo que el uso de una construcción *tubGal80^{TS}* nos permitió realizar el siguiente protocolo: las larvas crecieron a 17°C durante 4 días, en los que el factor Gal4 estaba inactivado, y a continuación se cambiaron a 29°C para inactivar la función de *ph*. Las larvas de tercer estadio se fijaron 4 días después del cambio de temperatura, salvo las larvas *esg>ph^{KD}*, que se fijaron 10 días después del cambio a 29°C para observar el fenotipo de sobrecrecimiento de las larvas gigantes.

Para los experimentos de sobreexpresión de *hid*, *hep^{CA}* y *p53* en los compartimentos posteriores las larvas se mantuvieron entre 7 y 8 días a 17°C y después se pasaron a 29°C, donde permanecieron dos días para que se expresara el ARNi frente a *ph* y se diese el pulso proapoptótico antes de ser fijadas.

6. Tratamiento con Rayos X

En estos experimentos las larvas se irradiaron con una dosis de 4000Rads, que se corresponde con una intensidad de 100kV/15mA durante 8 minutos y 16 segundos. Los tubos con las larvas se colocaron a una distancia de 18cm en un equipo Phillips-MG-102. Salvo que se indique lo contrario, este tratamiento se administró a larvas *hh>ph^{KD}* y *ci>ph^{KD}* 3 días después de haber sido transferidas de la cámara de 17°C a 29°C, cuando los compartimentos correspondientes presentan fenotipo mutante para *ph*, y se fijaron para analizar los efectos 24 horas después de la irradiación.

7. Inmunohistoquímica

7.1. Tinciones de anticuerpos

Se seleccionaron larvas de tercer estadio y se colocaron en hielo para evitar la apoptosis derivada del tratamiento experimental. Se diseccionaron en PBS 1X y a continuación se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4%, Triton-X100 al 0.1% y DOC al 0.1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con un tampón de lavado (PBS 1X, Triton X-100 al 0.3% y BSA al 1%) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Tras realizar nuevamente 4 lavados de 15 minutos de duración las larvas se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados durante 2 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se utilizaron en dilución con PBS 1X y Triton X-100 al 0.3%. Finalizada la incubación se llevaron a cabo los 4 lavados correspondientes con el tampón de lavado y finalmente los discos imaginales fueron extraídos de las larvas y se montaron en un portaobjetos en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories).

Los anticuerpos primarios utilizados se citan a continuación, indicando la especie en la que han sido desarrollados, la concentración a la que se utilizaron y la referencia de origen: anti-GFP de conejo (1:300, Invitrogen), anti-Dcp1 de conejo (1:200, Cell Signaling Technology), anti-PH3 de conejo (1:100, Millipore), anti-Mpm2 de ratón (1:200, Millipore), anti-CycB de ratón (1:10, Hybridoma Bank), anti-CycA de ratón (1:10, Hybridoma Bank), anti-Ci de rata (1:50, Hybridoma Bank), anti-pH2AV de ratón (1:50, Hybridoma Bank), anti-H3K27me3 de conejo (1:500, Active Motif), anti-H3K9me3 de conejo (1:500, Active Motif), anti-H4K12Ac de conejo (1:500, Active Motif), anti-AbdB de ratón (1:20, Hybridoma Bank), anti-Ubx de ratón (1:20, White and Wilcox, 1984), anti-En de ratón (1:20, Hybridoma Bank), anti-Cad de conejo (1:20, cedido por P. Macdonald), anti-Vg de conejo (1:50, cedido por N. Azpiazu, CBMSO), anti-Nub de conejo (1:1000, cedido por F. Diaz-Benjumea, CBMSO), anti-Eyg de cobaya (1:200, cedido por N. Azpiazu, CBMSO), anti-Integrina β PS de ratón (1:50, Hybridoma Bank), anti-Yki de conejo (1:200, cedido por K. Irvine), anti-pERK de conejo (1:100, Cell Signaling Technology), anti- β gal de ratón (1:50, Hybridoma Bank), anti- β gal de conejo (1:2000, cedido por J. Modolell, CBMSO) y anti-Mmp1 de ratón (1:50, Hybridoma Bank).

Los anticuerpos secundarios correspondientes a cada especie están conjugados con fluorocromos verde (Alexa-488), rojo (Alexa-555) o azul (Alexa-647). Los utilizamos a una concentración 1:200 y proceden de ThermoFisher Scientific. También utilizamos un anticuerpo secundario biotinilado contra conejo (1:200,

Amersham) que revelamos con una estreptavidina conjugada con el fluorocromo azul Cy5 (1:200, Jackson ImmunoResearch).

Para marcar el citoesqueleto de F-actina utilizamos una Faloidina TRITC (Sigma Aldrich) o Faloidina-Alexa-647 (ThermoFisher Scientific) (Phal), ambos a una concentración 1:200. Para marcar los núcleos empleamos To-Pro-3 (en adelante, TOPRO) (1:500, ThermoFisher Scientific), que fue incubado junto con los anticuerpos secundarios en los últimos 20 minutos de las 2 horas de incubación a temperatura ambiente.

7.2. Ensayos de incorporación de EdU

Para detectar células en la fase S del ciclo celular utilizamos un marcaje con EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), un análogo del nucleósido timidina que se incorpora al ADN durante la síntesis activa de ADN. En concreto, utilizamos el kit de proliferación celular “Click-iT™ EdU Imaging Kit” (ThermoFisher Scientific) combinado con un colorante Alexa Fluor™ 555 o Alexa Fluor™ 647 para su visualización.

Se diseccionaron larvas de tercer estadio en PBS 1X frío, se incubaron en 1ml de solución EdU durante 15 minutos y a continuación se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4%, Triton-X100 al 0.1% y DOC al 0.1% en PBS durante 1 hora, todo a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con un tampón de lavado (PBS 1X, Triton X-100 al 0.3% y BSA al 1%) y se incubaron las larvas con un anticuerpo anti-GFP de conejo (1:300, Invitrogen) durante toda la noche a 4°C para proteger la fluorescencia del GFP previo a la detección de EdU. Tras los lavados correspondientes, el revelado de EdU se llevó a cabo con un tampón de reacción preparado siguiendo las instrucciones del fabricante del kit, con el que se incubaron las larvas un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras realizar nuevamente 4 lavados de 15 minutos de duración las larvas se incubaron con los anticuerpos primarios y a continuación con los secundarios de la misma manera que en una inmunohistoquímica convencional hasta finalizar el protocolo.

7.3. Detección in vivo de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Para detectar la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) se utilizó un marcaje in vivo con dihidroetidio (DHE). Se trata de una molécula que en el citoplasma de las células tiene fluorescencia azul,

pero que al unirse a radicales oxidantes se oxida y se convierte en etidio, que se intercala en el ADN y tiñe los núcleos con una fluorescencia roja.

El protocolo se realizó de manera similar al descrito en Owusu-Ansah et al., 2008, pero con algunas modificaciones. Se diseccionaron larvas de tercer estadio en PBS 1X frío y se incubaron con DHE 30 μ M (D1168, ThermoFisher Scientific) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Tras realizar 3 lavados de 5 minutos de duración en PBS 1X los discos imaginales fueron extraídos de las larvas y se montaron en Vectashield.

8. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para analizar el perfil del ciclo celular en células del disco imaginal de ala se llevó a cabo un análisis mediante la técnica de citometría de flujo FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorting"). Se diseccionaron en PBS 1X en frío un mínimo de 30 larvas de tercer estadio por cada genotipo y se recogieron los discos imaginales en un tubo eppendorf con PBS a 4°C. Posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 7000rpm para sedimentar los discos y eliminar el PBS. Después, se incubaron los discos con 300 μ l de tripsina (Tripsin-EDTA Sigma T4299) y 1 μ l del marcador nuclear Hoescht (Hoescht 33342, Molecular Probes™) durante 40 minutos a 28°C en agitación moderada, pipeteando las muestras cada 10 minutos suavemente para ayudar a disgregar las células. A continuación, se paró la reacción de tripsinización añadiendo 200 μ l de una solución a 4°C de FBS al 1% en PBS. Tras agitar suavemente se centrifugaron los tubos a 1500g a 4°C durante 5 minutos y se resuspendieron los discos en 300 μ l de la solución PBS + FBS 1% a 4°C. El análisis de estas muestras se llevó a cabo en el Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Primero, las células se separaron en función de su expresión de GFP en un FACSCVantage SE (BD Biosciences) y a continuación los perfiles del ciclo celular de las células GFP positivas y negativas se determinaron por la fluorescencia de Hoescht en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). El perfil del ciclo se analizó utilizando el software FloJo 7.5 y el modelo Dean-Jett-Fox. El experimento de FACS se repitió un total de 3 veces independientes para cada genotipo.

9. Adquisición y procesamiento de imágenes

Para fotografiar larvas se utilizó el microscopio Leica MZ12 acoplado a una cámara digital Leica DFC490.

Las imágenes de los discos imaginales se obtuvieron principalmente utilizando el software LAS del microscopio confocal de fluorescencia de tres canales LEICA DM5500 B. También se utilizó el microscopio confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss) del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal (SMOC) del CBMSO.

Las imágenes fueron posteriormente procesadas con el programa Image J/Fiji 1.48g, que nos permite obtener vistas ortogonales de los discos y realizar proyecciones máximas para plasmar en una imagen bidimensional la información de varios planos secuenciales capturados en el eje Z. En el caso de imágenes en las que realizamos mediciones de intensidad media de la fluorescencia, descritos en el siguiente apartado, el tipo de proyección utilizado fue “Sum Slices”, mientras que en el resto de los casos se utilizó la opción “Max Intensity”. También se utilizó Adobe Photoshop CS4 Extended como herramienta de procesamiento de imagen.

En todas las imágenes, las barras de escala se determinaron con el programa Image J/Fiji y representan 100 μ m de distancia.

10. Mediciones y análisis estadístico

Se llevaron a cabo distintos tipos de mediciones en las imágenes mediante el programa ImageJ/Fiji. Un parámetro que medimos con la herramienta “Area” fue el área ocupada por una determinada región del disco marcada por GFP y el área del disco entero mediante el canal del TOPRO. A través del ratio entre estas dos áreas se calcula el porcentaje del disco ocupado por dicha región. En el caso del dominio Nubbin, este porcentaje se calculó midiendo los volúmenes ocupados por cada región, haciendo uso de un programa macro de ImageJ desarrollado en el laboratorio.

También se realizaron medidas del área ocupada por la señal de un anticuerpo con la herramienta “Area fraction”, para poder calcular los porcentajes que ocupan determinados marcajes en una región concreta. En estas mediciones es importante utilizar la herramienta “Threshold” para definir la señal y que el programa pueda discriminarlo frente al ruido de la imagen.

El número de células marcadas positivamente para Fosfo-histona 3 (PH3, para calcular el índice mitótico) y para Mpm2 se calculó utilizando la herramienta “Analyze Particles” con un área mínima de partícula de 8 y 0.4, respectivamente. En ambos casos se utilizó también la herramienta “Threshold” para poder definir la señal correctamente.

Otro parámetro que medimos fue la intensidad media de fluorescencia de una determinada señal mediante la herramienta “Mean grey value”. Es importante mencionar que para que los datos de intensidad de fluorescencia fueran comparables entre sí los experimentos se realizaron siguiendo exactamente las mismas condiciones experimentales en cuanto a tiempos y temperatura y las imágenes se tomaron utilizando los mismos parámetros de potencia de láser y ganancia en el microscopio confocal.

Para cada experimento se especifica en el pie de figura de la imagen el número de discos imaginales (“n”) medidos para llevar a cabo la estadística. En los histogramas se representa la media del valor correspondiente y la desviación estándar en forma de barra de error. Esta última nos proporciona una idea de la variabilidad de las observaciones individuales. Para la comparación de las medias se realizó el test estadístico U de Mann-Whitney. Se trata de un test para comparar dos muestras independientes y que es no paramétrico, es decir, que no asume una distribución normal de los datos.

Se concluye que la diferencia entre el grupo control y experimental es significativa en el caso de obtener un p-valor (P) menor a 0.05. Mediante un código de asteriscos se muestra el grado de significación de cada comparación (*=significativo a $P < 0.05$, **=significativo a $P < 0.01$, ***=significativo a $P < 0.001$ y ****=significativo a $P < 0.0001$), mientras que la diferencia será no significativa (“ns”) en el caso de $P > 0.05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Prism 6 (Graphpad).

Resultados



1. Análisis de la eliminación de *ph* en distintas regiones del disco de ala

Con el objetivo de estudiar el efecto tumorigénico de células con falta de función del gen *polyhomeotic* (*ph*), analizamos los efectos producidos al utilizar un ARN de interferencia (ARNi) diseñado para bloquear específicamente la función de las dos unidades redundantes del locus del gen *ph*, tanto *ph-proximal* como *ph-distal* (Dura *et al.*, 1987; Deatrick *et al.*, 1991; Gandille *et al.*, 2010). Mediante el sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS} sobreexpresamos este ARNi (en adelante, *ph^{KD}*) en distintas regiones y en determinados momentos del desarrollo de *Drosophila*. En el apartado de Materiales y Métodos se detalla el protocolo exacto que seguimos a lo largo del trabajo con cada una de las líneas Gal4 utilizadas para dirigir la expresión de la construcción *ph^{KD}*.

En primer lugar, quisimos eliminar la función *ph* de todas las células del disco de ala, para lo que utilizamos la línea *esgargot-Gal4* (*esg-Gal4*), que promueve la expresión del factor Gal4 en todos los discos imaginales e histoblastos de la mosca. Observamos que, mientras que las larvas control *esg>GFP* pupan 3 días tras el paso a 29°C, las mutantes *esg>GFP ph^{KD}* no pueden pupar y permanecen en forma de larvas gigantes hasta unos 10 días después del cambio de temperatura, tras lo cual mueren (Fig. R1 A,B). Además, los discos imaginales de ala de estas larvas gigantes presentan sobrecrecimientos masivos y alteraciones morfológicas considerables (Fig. R1 C,C',D,D'), similares a los descritos para alelos mutantes nulos de *ph* (Classen *et al.*, 2009), lo que permite afirmar que las células *ph^{KD}* no contienen función *ph*.

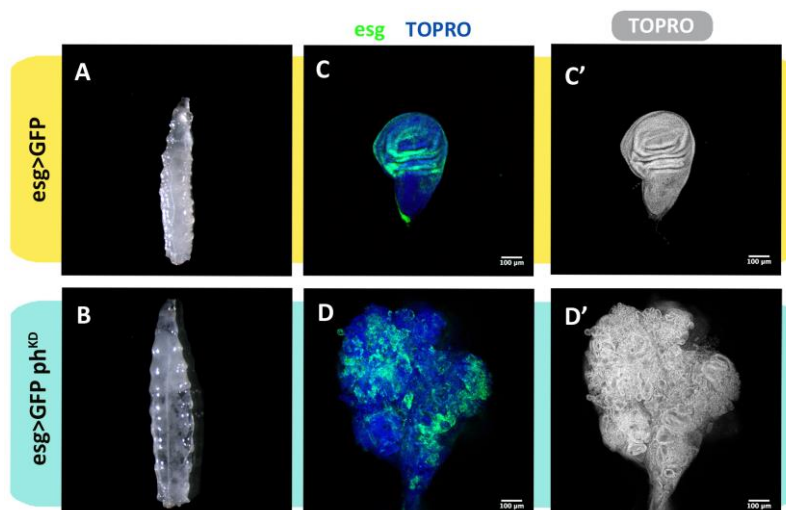


Figura R1: La eliminación de *ph* en todos los discos imaginales de *Drosophila* da lugar a larvas gigantes con discos muy sobrecrecidos. A,B) Imágenes tomadas con el mismo aumento de una larva control *esg>GFP* (A) y una larva gigante mutante *esg>GFP ph^{KD}* (B) 3 y 10 días tras el paso de 17 a 29°C, respectivamente. C,D) Disco imaginal de ala correspondiente a la larva control de la imagen A (C) y de la larva gigante mutante en B (D). Las barras de escala representan 100 μm.

1.1. Eliminación de *ph* en los compartimentos posterior y anteriores

Para realizar un análisis más fino de los efectos que produce la falta de función de *ph* en el disco estudiamos la respuesta del compartimento posterior mediante la utilización de la línea *hedgehog-Gal4* (*hh-Gal4*). En primer lugar, vemos que las larvas *hh>GFP ph^{KD}* también se hacen gigantes (dato no mostrado), tal y como ocurre en el caso de las *esg>GFP ph^{KD}* (Fig. R1 B). Analizando los discos de estas larvas observamos que, en comparación con un disco control, el compartimento posterior *ph^{KD}* sobrecrece de manera significativa (Fig. R2 A,B), llegando a ocupar un porcentaje del disco muy superior a lo ocupado en la situación control (Fig. R2 C). Si analizamos el patrón de proliferación de estos discos, que en condiciones silvestres es uniforme (Fig. R2 A',A''), vemos que las células *ph^{KD}* del compartimento posterior sobrecrecido presentan mayores niveles del marcador de división celular EdU en comparación con el compartimento anterior (Fig. R2 B',B''), aunque apreciamos que los altos niveles de EdU se extienden también de manera no autónoma a células silvestres del compartimento anterior que se encuentran en la cercanía del borde de compartimentos (Fig. R2 B',B'' flecha). En adelante, nos referiremos a los efectos no autónomos a aquellos que ocurren en las células silvestres y que derivan de la presencia de las células mutantes, donde los efectos los denominamos como autónomos. Es interesante destacar que la falta de *ph* en el compartimento posterior parece también provocar una disminución de la proliferación celular en el resto del compartimento anterior (Fig. R2 B',B'' asteriscos) si se compara con los niveles de EdU del compartimento anterior de un disco control *hh>GFP* (Fig. R2 A',A'').

También utilizamos la línea *cubitus interruptus-Gal4* (*ci-Gal4*), que se expresa en el compartimento anterior del disco y que incluye la mayor parte del notum (Fig. I6 A). Las condiciones experimentales en este caso fueron las mismas a las empleadas con *hh-Gal4* y obtuvimos también larvas gigantes *ci>GFP ph^{KD}* (dato no mostrado). En los discos, vemos que la eliminación de *ph* del compartimento anterior produce efectos muy similares a los observados cuando se elimina del posterior: el compartimento anterior sobrecrece significativamente (Fig. R2 D-F) y los altos niveles de incorporación de EdU no se restringen exclusivamente al compartimento anterior *ph^{KD}* sino que también se extienden no autónomamente a la región del compartimento posterior inmediatamente más cercana al borde A/P (Fig. R2 D',D'',E',E'' flechas amarillas). El resto del compartimento posterior también sufre una disminución de EdU (Fig. R2 D',D'',E',E'' asteriscos). Además, con la línea *ci-Gal4* podemos apreciar que, en contraste con lo que ocurre en el apéndice, la región del notum no sobrecrece por la falta de *ph*. Es más, parece incluso que disminuye de tamaño y los niveles del marcador de proliferación EdU son más bajos (Fig. R2 E'' flecha blanca), comparables a la disminución de proliferación que presenta el compartimento posterior control.

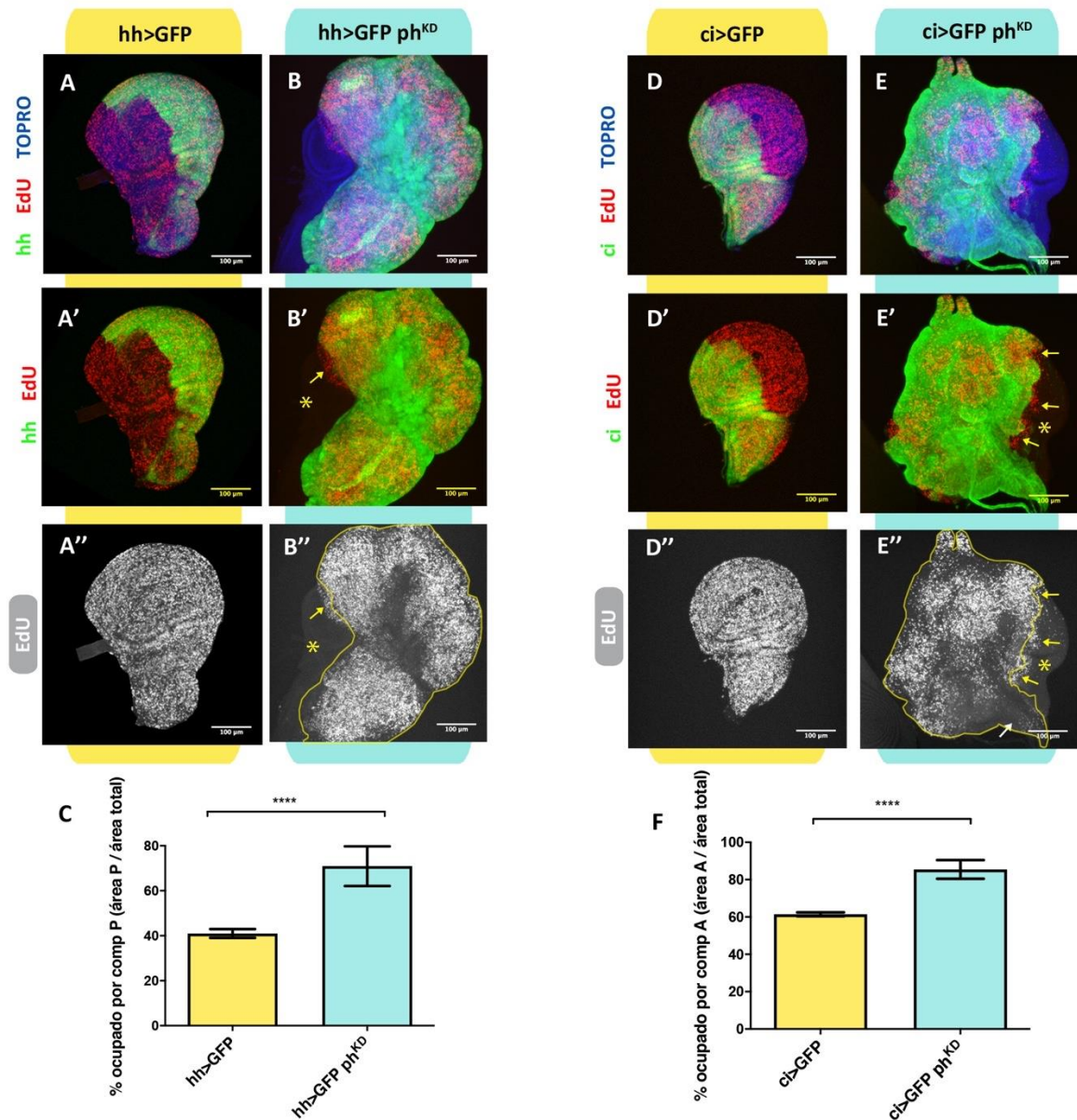


Figura R2: Efectos de la eliminación de *ph* en el compartimento posterior y anterior del disco imaginal de ala. A,D) Incorporación de EdU en discos control marcados con el compartimento posterior (A) o anterior (D) en verde. B,E) Los discos con falta de función de *ph* en el compartimento posterior (B) o anterior (E) presentan sobrecrecimientos. Las líneas amarillas delimitan el compartimento posterior (B'') o anterior (E''). Las flechas amarillas indican los altos niveles de EdU que se extienden del compartimento *ph*^{KD} a células cercanas del compartimento control y los asteriscos amarillos representan el efecto negativo en la proliferación de células en el compartimento control restante (B',B'',E',E''). La flecha blanca representa la disminución de proliferación celular que sufre el notum tras la eliminación de *ph* (E''). C,F) Se representa el porcentaje medio ocupado por el compartimento posterior (C) o el anterior (F) en discos control GFP (histogramas amarillos) y en discos en los que se ha eliminado *ph* del compartimento correspondiente (histogramas azules). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa cada compartimento por el área total del disco. El aumento de tamaño de los compartimentos *ph*^{KD} es significativo (****=significativo a $P < 0.0001$). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. $n=11$ discos (C amarillo), $n=24$ (C azul), $n=14$ (F amarillo) y $n=20$ (F azul). Las barras de escala representan 100 μ m.

1.2. Eliminación de *ph* simultáneamente en el apéndice y en el notum

La restricción del sobrecrecimiento del tejido mutante para *ph* al apéndice del disco de ala, pero no al notum, la observamos también cuando utilizamos las líneas *homothorax-Gal4* (*hth-Gal4*), *41D11-Gal4* y *248-Gal4*, que se expresan tanto en el notum como en parte del apéndice, especialmente el hinge (Fig. R3 A,C,E). La falta de función de *ph* en estas regiones conduce a una mayor incorporación de EdU y sobrecrecimiento en el apéndice (Fig. R3 B,D,F). Sin embargo, en los tres casos el notum presenta niveles más bajos de proliferación celular (Fig. R3 B'',D'',F'' flechas blancas) y parece tener un tamaño más pequeño que en los discos control.

Nótese que, al igual que veíamos con las líneas *hh-Gal4* y *ci-Gal4*, en discos *41D11>GFP ph^{KD}* los altos niveles de EdU también se extienden no autónomamente a células silvestres cercanas fuera del dominio (Fig. R3 D',D'' flechas amarillas), mientras que las células *ph⁺* silvestres que se encuentran más lejos presentan una tasa proliferativa inferior a la de los discos control (Fig. R3 C',C'',D',D'' asteriscos).

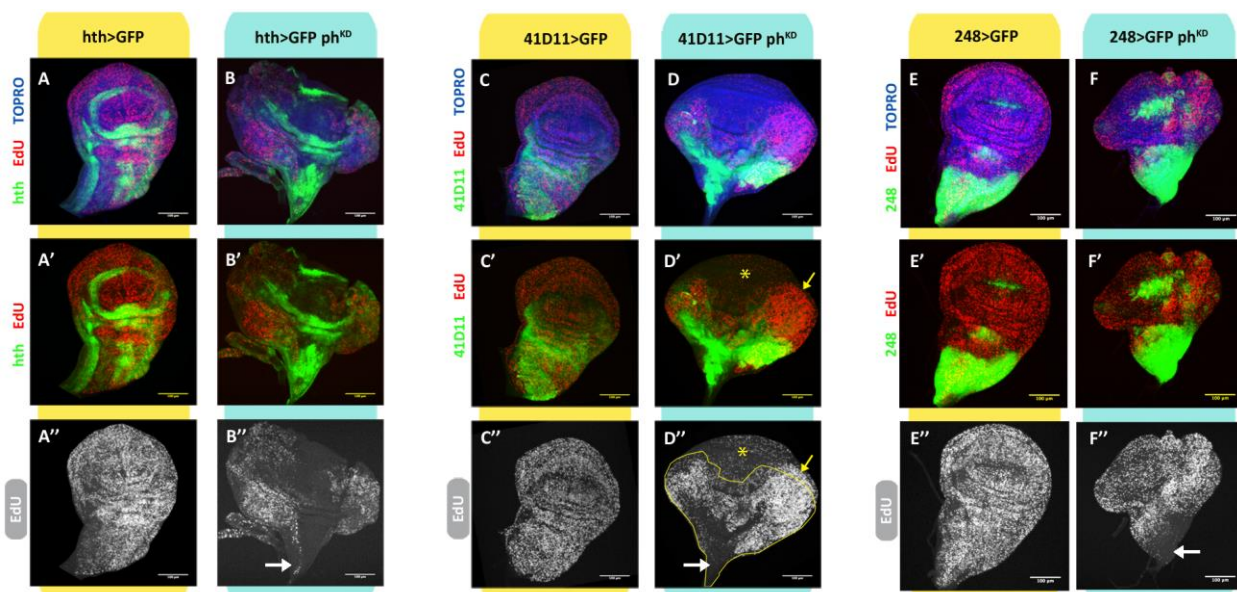


Figura R3: La eliminación de *ph* del disco de ala produce sobrecrecimientos en el apéndice pero no en el notum. A,C,E) Marcaje con EdU en discos control con los dominios de expresión de *hth-Gal4* (A), *41D11-Gal4* (C) o *248-Gal4* (E) en verde. B,D,F) Los discos con falta de función de *ph* en cada uno de estos dominios presentan un incremento de EdU y sobrecrecimientos en la región del apéndice. Las flechas blancas representan la disminución de la proliferación celular que se produce en el notum (B'',D'',F''). La línea amarilla delimita la región de expresión de la línea *41D11-Gal4* (D''). Las flechas amarillas indican los altos niveles de EdU que se extienden a las células control inmediatamente cercanas al dominio *41D11-Gal4* y los asteriscos amarillos el efecto negativo en la proliferación de las células control más lejanas (D',D''). Las barras de escala representan 100µm.

Los resultados hasta ahora mostrados sugieren que la falta de *ph* en el disco de ala solamente conduce a un aumento de proliferación celular y sobrecrecimiento en el apéndice, mientras que el efecto que produce en el notum parece totalmente opuesto: éste no solamente no sobrecrece, sino que presenta una tasa proliferativa inferior y parece disminuir de tamaño. A continuación, pasamos a analizar más en detalle los efectos que produce la falta de función de *ph* en cada una de estas regiones del disco.

1.3. Eliminación de *ph* exclusivamente en el notum

Para poder medir de manera más rigurosa el efecto que produce la eliminación de *ph* en el notum utilizamos una línea que se expresa únicamente en el notum, como es el caso de *pannier-Gal4* (*pnr-Gal4*) (Fig. R4 A). Encontramos que la falta de *ph* en esta región provoca una disminución de tamaño significativa, pasando de ocupar un 15% del total del disco a ocupar un 10% (Fig. R4 A-C) o, lo que es lo mismo, el dominio Pnr *ph^{KD}* es un 33% más pequeño que el dominio Pnr control.

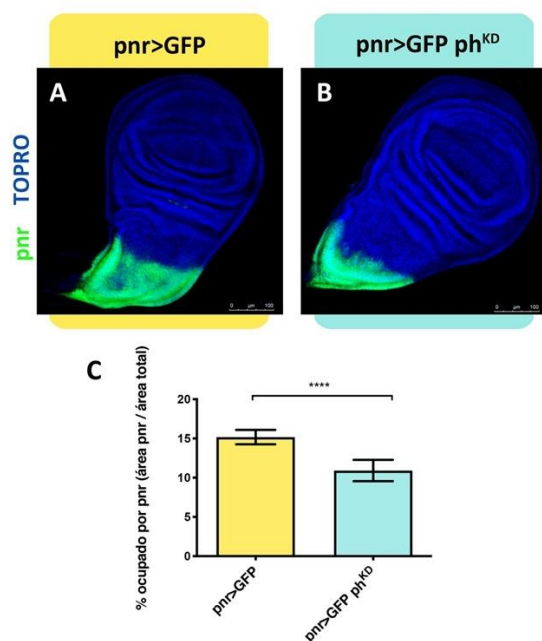


Figura R4: La eliminación de *ph* en el notum provoca una disminución de su tamaño. A) Disco control con el dominio de expresión Pnr en verde. B) La falta de *ph* en Pnr da lugar a un dominio de menor tamaño. C) Se representa el porcentaje medio ocupado por Pnr en discos control GFP (histograma amarillo) y en discos en los que se ha eliminado *ph* del dominio (histograma azul). El porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa Pnr en cada caso por el área total del disco. La disminución de tamaño es estadísticamente significativa (****=significativo a $P < 0.0001$). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. $n=19$ discos en *pnr>GFP* (amarillo) y $n=21$ en *pnr>GFP ph^{KD}* (azul). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Se ha propuesto que la falta de función de *ph* tiene un efecto tumorigénico en los discos imaginales de *Drosophila* (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados indican que en

Resultados

la región del notum la falta de *ph* tiene el efecto opuesto, ya que en lugar de conducir a un fenotipo de sobrecrecimiento provoca una disminución de tamaño. Esta respuesta diferencial del notum nos pareció interesante y decidimos estudiarla más a fondo.

1.3.1. Efecto en la apoptosis de la eliminación de *ph* en el notum

En primer lugar, barajamos la posibilidad de que la falta de *ph* en el dominio Pnr indujera un incremento de muerte celular y que esto pudiera explicar la disminución de tamaño que observamos. Para ello, realizamos un marcaje con un anticuerpo frente a la caspasa efectora Dcp1 y cuantificamos el porcentaje de células apoptóticas en el dominio Pnr. El resultado es que los niveles de apoptosis en el dominio *ph^{KD}* (Fig. R5 B) son comparables a los que presenta un disco control (Fig. R5 A,C). Estos discos fueron fijados y teñidos con Dcp1 5 días tras el paso de las larvas a 29°C. Sin embargo, tampoco encontramos diferencias en el porcentaje de células marcadas con Dcp1 en el caso de dominios *pnr>ph^{KD}* fijados más temprano, ya sea 4 días (Fig. R5 D-F) o 3 días (Fig. R5 G-I) tras el paso a 29°C, en comparación con discos control de la misma edad. Estos resultados indican que la falta de *ph* en el dominio Pnr no conduce a muerte celular en los distintos estadios del desarrollo larvario y que por tanto la apoptosis no es responsable de la disminución de tamaño que observamos en el notum tras la eliminación de *ph*.

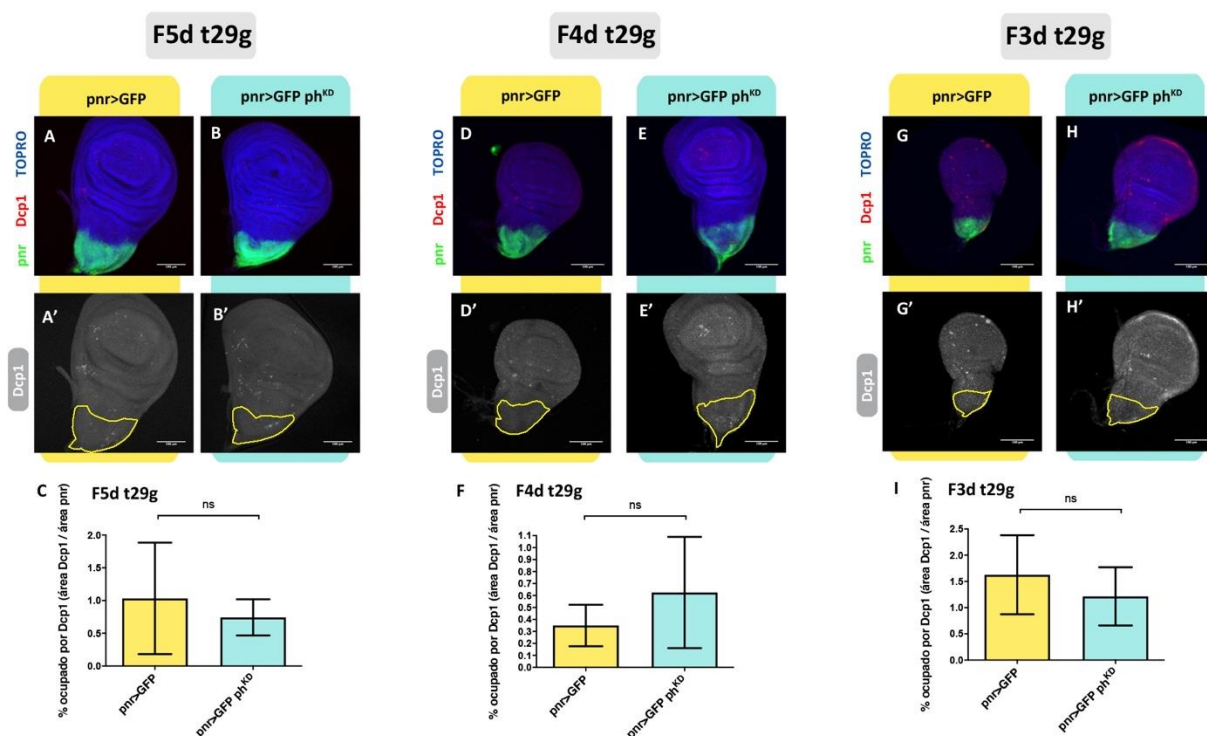


Figura R5: La eliminación de *ph* en el dominio Pnr no provoca apoptosis. A,D,G) Discos control fijados 5 (A), 4 (D) o 3 (G) días tras el paso a 29°C (=F5/4/3d t29g) teñidos para Dcp1. B,E,H) Los discos *pnr>GFP ph^{KD}* fijados 5 (B), 4 (E) o 3 (H) días tras el paso a 29°C no presentan cambios significativos en los niveles de Dcp1. Las líneas amarillas delimitan el dominio Pnr. C,F,I) Se representa el porcentaje medio ocupado por Dcp1 en el dominio Pnr de discos control (histogramas amarillos) y en discos en los que se ha eliminado *ph* del dominio Pnr (histogramas azules). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa la señal Dcp1 en Pnr por el área del dominio Pnr. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “ns” representa que las diferencias no son significativas a $P > 0.05$. n=15 discos (C amarillo), n=7 (C azul), n=4 (F amarillo), n=4 en (F azul), n=6 (I amarillo) y n=7 (I azul). Las barras de escala representan 100µm.

1.3.2. Efecto en el ciclo celular de la eliminación de *ph* en el notum

Otro proceso celular que podría alterar el tamaño del notum tras la falta de *ph* es que provoque un efecto en la proliferación celular de dicha región. Previamente hemos mostrado en experimentos realizados con líneas Gal4 cuya región de expresión en el disco incluye el notum (*ci-Gal4* en Fig. R2 y *hth-Gal4*, *41D11-Gal4* y *248-Gal4* en Fig. R3) que éste responde a la falta de *ph* con una disminución en la proliferación celular, tal y como indican los bajos niveles de incorporación del marcador EdU. Sin embargo, estas líneas dirigen también su expresión a parte del apéndice, que responde a la eliminación de *ph* con un sobrecrecimiento. Este sobrecrecimiento del apéndice podría afectar negativamente a la proliferación de las células del notum. Por esta razón, quisimos examinar los efectos a nivel de proliferación celular al eliminar la función de *ph* exclusivamente en células del notum mediante la línea *pnr-Gal4*.

Comenzamos analizando la incorporación de EdU, que marca concretamente la fase S del ciclo celular. En efecto, vemos que el ratio entre el área que ocupa la señal de EdU en el dominio Pnr y el área que ocupa el propio dominio es significativamente menor cuando eliminamos *ph* (Fig. R6 A-C). Dicho de otra manera, en ausencia de *ph* encontramos un menor porcentaje de células en fase S en el notum. Curiosamente, la región menos proximal del dominio Pnr sigue teniendo una tasa de división similar al de las células control, pero la proliferación se reduce drásticamente hacia la parte más proximal del notum (Fig. R6 B' flecha), que parece ser la región más afectada por la falta de *ph*.

A continuación, quisimos repetir este experimento utilizando otro marcador de proliferación celular como es la fosforilación de la histona 3 (PH3), que marca específicamente la fase M (mitosis) del ciclo celular. En un disco control *pnr>GFP* las células que se marcan con PH3 se distribuyen uniformemente en todo el disco (Fig. R6 D), tal y como veíamos también para EdU (Fig. R6 A). Sin embargo, observamos que la falta de *ph* en el dominio Pnr conduce a una disminución significativa del índice mitótico, es decir, el número

Resultados

de células presentes en la fase M en el dominio Pnr en relación al área del dominio es notablemente menor cuando eliminamos *ph* (Fig. R6 D-F).

Los resultados con EdU y PH3 muestran que la falta de *ph* específicamente en el dominio Pnr del disco conduce a una menor tasa de división de las células, lo que posiblemente contribuye a explicar que el tamaño del notum al finalizar el desarrollo larvario sea menor. No pudimos observar si este hecho se refleja en el tamaño final del notum del adulto porque las larvas *pnr>GFP ph^{KD}* mueren en pupa.

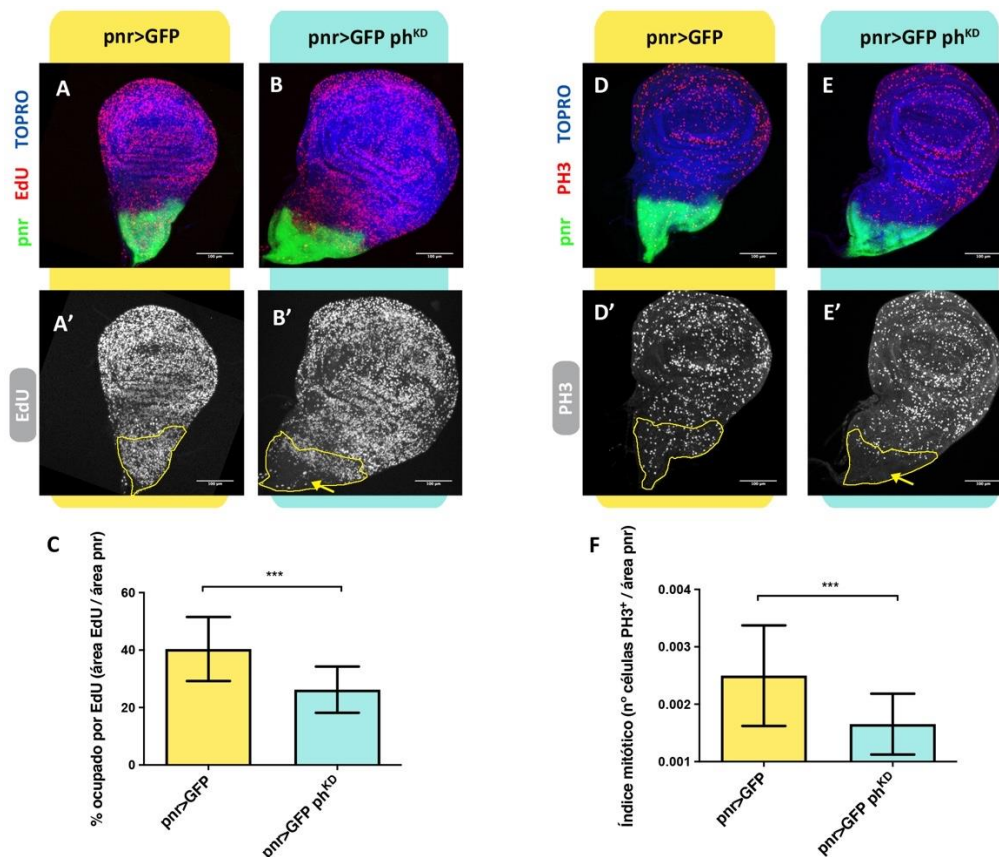


Figura R6: La eliminación de *ph* en el dominio Pnr disminuye el porcentaje de células en fase S y fase M del ciclo celular. A, D) Discos *pnr>GFP* control muestran una proliferación celular uniforme con el marcaje de EdU (A) o de PH3 (D). B, E) Los discos *pnr>GFP ph^{KD}* presentan una menor incorporación de EdU (B', flecha amarilla) y un menor número de células marcadas con PH3 (E', flecha amarilla) en el dominio Pnr. Las líneas amarillas delimitan el dominio Pnr. C) Se representa el porcentaje medio ocupado por EdU en discos control (histograma amarillo) y en discos en los que se ha eliminado *ph* del dominio Pnr (histograma azul). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa la señal de EdU en Pnr por el área del dominio Pnr. F) Se representa el índice mitótico en discos control (histograma amarillo) y en discos *pnr>GFP ph^{KD}* (histograma azul), calculado como el número de células marcadas positivamente con PH3 en Pnr dividido por el área del dominio Pnr. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran que las diferencias encontradas son significativas (***=significativo a P<0.001). n=12 discos (C amarillo), n=18 (C azul), n=19 (F amarillo) y n=22 (F azul). Las barras de escala representan 100µm.

Esta disminución en el porcentaje de células presentes en las fases S y M del ciclo celular en el dominio Pnr mutante podría deberse a que la falta de *ph* provoca un arresto del ciclo celular en las fases G1 o G2, que evitaría o retrasaría la progresión de las células hacia las otras fases del ciclo. Para esclarecer esta cuestión analizamos el efecto que tiene la eliminación de *ph* en marcadores específicos de las fases G1 y G2 del ciclo celular. Las distintas ciclinas varían su expresión de manera cíclica (Fig. I7) y por tanto pueden utilizarse como indicadores o marcadores de la presencia de las células en distintas fases del ciclo celular.

Utilizamos la actividad del complejo CycE/Cdk2 como marcador de las células en la fase G1 tardía. Para monitorizar la actividad de este complejo empleamos una tinción con el anticuerpo anti-Mpm2, que detecta histonas fosforiladas por el complejo y que da lugar a una tinción nuclear punteada (White *et al.*, 2007). Lo que encontramos es que en el dominio Pnr deficiente para *ph* hay un número de células positivas para Mpm2 por área significativamente menor que en el dominio Pnr control (Fig. R7 A-C), lo que revela una disminución en la actividad del complejo CycE/Cdk2.

Una menor actividad del complejo CycE/Cdk2 podría deberse a que las células *ph^{KD}* se encuentran bloqueadas en la fase G1, pero también podrían estarlo en G2, por lo que quisimos estudiar la expresión de marcadores de esta fase G2. En primer lugar, analizamos la *ciclina B (cycB)*, que alcanza su mayor nivel de expresión a finales de G2. Es importante mencionar que cuando teñimos los discos con el anticuerpo contra la Ciclina B todos fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales y las imágenes se tomaron utilizando ajustes idénticos en el microscopio confocal. Sin embargo, los discos *pnr>GFP ph^{KD}* en general presentaron una intensidad de la Ciclina B considerablemente superior a los discos *pnr>GFP*. Esto nos impidió comparar directamente los valores absolutos de intensidad entre los dominios Pnr control y experimental, de modo que normalizamos cada uno de estos valores por la intensidad de la Ciclina B en las regiones GFP negativas correspondientes a cada disco. En primer lugar, cabe mencionar que el ratio medio en la intensidad media de la Ciclina B en el caso de discos control *pnr>GFP* es menor a 1, lo que implica que el nivel de expresión de la Ciclina B en el notum es significativamente menor al del apéndice en un disco control (Fig. R7 D,F histograma amarillo). Sin embargo, este ratio medio es aún inferior en el caso de discos en los que eliminamos *ph* del dominio Pnr (Fig. R7 E,F histograma azul), lo que indica que la expresión de la Ciclina B en células *ph^{KD}* baja aún más.

Esta disminución de la expresión de la Ciclina B que produce la falta de *ph* en el dominio Pnr es compatible con un bloqueo de las células en una fase G2 temprana, donde la concentración de la Ciclina B es más baja. Sin embargo, no podemos excluir que este resultado pueda deberse a que las células estén bloqueadas en algún punto de la fase G1 del ciclo, tras la menor actividad CycE/Cdk2 observada.

Resultados

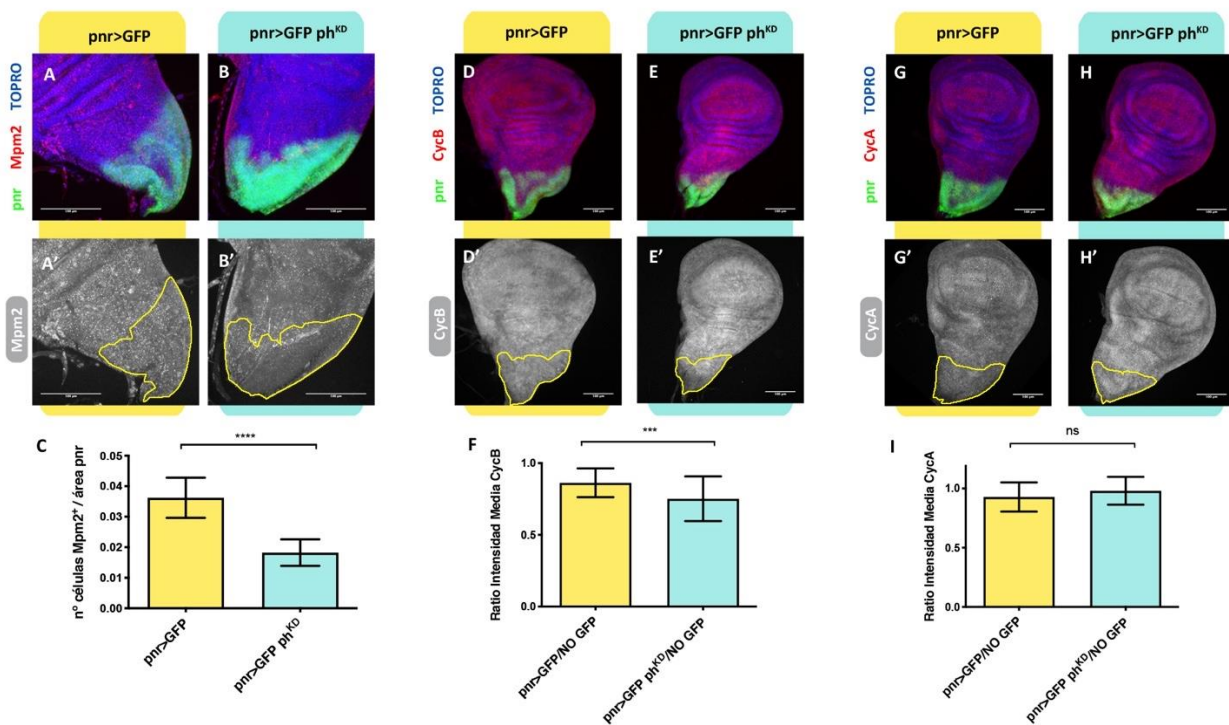


Figura R7: Efecto de la eliminación de *ph* en el dominio Pnr en marcadores de las fases G1 y G2 del ciclo celular. A,D,G) Marcaje con anticuerpos anti Mpm2 (A), CycB (D) y CycA (G) en discos *pnr>GFP* control. B,E,H) Los discos *pnr>GFP ph^{KD}* presentan, en el dominio Pnr, una disminución en el número de células marcadas con Mpm2 (B), una disminución en los niveles de expresión de CycB (E) pero misma expresión de CycA (H). Las líneas amarillas delimitan el dominio Pnr. C) Se representa el valor medio del número de células marcadas positivamente para Mpm2 en Pnr en relación al área del dominio Pnr en discos control (histograma amarillo) y en discos en los que se ha eliminado *ph* del dominio Pnr (histograma azul). F,I) Se representa el valor medio del ratio de la intensidad media de CycB (F) y de CycA (I) entre la región GFP y la región no GFP en discos *pnr>GFP* (histogramas amarillos) y en discos *pnr>GFP ph^{KD}* (histogramas azules). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparación (ns=no significativo a $P>0.05$, ***=significativo a $P<0.001$ y ****=significativo a $P<0.0001$). n=14 discos (C amarillo), n=11 (C azul), n=19 (F amarillo), n=21 (F azul), n=13 (I amarillo) y n=13 (I azul). Las barras de escala representan 100 μ m.

Para tratar de resolver si las células *ph^{KD}* del notum se encuentran arrestadas en G1 o G2, analizamos la expresión de la *ciclina A*, que es un marcador de la fase G2 temprana. Por la misma razón técnica que explicábamos anteriormente para la tinción de la Ciclina B, en el caso de la Ciclina A también cuantificamos el ratio medio de su intensidad en la región Pnr en relación a la región no GFP del disco. En este caso, no encontramos diferencias en el nivel de expresión de la Ciclina A entre el notum y el apéndice en discos *pnr>GFP* control (Fig. R7 G,I histograma amarillo) y tampoco si comparamos este ratio con el de discos *pnr>GFP ph^{KD}* (Fig. R7 H,I histograma azul). Esto implica que las células *ph^{KD}* del notum sí están siendo capaces de expresar *ciclina A* y es compatible con la presencia de estas células en una fase G2 temprana.

Para complementar los experimentos de expresión de los distintos marcadores del ciclo y tratar de confirmar la hipótesis de que las células ph^{KD} en el dominio Pnr sufren un arresto en la fase G2 decidimos analizar el perfil del ciclo celular mediante análisis por Citometría de flujo o FACS (ver Materiales y Métodos). Analizamos el perfil en discos $pnr>GFP$ control y en discos $pnr>GFP ph^{KD}$, tanto en las regiones GFP negativas que nos sirven como control interno como en las regiones GFP positivas donde realmente estamos interfiriendo. En primer lugar, vemos que en un disco $pnr>GFP$ la región GFP^+ del notum presenta un incremento del 5% de células presentes en la fase G2 si lo comparamos con la región GFP^- del mismo disco (Fig. R8 A,B). Esto se corresponde también con una disminución en el porcentaje de células en fase G1. Por otro lado, observamos que la falta de ph en el dominio Pnr (región GFP^+) provoca también un aumento en el porcentaje de células presentes en la fase G2 en comparación con su control interno GFP^- (Fig. R8 C,D). Sin embargo, este incremento en este caso es de un 11%, por lo que entendemos que la falta de ph en el dominio Pnr sería responsable de un incremento del 6% de células presentes en la fase G2. De hecho, si comparamos directamente el perfil del ciclo celular en la región Pnr control (Fig. R8 B) y en el dominio Pnr mutante para ph (Fig. R8 D), vemos que la falta de función de ph provoca también una acumulación de células en la fase G2 del ciclo, en este caso del 4%.

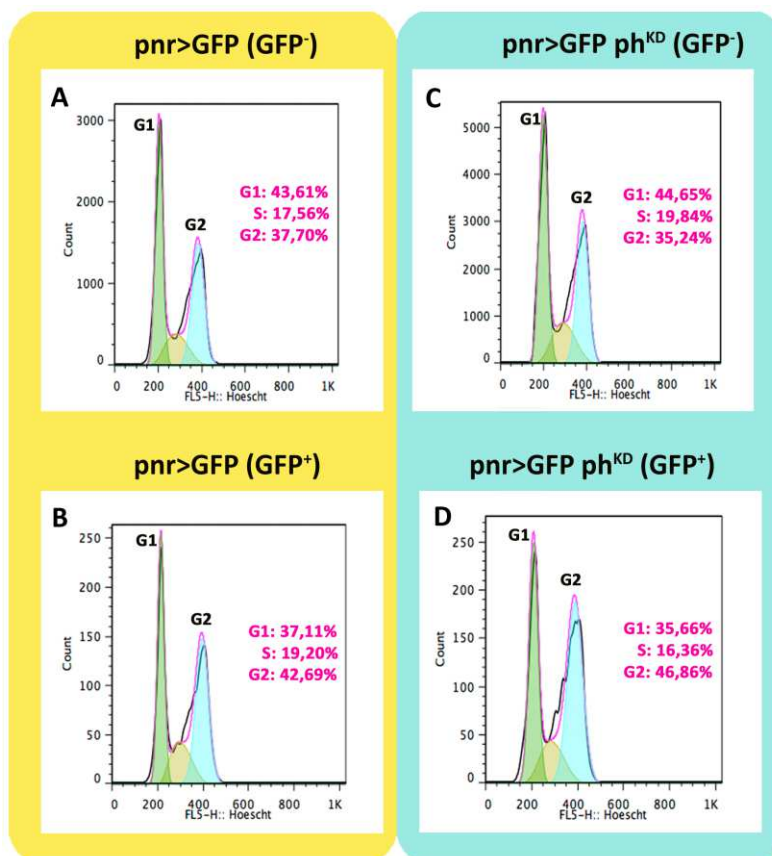


Figura R8: Perfiles del ciclo celular mediante la técnica FACS. En todas las gráficas se indica el pico correspondiente a la fase G1 (2n) y a la fase G2 (4n) en función de la cantidad de ADN (marcado por Hoescht) de las células. Se indican también, para cada perfil y en rosa, el porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo. A,B) Perfil del ciclo celular en la región no GFP (A) y en la región GFP positiva (B) de discos $pnr>GFP$. El perfil muestra un incremento de células en la fase G2 en el dominio Pnr control. C,D) Perfil del ciclo celular en la región no GFP (C) y en la región GFP positiva (B) en discos $pnr>GFP ph^{KD}$. Las células con falta de función de ph en el dominio Pnr muestran un incremento de la frecuencia en la fase G2, superior al incremento observado en discos $pnr>GFP$ control.

Resultados

Nuestros resultados con la técnica FACS y los distintos marcadores del ciclo celular indican que la falta de *ph* en el dominio Pnr conduce a una acumulación moderada de las células en la fase G2 del ciclo, lo que podría en parte explicar la disminución de tamaño que vemos en el notum.

1.4. Eliminación de *ph* en el apéndice

1.4.1. Efecto en el crecimiento y papel de la vía JNK

Tras el análisis del efecto de la eliminación de *ph* en el notum estudiamos más en detalle cómo la falta de *ph* afecta a la otra región del disco, el apéndice. Para ello, utilizamos dos líneas Gal4 que son exclusivas del apéndice: *nub-Gal4*, que se expresa en todo el pouch y en parte del hinge (Fig. R9 A) y *sal-Gal4*, que se transcribe únicamente en la región central del pouch (Fig. R9 D). Lo que encontramos es que la falta de *ph* en el dominio Nub produce un aumento significativo de su tamaño (Fig. R9 B,C) y un aumento de proliferación celular observado por la tinción con EdU (Fig. R9 B). Curiosamente, este sobrecrecimiento y aumento de incorporación de EdU se restringe únicamente a la periferia del dominio, especialmente a la región correspondiente al compartimento anterior, mientras que en la región más central la incorporación de EdU disminuye (Fig. R9 B'' asterisco). Esta observación sugiere que el efecto tumorigénico de la falta de *ph* ocurre solamente en la región más proximal del apéndice, esencialmente el hinge y la zona más proximal del pouch, pero no en la zona central del pouch. Los resultados obtenidos con la línea *sal-Gal4* apoyan estos resultados: aunque el efecto de la falta de *ph* en esta región central del apéndice no produce un efecto detectable en la incorporación de EdU (Fig. R9 E), encontramos sin embargo una pequeña pero significativa disminución en el tamaño del dominio Sal (Fig. R9 E,F) (pasa de ocupar un 20,5% del total del disco a ocupar un 18% o, lo que es lo mismo, el dominio Sal *ph^{KD}* es un 12% más pequeño que el dominio Sal control).

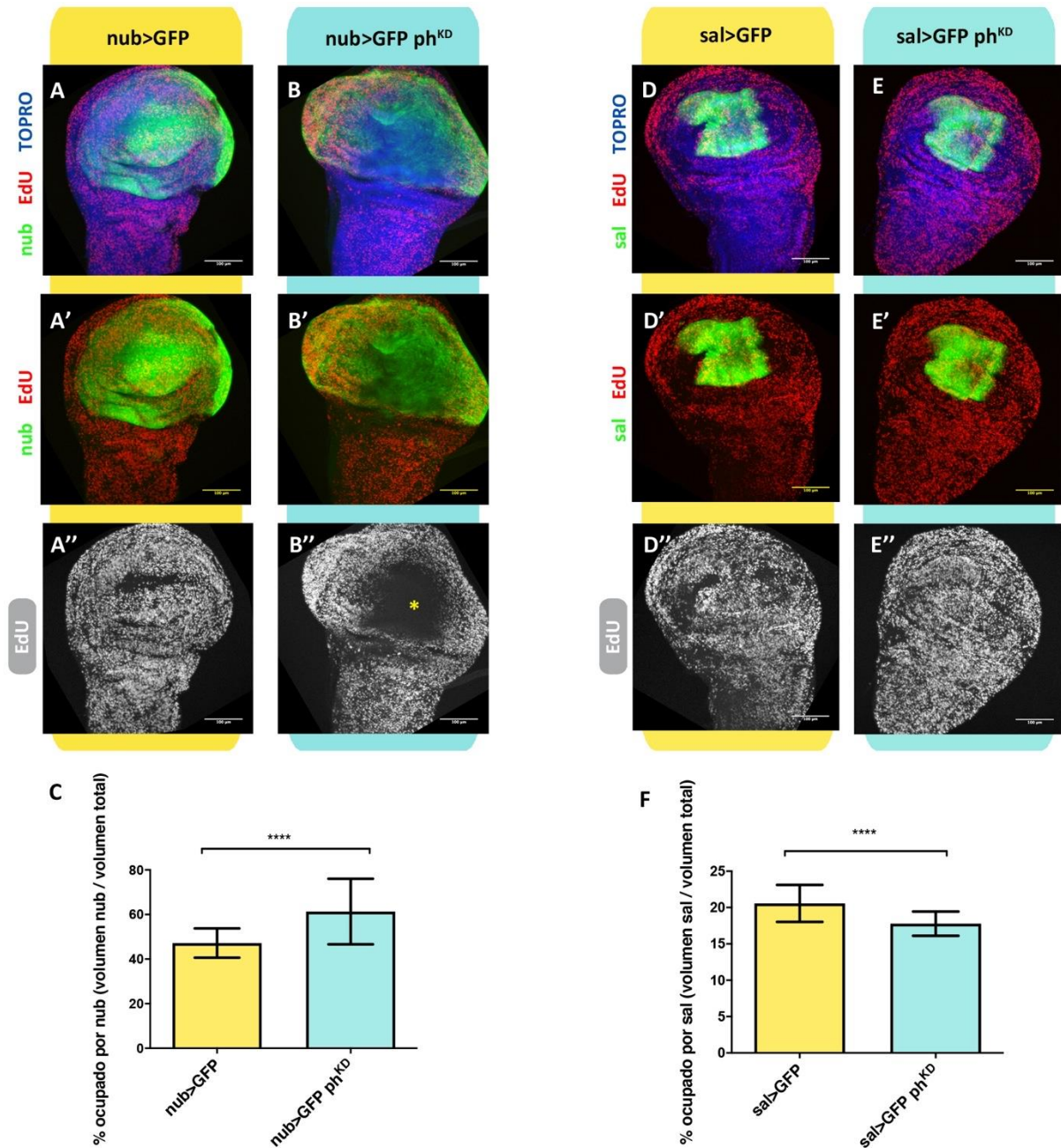


Figura R9: La eliminación de *ph* solamente produce un aumento de proliferación celular y sobrecrecimiento en la zona proximal del apéndice. A,D) Incorporación de EdU uniforme en discos control marcados con el dominio Nub (A) o Sal (D) en verde. B) La falta de función de *ph* en Nub produce un aumento de proliferación celular y sobrecrecimiento en la zona proximal del dominio, pero una disminución de EdU en la región central del pouch, representado por el asterisco en B''. E) La falta de *ph* en Sal no conduce a cambios en los niveles de proliferación. C,F) El porcentaje medio ocupado por Nub aumenta por la falta de *ph* (C) pero disminuye en el caso de Sal (F). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa cada región por el área total del disco. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran que las diferencias son significativas (****=significativo a $P < 0.0001$). n=48 discos (C amarillo), n=59 (C azul), n=20 (F amarillo) y n=23 (F azul). Las barras de escala representan 100 μ m.

Resultados

Hasta el momento, hemos detectado una respuesta diferencial de las distintas regiones del disco de ala a la falta de *ph*, siendo la parte más proximal del apéndice la que sobrecrece, pero no la zona más distal – el centro del pouch- ni el notum, que disminuyen de tamaño. Estos resultados sugieren que los factores que regulan el crecimiento podrían verse afectados de manera diferencial en las distintas regiones por la pérdida de función de *ph*. Un factor candidato es la vía de las c-Jun N-terminal Kinasas (JNK), que se ha visto que se activa ectópicamente en clones mutantes para *ph* y que contribuye al crecimiento tumoral de los mismos (Beira *et al.*, 2018).

Para detectar la activación de la vía JNK en las distintas regiones utilizamos el reportero *TRE:RFP*, que consiste en la fusión de la proteína roja fluorescente RFP a los sitios de unión al ADN del heterodímero AP-1 formado por los factores de transcripción Jun y Fos de la vía. La vía JNK no se encuentra activa en el disco imaginal de ala, salvo en una pequeña región proximal del notum (Fig. R10 A,C,E). Sin embargo, vemos que la falta de *ph* en el compartimento posterior produce una activación ectópica de la vía (Fig. R10 B). Es interesante mencionar que también observamos activación del reportero *TRE:RFP* en células del compartimento anterior que están cercanas al borde de compartimentos A/P (Fig. R10 B'' flecha), que previamente mostrábamos que presentan un incremento de proliferación celular (Fig. R2 B'' flecha). Este resultado refleja que la falta de *ph* no solamente induce una activación autónoma de la vía JNK sino que también la activa de manera no autónoma en las células silvestres. En el caso de discos *nub>GFP ph^{KD}* también vemos activación del reportero *TRE:RFP*, pero restringida únicamente a la región más proximal del dominio Nub (Fig. R10 D), en especial a la región correspondiente al compartimento anterior, donde más se apreciaba el fenotipo de sobrecrecimiento y aumento de proliferación celular (Fig. R9 B). Por su parte, en discos *sal>GFP ph^{KD}*, que no sobrecrecen, no encontramos activación de la vía JNK (Fig. R10 F), ni tampoco en el notum de discos *pnr>GFP ph^{KD}* (dato no mostrado).

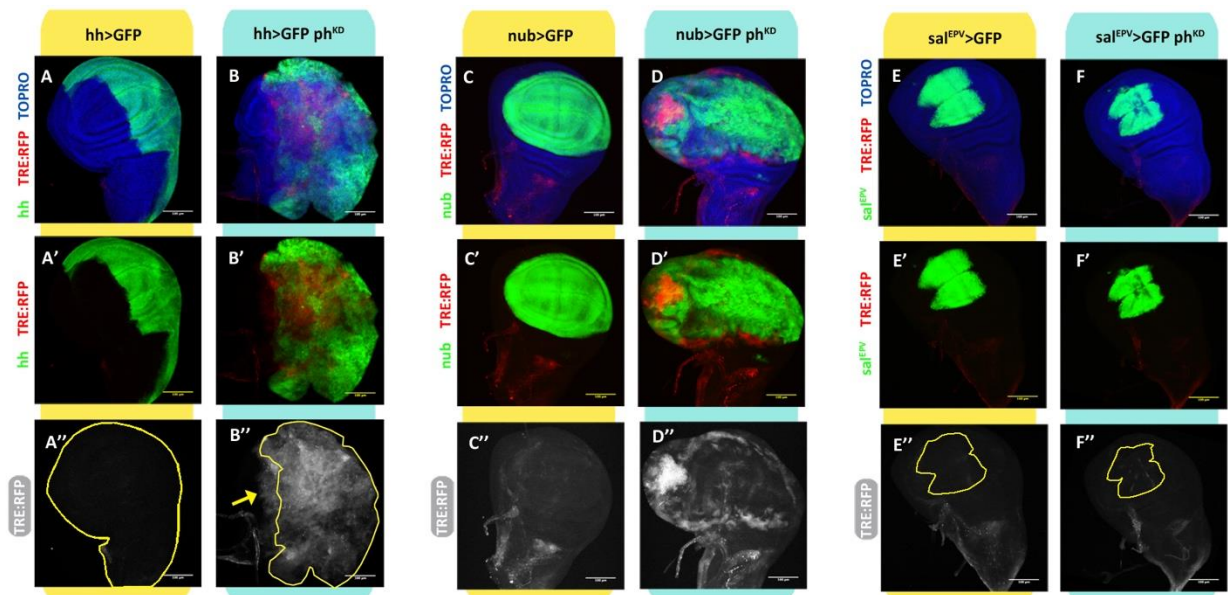


Figura R10: Activación de la vía JNK en respuesta a la eliminación de *ph* en distintas regiones del apéndice.

A,C,E) La vía JNK no se activa en discos control *hh>GFP* (A), *nub>GFP* (C) y *sal>GFP* (E), salvo en una pequeña región proximal del notum. B) El reportero *TRE:RFP* muestra activación ectópica de la vía JNK en el compartimento posterior *ph^{KD}*. La flecha amarilla en B'' representa activación no autónoma de la vía en células del compartimento anterior silvestre cercanas al borde A/P. D) En discos *nub>ph^{KD}* la activación del reportero *TRE:RFP* se restringe a la zona más proximal del dominio, siendo especialmente notoria en la región anterior del dominio. F) En el dominio Sal no se activa la vía JNK. Las líneas amarillas representan el disco entero (A''), el compartimento posterior (B'') o los dominios Sal (E'', F''). Las barras de escala representan 100μm.

Observamos que las regiones del disco que presentan una activación ectópica de la vía JNK en ausencia de *ph* coinciden con aquellas en las que produce sobrecrecimientos y un aumento de la proliferación celular. Esto sugiere que la activación diferencial de la vía JNK es un factor que contribuye a explicar las diferencias que encontramos en el comportamiento proliferativo de las distintas regiones del disco de ala tras la falta de *ph*.

Para comprobar si JNK tiene un papel en el sobrecrecimiento y aumento de proliferación celular inducido por la falta de *ph* inactivamos la vía en discos *hh>GFP ph^{KD}* mediante la sobreexpresión de una forma dominante negativa de la quinasa JNK, llamada Basket, (*Bsk^{DN}*), tal y como se puede comprobar por la falta de expresión del reportero *TRE:RFP* en el compartimento posterior (Fig. R11 D). Nótese que en este experimento al genotipo *hh>GFP ph^{KD}* le añadimos un *UAS-lacZ* neutro para equiparar el número de secuencias *UAS* con el genotipo experimental *hh>GFP ph^{KD} Bsk^{DN}*. Previamente, comprobamos que incluir un *UAS* más en discos *hh>GFP ph^{KD}* no incorpora cambios, ya que el sobrecrecimiento del compartimento posterior en discos *hh>GFP ph^{KD} lacZ* es comparable al de discos *hh>GFP ph^{KD}* (dato no mostrado).

Resultados

Encontramos que suprimir la vía JNK en compartimentos posteriores ph^{KD} resulta en una reducción significativa del sobrecrecimiento y de la incorporación de EdU (Fig. R11 B,C,E). También parece que comienza a reestablecerse el patrón proliferativo en el compartimento anterior control (Fig. R11 B'',C'' asteriscos), aunque seguimos viendo altos niveles de EdU en la cercanía del borde de compartimentos (Fig. R11 B'',C'' flechas). Es importante mencionar, además, que tras la supresión de JNK las larvas ya no son gigantes y consiguen pupar (dato no mostrado). Sin embargo, el compartimento posterior de estos discos $hh>GFP\ ph^{KD}\ Bsk^{DN}$ sigue estando sobrecrecido y teniendo una mayor incorporación de EdU respecto al anterior en comparación con lo que vemos en discos control $hh>GFP$ (Fig. R11 A,C,E), por lo que la supresión de la actividad JNK no elimina completamente el sobrecrecimiento provocado por la falta de ph .

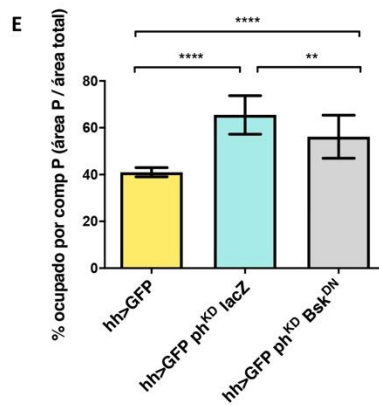
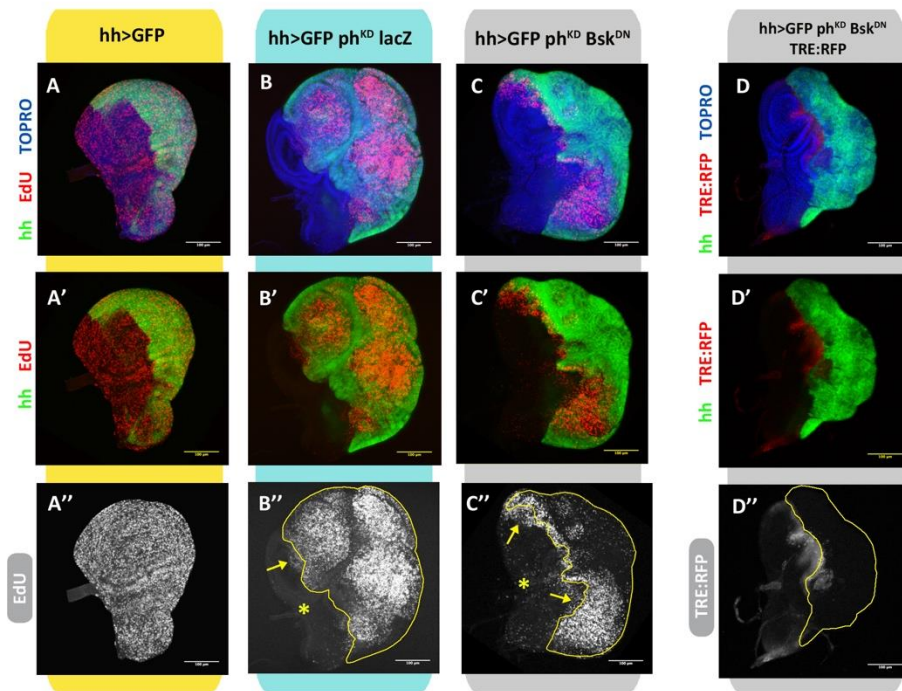


Figura R11: La inactivación de la vía JNK en el compartimento posterior mutante para *ph* reduce el sobrecrecimiento y el exceso de proliferación celular. A,B,C) En comparación con el compartimento anterior, la incorporación de EdU es mayor en el compartimento posterior de discos *hh>GFP ph^{KD} lacZ* (B) que en el caso de discos *hh>GFP* (A), pero este aumento se rescata parcialmente cuando se suprime la vía JNK mediante la sobreexpresión de *Bsk^{DN}* (C). Los asteriscos amarillos en B' y C' señalan las tasas proliferativas de los compartimentos control y las flechas amarillas indican los altos niveles de EdU que se extienden a células cercanas del compartimento control. D) La sobreexpresión de *Bsk^{DN}* en el compartimento posterior mutante para *ph* inactiva la señal del reportero *TRE:RFP* de la vía JNK. Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores. E) Se representa el porcentaje medio ocupado por el compartimento posterior en discos *hh>GFP* control (histograma amarillo), en discos en los que se ha eliminado *ph* del compartimento posterior (histograma azul) y en discos doble mutantes para *ph* y la vía JNK (histograma gris). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa cada compartimento por el área total del disco. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparativa (****=significativo a $P<0.0001$, **=significativo a $P<0.01$). $n=11$ discos (amarillo), $n=11$ (azul) y $n=24$ (gris). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Estos resultados señalan a JNK como un factor que contribuye al sobrecrecimiento del tejido *ph^{KD}*, pero también que deben existir otros factores. Trabajos previos indican que, además de JNK, las vías de señalización JAK/STAT y Notch están también implicadas en el sobrecrecimiento de clones mutantes para *ph* (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009; Beira *et al.*, 2018), por lo que muy posiblemente estas vías contribuyen también al sobrecrecimiento de dominios o compartimentos *ph^{KD}*. No obstante, la vía Notch funciona principalmente downstream de JNK, mientras que JAK/STAT actúa independientemente de JNK (Beira *et al.*, 2018), lo que señala a JAK/STAT como el otro factor principal junto con JNK.

Para detectar la activación de la vía JAK/STAT utilizamos el reportero *10xSTAT-GFP*, que consiste en la fusión de la proteína verde fluorescente GFP a 10 sitios de unión al ADN del factor de transcripción Stat92E de la vía. La activación normal de la vía JAK/STAT en el disco de ala se restringe a la región hinge (Fig. R12 A). Sin embargo, vemos que la falta de *ph* en el dominio Nub produce una activación ectópica de la vía, que se extiende sobre todo a la parte más proximal de dicha región (Fig. R12 B' flechas amarillas) y no tanto a la zona central del disco. A pesar de que el análisis detallado de clones *ph^{KD}* se describe más adelante, conviene reforzar el argumento previo mostrando que solo en aquellos clones de la zona proximal del apéndice se activa ectópicamente el reportero *10xSTAT-GFP* (Fig. R12 C' flechas amarillas), pero no en los de la zona distal del apéndice ni en el notum (Fig. R12 C flechas blancas). Estos resultados sugieren que la activación ectópica conjunta de las vías JNK y JAK/STAT solo se produce en la región proximal del apéndice. Por último, cabe destacar también que algunos clones *ph^{KD}*, en especial los de la zona proximal del apéndice, presentan una activación ectópica de JAK/STAT que afecta de manera no autónoma a las células silvestres fuera de los clones (Fig. R12 C asteriscos).

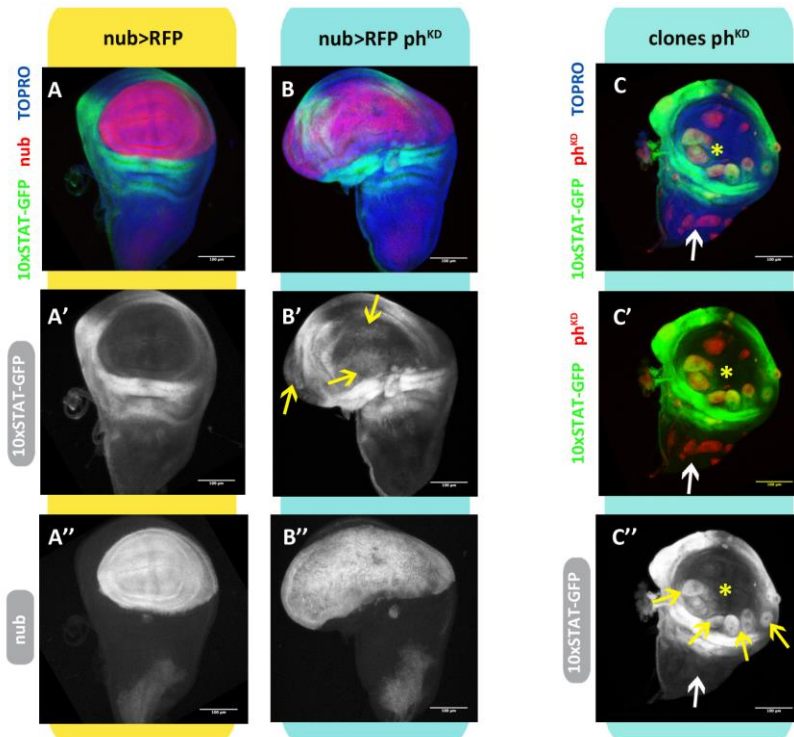
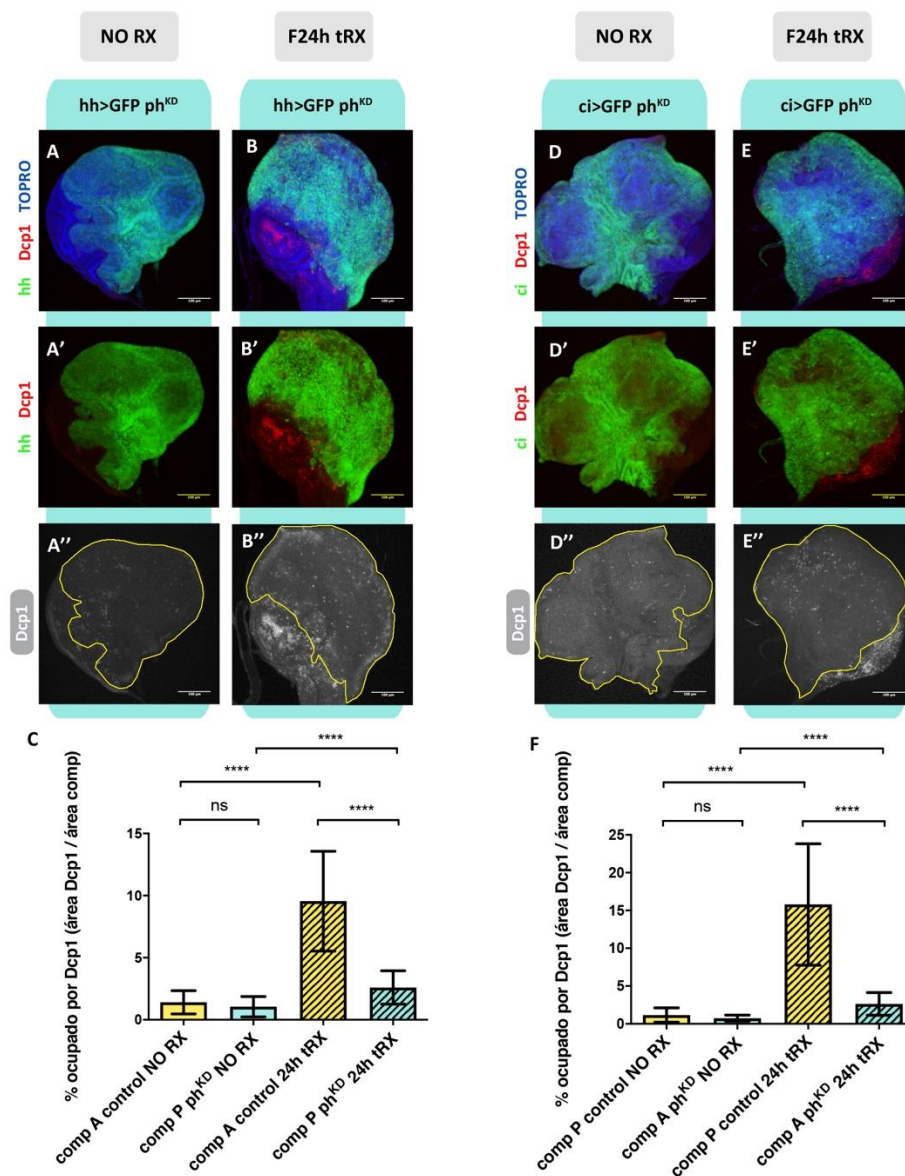


Figura R12: Activación de la vía JAK/STAT en respuesta a la eliminación de *ph*. A) El reportero *10xSTAT-GFP* muestra que la vía JAK/STAT se activa en la zona hinge en discos control *nub>RFP*. B) En discos *nub>ph^{KD}* hay una activación ectópica del reportero *10xSTAT-GFP* especialmente en la zona más proximal del dominio Nub, tal y como representan las flechas amarillas. C) Los clones *ph^{KD}* de la zona proximal del apéndice presentan activación ectópica de JAK/STAT (flechas amarillas), mientras que aquellos de la zona distal o del notum no (flechas blancas). Los asteriscos amarillos representan activación no autónoma de la vía en células silvestres fuera de los clones. Las barras de escala representan 100μm.

1.4.2. Células con falta de función de *ph* son refractarias a apoptosis

Analizamos la función proliferativa de la vía JNK en células *ph^{KD}*, pero se sabe que su activación ectópica en el disco de ala induce también apoptosis (McEwen and Peifer, 2005b; Shlevkov and Morata, 2012; Pinal *et al.*, 2018), por lo que quisimos comprobar si la activación de JNK en células mutantes para *ph* producía también este efecto. Para ello, analizamos los niveles de la caspasa efectora Dcp1 tanto en discos *hh>GFP ph^{KD}* como en *ci>GFP ph^{KD}* y vimos que los niveles de apoptosis en los compartimentos *ph^{KD}* son muy bajos, comparables a los de sus correspondientes compartimentos control (Fig. R13 A,C,D,F). El hecho de que los compartimentos *ph^{KD}* presenten activación ectópica de la vía JNK (Fig. R10 B) pero no apoptosis, sugiere la posibilidad de que las células *ph^{KD}* sean resistentes a apoptosis.

Para testar esta posibilidad sometimos a larvas *hh>GFP ph^{KD}* y *ci>GFP ph^{KD}* a un tratamiento con Rayos X (ver Materiales y Métodos) y fijamos los discos 24 horas tras los Rayos X (en adelante F24h tRX) para analizar la respuesta apoptótica. Lo que observamos es que los niveles de Dcp1 en compartimentos posteriores y anteriores *ph^{KD}* irradiados son significativamente menores en comparación con los compartimentos control irradiados, donde la respuesta apoptótica es muy elevada (Fig. R13 B,C,E,F). Este resultado indica que las células *ph* mutantes son refractarias a la apoptosis inducida por Rayos X. Sin embargo, apreciamos que esta resistencia es parcial, ya que los niveles de apoptosis en los compartimentos *ph^{KD}* irradiados siguen siendo superiores a los compartimentos *ph^{KD}* no irradiados (Fig. R13 A-C,D-F).



Resultados

Figura R13: Células con falta de función de *ph* son parcialmente resistentes a la apoptosis inducida por Rayos X. A,D) El compartimento posterior (A) y anterior (D) no irradiados mutantes para *ph* tienen niveles muy bajos de la caspasa efectora Dcp1, al igual que sus compartimentos control correspondientes. B,E) Tras 4000R de irradiación los compartimentos silvestres presentan niveles elevados de apoptosis, pero en el compartimento posterior (B) y anterior (E) mutantes para *ph* permanecen bajos. Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores (A'',B'') y anteriores (D'',E''). C,F) Se representa el porcentaje medio ocupado por la señal Dcp1 en los compartimentos de discos *hh>GFP ph^{KD}* (C) y *ci>GFP ph^{KD}* (F). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa la señal Dcp1 por el área de cada compartimento. Los histogramas con rayas diagonales representan que han sido irradiados. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos **** muestran que la diferencia es significativa a $P < 0.0001$ y ns=no significativo a $P > 0.05$. $n=17$ discos (C, NO RX), $n=21$ discos (C, RX), $n=13$ (F, NO RX) y $n=16$ (F, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Para tratar de explicar esta resistencia de las células *ph^{KD}* a la apoptosis inducida por irradiación decidimos analizar la expresión o actividad de los distintos elementos que participan en la cascada apoptótica (Fig. I8) y tratar de detectar en qué punto se encuentra bloqueada. El primer factor que analizamos fue la expresión de *diap1*, que codifica la proteína inhibidora de apoptosis 1, ya que niveles elevados de la misma podrían explicar esta resistencia a la muerte. Para ello, eliminamos *ph* del compartimento posterior utilizando la línea *en-Gal4* y analizamos los niveles de intensidad media del reportero *diap1-lacZ* sin irradiar. Curiosamente, en células del borde A/P la señal del reportero *diap1-lacZ* aumenta (Fig. R14 A). Sin embargo, el resultado principal es que el compartimento posterior mutante para *ph* presenta niveles de expresión de *diap1* comparables a los del compartimento anterior control (Fig R14 A,B), de manera que esta primera hipótesis no nos sirve para explicar la resistencia a la apoptosis de las células *ph^{KD}*.

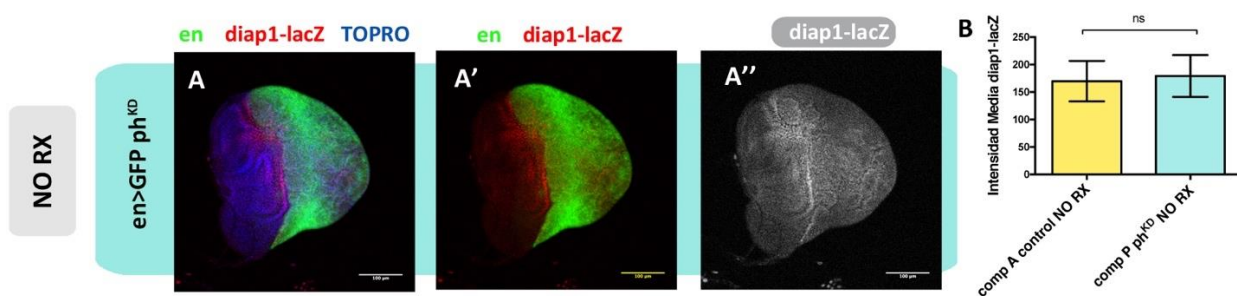


Figura R14: Células con falta de función de *ph* no presentan niveles elevados de expresión de *diap1*. A) Los niveles de expresión del reportero *diap1-lacZ* en discos con falta de función de *ph* en el compartimento posterior dirigido por *en-Gal4* son similares en ambos compartimentos. B) Se representa la intensidad media de la señal *diap1-lacZ* en el compartimento anterior control (histograma amarillo, $n=10$) y en el posterior *ph^{KD}* (histograma azul, $n=10$), que no presentan diferencias (ns=no significativa a $P > 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Upstream de Diap1 en el programa apoptótico de *Drosophila* se encuentran los genes proapoptóticos *reaper*, *hid* y *grim* (Fig. I8), y pudiera ser que estuvieran bloqueados en células *ph^{KD}*. Para testar esta hipótesis eliminamos *ph* del compartimento anterior mediante la línea *ci-Gal4* y analizamos los niveles del reportero *hid-GFP*, que consiste en la versión de la proteína proapoptótica Hid fusionada con un tag GFP. En este caso, el compartimento anterior lo delimitamos mediante el marcaje con un anticuerpo anti-Ci. Sin irradiar, la intensidad media de la señal del reportero *hid-GFP* es comparable en ambos compartimentos (Fig. R15 A,C). Entendemos que se trata de una señal basal y uniforme del reportero que no se corresponde con apoptosis, ya que en condiciones normales los niveles de Dcp1 en el disco son muy bajos, como hemos demostrado previamente (Fig. R13 A,D). Cuando irradiamos estos discos *ci>ph^{KD}* observamos que la intensidad media del *hid-GFP* aumenta significativamente en el compartimento posterior control respecto a su control no irradiado (Fig. R15 A-C), señal de que sufre apoptosis. Sin embargo, la intensidad media de este reportero en el compartimento anterior *ph^{KD}* no aumenta significativamente tras la irradiación (Fig. R15 A-C) y, aunque es menor a la intensidad del compartimento posterior control irradiado, la diferencia no es significativa (Fig. R15 B,C).

A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los compartimentos irradiados a nivel de intensidad del reportero *hid-GFP*, observamos una diferencia cualitativa muy clara en su patrón de expresión (Fig. R15 B''): mientras que en el compartimento posterior control el reportero presenta una señal punteada intensa, reflejo de que las células están sufriendo apoptosis (Fig. R13 E), en el compartimento *ph^{KD}* la señal no se modifica y sigue siendo uniforme, lo que refleja que el gen proapoptótico *hid* en células con falta de función de *ph* no está respondiendo a la irradiación.

Resultados

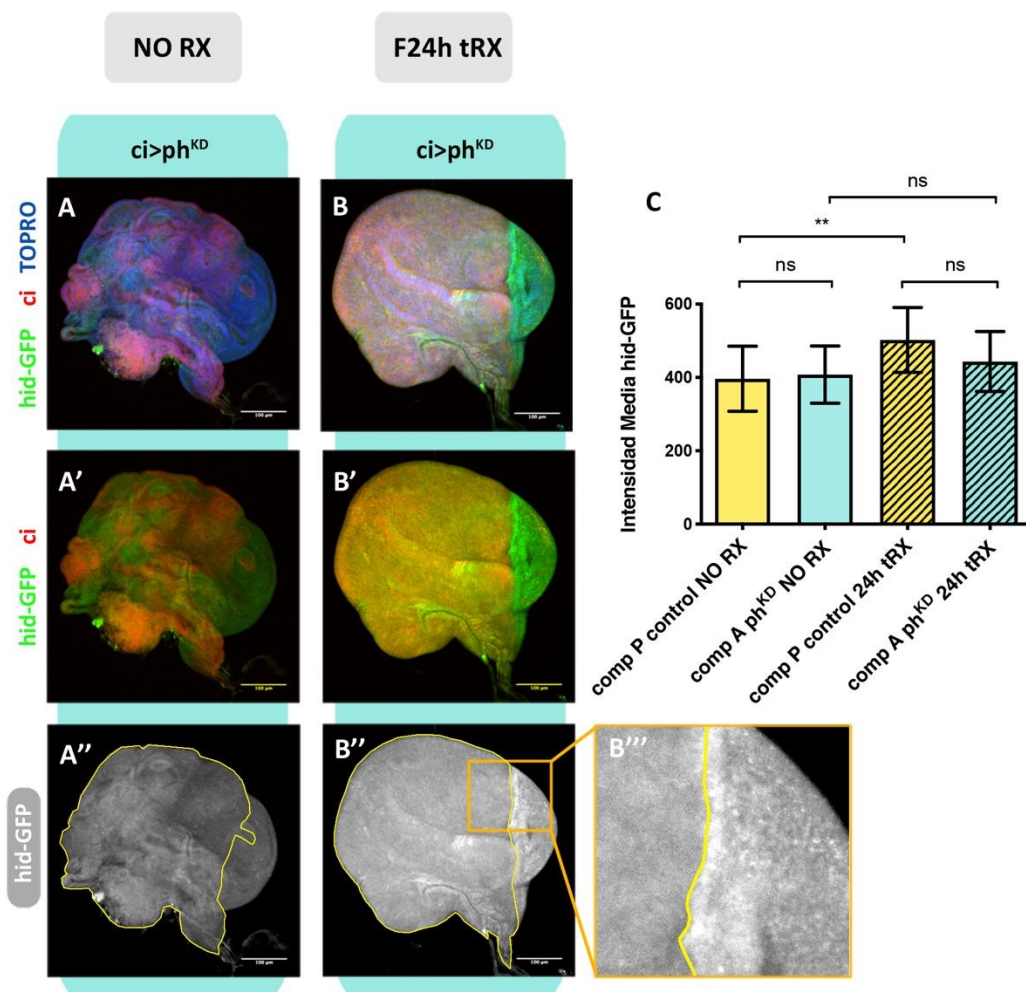


Figura R15: Células con falta de función de *ph* presentan niveles bajos de activación de Hid tras los Rayos X. A) El reportero *hid-GFP* tiene un nivel basal de activación en discos *ci>ph^{KD}* sin irradiar. B) Tras la irradiación, el compartimento posterior control responde activando *hid-GFP* en forma de puntos intensos característicos de células apoptóticas, mientras que en el compartimento anterior *ph^{KD}* la señal no se modifica. B''' es una magnificación de la zona marcada por el rectángulo naranja en B'' para apreciar las diferencias en el patrón de activación de la señal de *hid-GFP*. Las líneas amarillas en A'' y B'' representan los compartimentos anteriores, marcados con tinción anti-Ci, y en B''' representa el borde de compartimentos. C) Se representa la intensidad media de la señal de *hid-GFP* en cada compartimento de discos *ci>ph^{KD}* no irradiados (histogramas lisos) e irradiados (histogramas con rayas diagonales). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos y "ns" muestran el grado de significación de cada comparativa (**=significativo a $P < 0.01$ y ns=no significativo a $P > 0.05$). $n=14$ discos (C, NO RX) y $n=14$ discos (C, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

La falta de respuesta de *hid* sugiere que la inhibición de la apoptosis inducida por irradiación en células con falta de función de *ph* está *upstream* de los genes proapoptóticos. Para confirmar esta hipótesis, sobreexpresamos el gen proapoptótico *hid* en compartimentos posteriores control y en mutantes para *ph* (ver Materiales y Métodos). Nótese que en los discos control sobreexpresamos también un *UAS-y^t*

neutro para equiparar el número de secuencias *UAS* con el genotipo experimental. La sobreexpresión de *hid* induce una fuerte activación de la caspasa efectora Dcp1, no solamente en el compartimento posterior control como era de esperar (Fig. R16 A), sino también en el compartimento *ph^{KD}* (Fig. R16 B). Este resultado confirma que la maquinaria apoptótica *downstream* de los genes proapoptóticos se encuentra perfectamente funcional en células *ph* mutantes y que por tanto el bloqueo de la apoptosis en estas células se encuentra en un punto de la ruta *upstream* de los genes proapoptóticos.

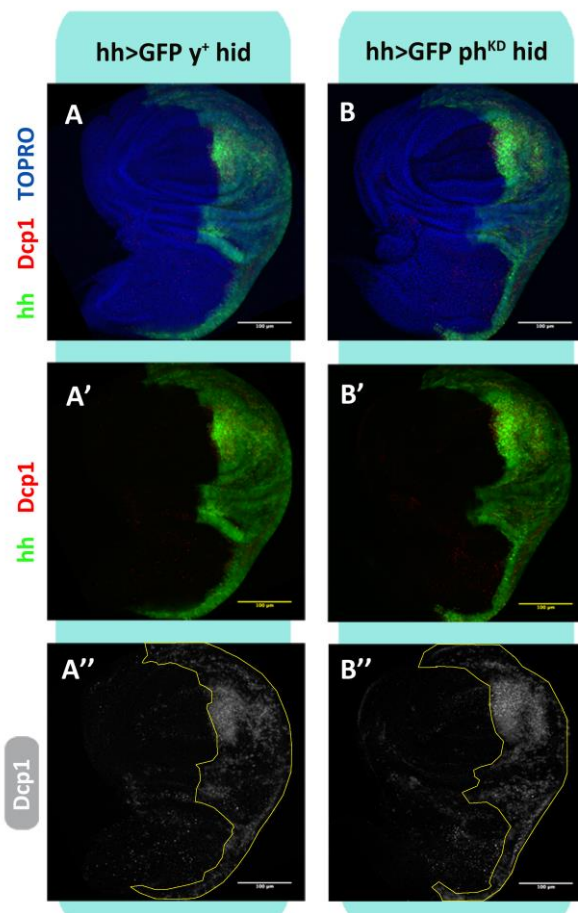


Figura R16: La sobreexpresión del gen proapoptótico *hid* en células con falta de función de *ph* induce apoptosis. A-B) La sobreexpresión de *hid* activa niveles elevados de la caspasa efectora Dcp1 tanto en el compartimento posterior control (A), donde sobreexpresamos un *UAS-y⁺* neutro para equiparar el número de secuencias *UAS* con el genotipo experimental, como en el compartimento posterior mutante para *ph* (B). Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores de cada disco. Las barras de escala representan 100 μ m.

Se conoce que la activación transcripcional de los genes proapoptóticos en respuesta a estrés está regulada por los factores de transcripción Jun y Fos de la vía JNK y por el factor de transcripción p53 (Fig. I8). Debido al rol que juegan estos dos elementos en la inducción de apoptosis, nos propusimos monitorizar su actividad en células con falta de función de *ph* en respuesta a irradiación.

Resultados

Comenzamos analizando la expresión del reportero *TRE:RFP* de actividad de la vía JNK. Como hemos mencionado previamente, en condiciones normales el disco de ala no presenta actividad de JNK (Fig. R10 A,C,E). Sin embargo, la falta de *ph* en el compartimento posterior induce actividad moderada de la vía de forma no autónoma en células del compartimento anterior cercanas al borde de compartimentos (Fig. R10 B y Fig. R17 A), de ahí que incluyamos también en la cuantificación la intensidad de la señal de JNK en este compartimento control (Fig. R17 C), que es comparable al nivel de activación de JNK en el compartimento *ph^{KD}* (Fig. R17 A,C). Por su parte, la irradiación de estos discos produce una clara ganancia de la vía JNK en todo el compartimento anterior control (Fig. R17 A,B), aunque la cuantificación no muestra que haya diferencias a nivel de la intensidad media de la señal (Fig. R17 C). Tampoco hay diferencias significativas entre el compartimento *ph^{KD}* irradiado y no irradiado (Fig. R17 A-C). Sin embargo, la intensidad media de *TRE:RFP* en el compartimento anterior control irradiado sí es significativamente superior a la activación de la vía en el compartimento *ph^{KD}* irradiado (Fig. R17 B,C).

Al margen de estas cuantificaciones y, en paralelo a lo que encontrábamos con el reportero *hid-GFP* (Fig. R15 B'''), observamos una clara diferencia en el patrón de expresión de la vía JNK (Fig. R17 B'''): la irradiación en el compartimento anterior control provoca expresión del reportero *TRE:RFP* en forma de puntos intensos, compatible con células que se están muriendo en respuesta a los Rayos X, mientras que la señal en el compartimento mutante para *ph* sigue siendo mayormente uniforme y comparable a lo que observamos sin irradiar (Fig. R17 A,B). Este resultado sugiere que en células con falta de función de *ph* la respuesta de activación de JNK tras los Rayos X es menor y que la inhibición de la apoptosis en estas células se encuentra *upstream* de la vía JNK.

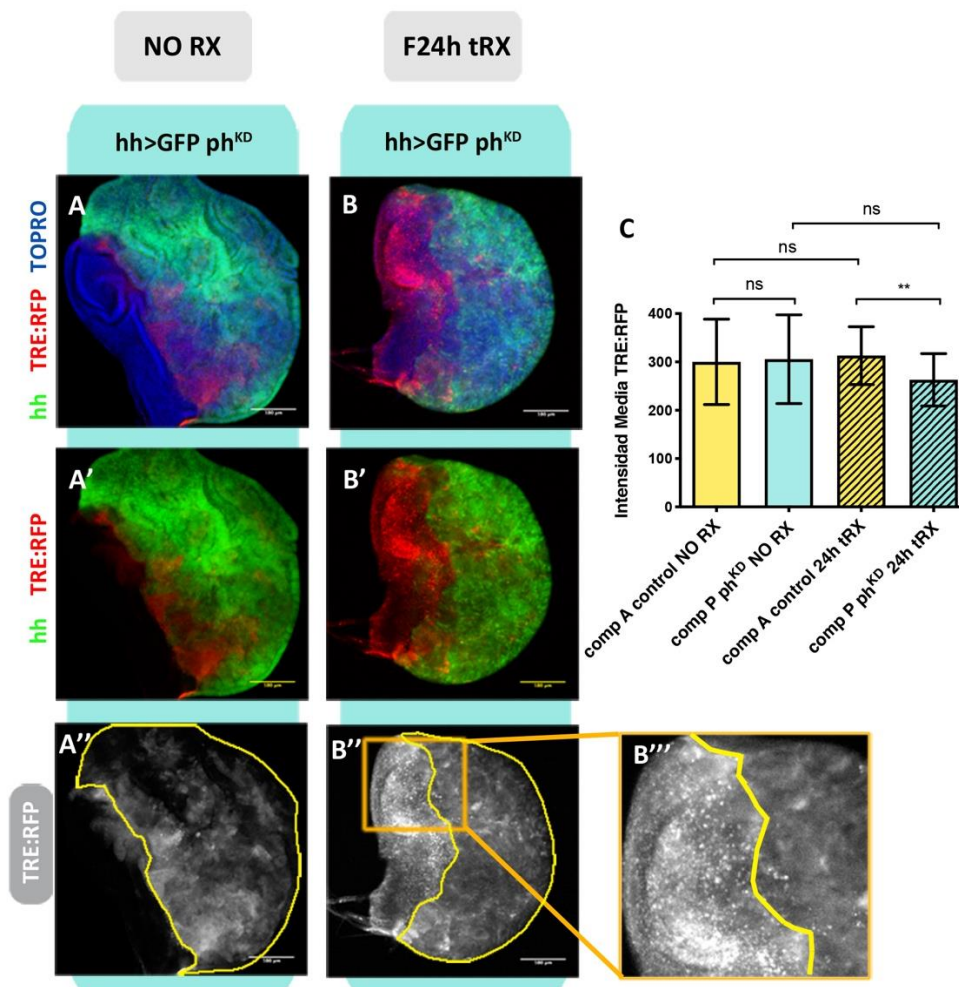


Figura R17: Células con falta de función de *ph* presentan niveles bajos de activación de JNK tras los Rayos X. A) En discos *hh>GFP ph^{KD}* la vía JNK se activa en el compartimento posterior con falta de *ph* y también en algunas células del compartimento anterior cercanas al borde A/P. B) Tras la irradiación, el compartimento anterior control responde activando el reportero *TRE:RFP* en forma de puntos intensos característicos de células apoptóticas, mientras que en el compartimento *ph^{KD}* la señal no se modifica. B'' es una magnificación de la zona marcada por el rectángulo naranja en B'' para apreciar las diferencias en el patrón de activación de la señal de *TRE:RFP*. Las líneas amarillas en A'' y B'' representan los compartimentos posteriores y en B''' representa el borde de compartimentos. C) Se representa la intensidad media de la señal de *TRE:RFP* en cada compartimento de discos *hh>ph^{KD}* no irradiados (histogramas lisos) e irradiados (histogramas con rayas diagonales). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparativa (ns=no significativo a $P>0.05$ y **=significativo a $P<0.01$. $n=18$ discos (C, NO RX) y $n=20$ discos (C, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Para confirmar esta posibilidad, sobreexpresamos en el compartimento posterior una versión de la quinasa JNKK Hemipterous (*hep^{CA}*), que activa la vía JNK de forma permanente. Como era de esperar, la sobreexpresión de la vía JNK tiene un fuerte impacto apoptótico en el compartimento posterior silvestre, tal y como refleja el marcaje con la caspasa Dcp1 (Fig. R18 A). Por su parte, vemos que esta sobreexpresión

Resultados

también es capaz de inducir muerte celular en un compartimento posterior mutante para *ph* (Fig. R18 B), que queda muy reducido en tamaño. Este resultado confirma que la falta de apoptosis tras irradiación en estas células *ph^{KD}* se encuentra a un nivel *upstream* de la vía JNK, por lo que nos propusimos analizar elementos de la cascada apoptótica que regulan la activación de la vía JNK.

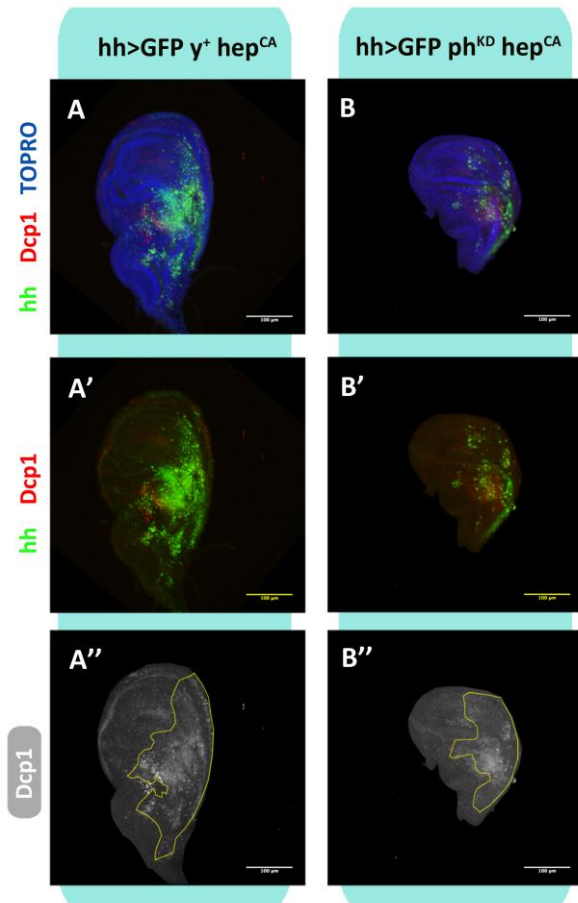


Figura R18: La activación de la vía JNK mediante la versión constitutivamente activa de Hep induce apoptosis. A-B) La sobreexpresión de *hep^{CA}* activa niveles elevados de la caspasa efectora Dcp1 tanto en el compartimento posterior control (A), donde sobreexpresamos un *UAS-y⁺* neutro para equiparar el número de secuencias *UAS* con el genotipo experimental, como en el compartimento posterior mutante para *ph* (B). Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores de cada disco. Las barras de escala representan 100μm.

Se ha descrito que tras un estímulo apoptótico las células producen especies reactivas del oxígeno (ROS), que activan la vía JNK (Santabárbara-Ruiz *et al.*, 2015) (Fig. I8). Así pues, decidimos monitorizar la producción de ROS mediante el marcador dihidroetidio (DHE) en discos *hh>GFP ph^{KD}*. En condiciones normales sin irradiar no encontramos ROS en un compartimento anterior silvestre y tampoco en un compartimento posterior afectado por la falta de *ph* (Fig. R19 A,C). Sin embargo, el compartimento anterior control responde a los Rayos X produciendo elevados niveles de DHE (Fig. R19 A-C), muy superiores a los que observamos en el compartimento posterior *ph^{KD}* (Fig. R19 B,C). Cabe destacar que los

niveles de ROS en el compartimento posterior afectado por la falta de *ph* en respuesta a irradiación son significativamente superiores a los que encontramos sin irradiar (Fig. R19 A-C). Esta misma observación la vimos al analizar los niveles de Dcp1 en discos *hh>GFP ph^{KD}* en respuesta a irradiación (Fig. R13 A-C), lo que apunta nuevamente a que la inhibición de la apoptosis en células con falta de función de *ph* no es completa, sino parcial.

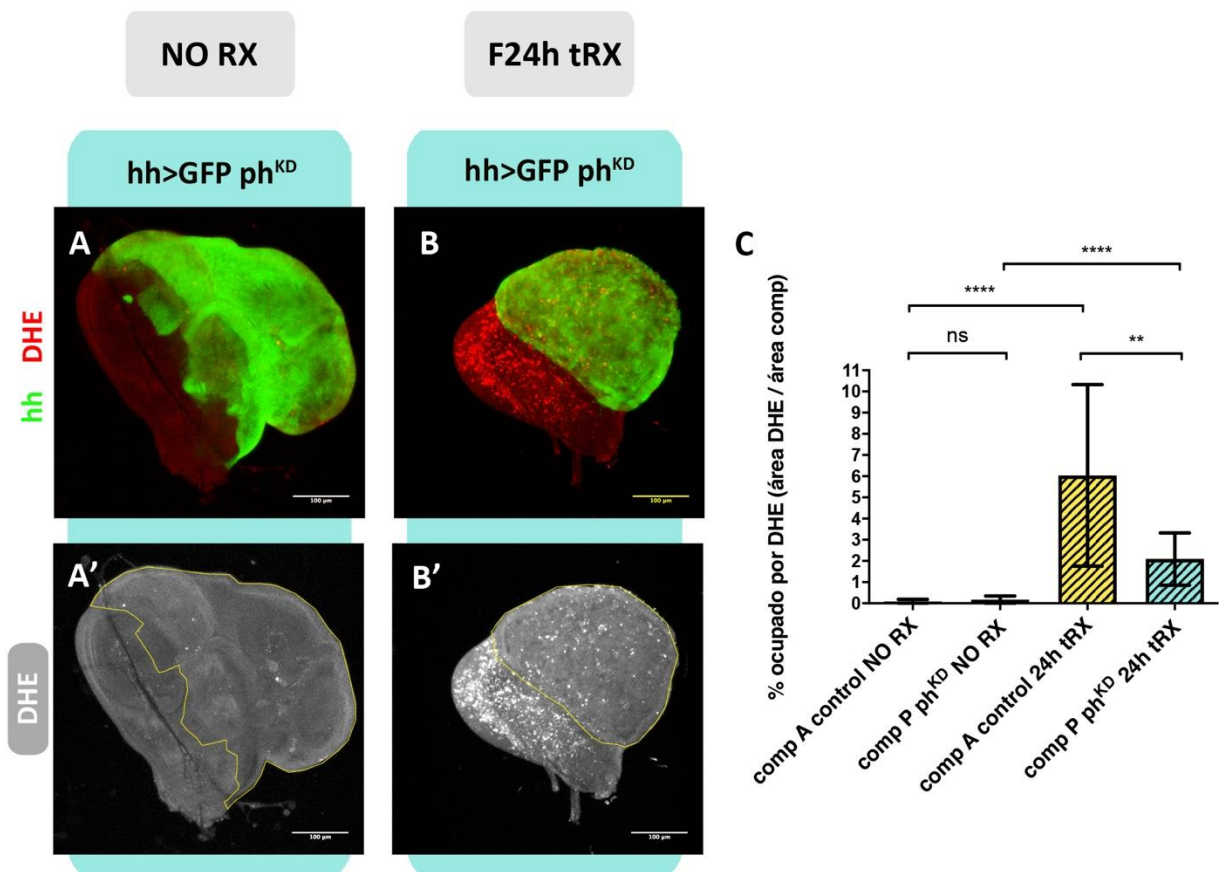


Figura R19: Células con falta de función de *ph* producen bajos niveles de ROS tras los Rayos X. A) El marcaje con dihidroetidio (DHE) muestra que en discos *hh>GFP ph^{KD}* sin irradiar no hay ROS. B) Tras la irradiación, ambos compartimentos producen ciertos niveles de ROS, aunque son mucho más elevados en el compartimento anterior control que en el compartimento posterior *ph^{KD}*. Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores. C) Se representa el porcentaje medio ocupado por la señal DHE en los compartimentos de discos no irradiados (histogramas lisos) e irradiados (histogramas con rayas diagonales). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa la señal DHE por el área de cada compartimento. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparativa (****=significativo a $P<0.0001$, **=significativo a $P<0.01$ y ns=no significativo a $P>0.05$). $n=12$ discos (C, NO RX) y $n=10$ discos (C, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Resultados

Los resultados obtenidos tras la monitorización de ROS sugieren que la falta de activación de JNK y la consecuente inhibición de apoptosis que observamos en células con falta de función de *ph* en respuesta a irradiación podría deberse a la falta de producción de ROS. Sin embargo, se ha descrito que también se pueden producir ROS *downstream* de JNK, ya que activa la transcripción de un gen llamado *moladietz* que codifica un factor de maduración Duox necesario para la producción de ROS, estableciéndose así un bucle de retroalimentación positiva entre ROS y JNK (S. J. Khan *et al.*, 2017; Pinal *et al.*, 2018). El hecho de que ROS y JNK se activen mutuamente complica la interpretación acerca de si la menor respuesta de activación de la vía JNK en células *ph^{KD}* en respuesta a irradiación es causa o consecuencia de la falta de producción de ROS. Así pues, quisimos estudiar el comportamiento de otro elemento, como es el caso de p53, que se conoce que también activa la vía JNK y los genes proapoptóticos en respuesta a Rayos X (Brodsky *et al.*, 2000; McEwen and Peifer, 2005b; Bilak and Su, 2009; Fan *et al.*, 2010).

Para detectar la presencia de p53 utilizamos el reportero *p53-GFP*, una versión de la proteína p53 fusionada con un tag GFP, y realizamos el experimento en discos *ci>ph^{KD}* irradiados y sin irradiar. En este caso, el compartimento anterior lo delimitamos mediante el marcaje con un anticuerpo anti-Ci. En discos sin irradiar la intensidad media de la señal del reportero *p53-GFP* es comparable en ambos compartimentos (Fig. R20 A,C). Tal y como comentábamos para el reportero *hid-GFP*, esta señal basal de p53 no se correlaciona con células en apoptosis. Cuando irradiamos estos discos observamos que la intensidad media de *p53-GFP* aumenta significativamente tanto en el compartimento posterior control (Fig. R20 A-C) como en el compartimento anterior *ph^{KD}* (Fig. R20 A-C), aunque no se detectan diferencias a nivel de intensidad entre los compartimentos irradiados entre sí (Fig. R20 B,C). No obstante, las diferencias en el patrón de expresión de p53 son claras, tal y como veíamos para los reporteros *hid-GFP* (Fig. R15 B''') y *TRE:RFP* (Fig. R17 B'''): el compartimento anterior *ph^{KD}* no presenta el patrón punteado intenso de *p53-GFP* característico de las células del compartimento posterior control en apoptosis (Fig. R20 B'''). Estos resultados indican que la respuesta de p53 es baja en células con falta de función de *ph* tras los Rayos X y que la inhibición de la apoptosis en estas células se encuentra *upstream* de p53.

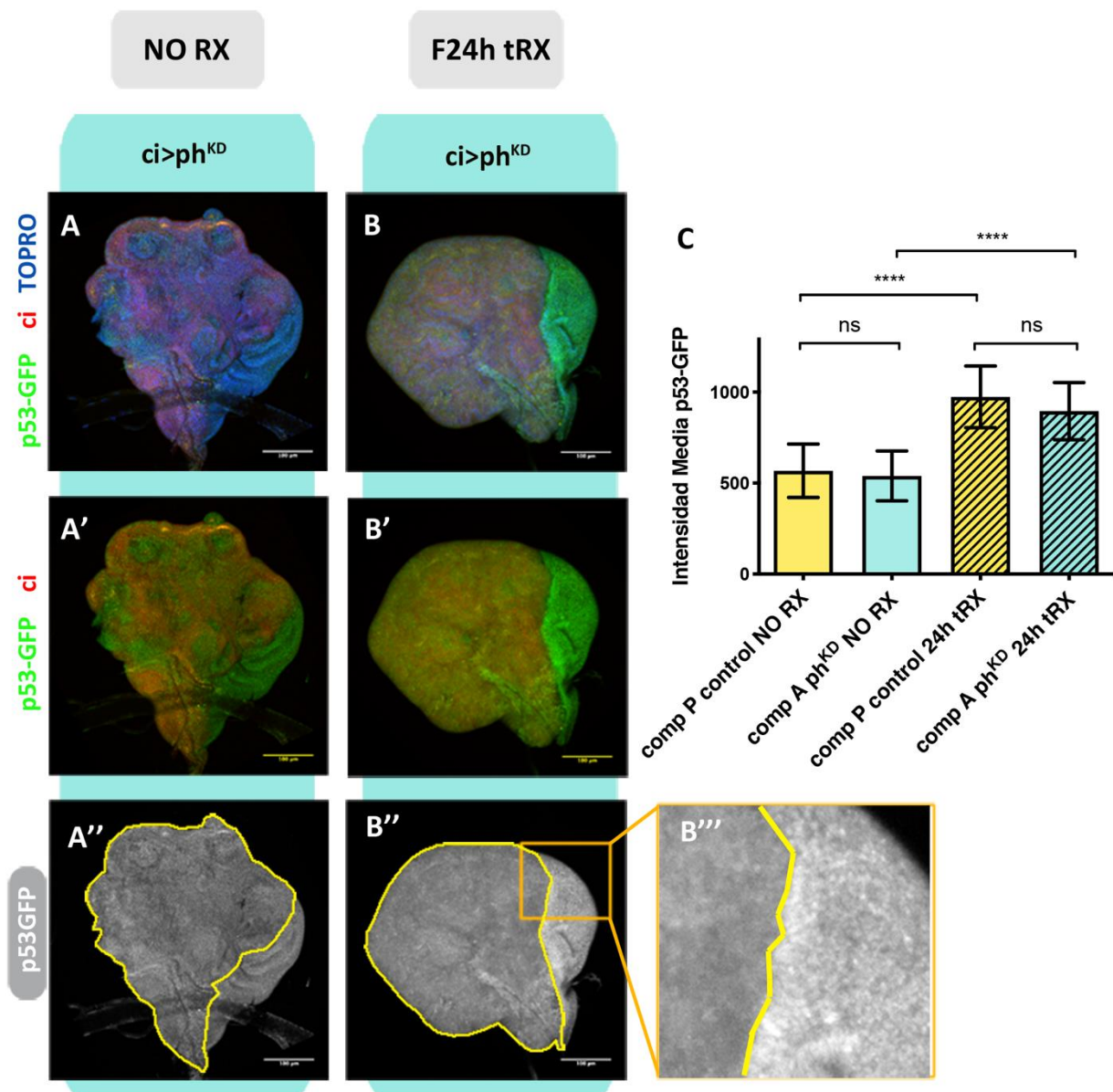


Figura R20: Células con falta de función de *ph* presentan niveles bajos de p53 tras los Rayos X. A) El reportero *p53-GFP* tiene un nivel basal de activación en discos *ci>ph^{KD}* sin irradiar. B) Tras la irradiación, el compartimento posterior control responde expresando *p53-GFP* en forma de puntos intensos característicos de células apoptóticas, mientras que en el compartimento *ph^{KD}* el patrón de la señal no se modifica. B''' es una magnificación de la zona marcada por el rectángulo naranja en B'' para apreciar con detalle las diferencias en el patrón de activación de la señal de *p53-GFP*. Las líneas amarillas en A'' y B'' representan los compartimentos anteriores, marcados con tinción anti-Ci, y en B''' representa el borde de compartimentos. C) Se representa la intensidad media de la señal de *p53-GFP* en cada compartimento de discos *ci>ph^{KD}* no irradiados (histogramas lisos) e irradiados (histogramas con rayas diagonales). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparativa (ns=no significativo a $P>0.05$ y ****=significativo a $P<0.0001$). $n=15$ discos (C, NO RX) y $n=22$ discos (C, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Resultados

Esta posibilidad la testamos mediante la sobreexpresión de *p53*. Vimos que además de inducir apoptosis en un compartimento posterior silvestre (Fig. R21 A), también lo hace en un compartimento *ph^{KD}* (Fig. R21 B), lo que confirma que la falta de apoptosis en células *ph^{KD}* en respuesta a irradiación se encuentra a un nivel *upstream* de *p53*.

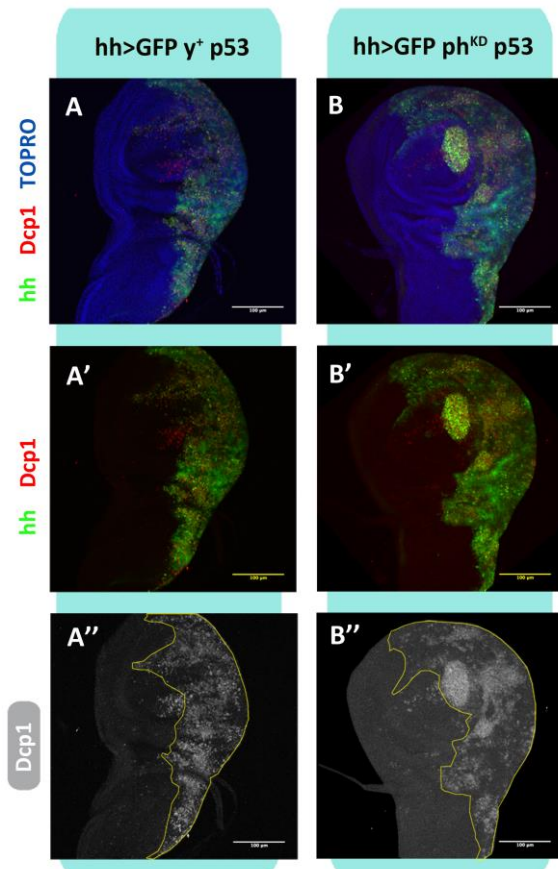


Figura R21: La sobreexpresión de p53 en células con falta de función de *ph* induce apoptosis. A-B) La sobreexpresión de p53 activa niveles elevados de la caspasa efectora Dcp1 tanto en el compartimento posterior control (A), donde sobreexpresamos un *UAS-y⁺* neutro para equiparar el número de secuencias *UAS* con el genotipo experimental, como en el compartimento posterior mutante para *ph* (B). Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores de cada disco. Las barras de escala representan 100µm.

La falta de activación de JNK en células con falta de función de *ph* tras ser irradiadas podría ser debida a la falta de respuesta de *p53* en estas células. Sin embargo, también se ha descrito que *p53* y la vía JNK son capaces de activarse mutuamente (Shlevkov and Morata, 2012). Así pues, tampoco podemos discriminar entre la posibilidad de que la falta de activación de JNK se debe a la falta de respuesta de *p53* o, si por el contrario, es la falta de *p53* la que se debe a la menor activación de JNK. Para tratar de acotar más en qué punto de la ruta apoptótica se encuentra la inhibición de la apoptosis inducida por irradiación que produce la falta de *ph* decidimos estudiar un regulador de la vía que se encuentre *upstream* de *p53* y JNK.

Nos propusimos entonces analizar si la falta de apoptosis que observamos en células con falta de función de *ph* podría deberse a que la activación de la vía ATM en respuesta al daño en el ADN tras los Rayos X está comprometida, ya que ATM activa a p53 a través de la quinasa intermediaria Chk2 (Fig. I8). Debido a que una respuesta muy inicial de ATM es que fosforila a la histona H2Av, eliminamos *ph* del compartimento posterior del disco y llevamos a cabo el marcaje por inmunofluorescencia de pH2Av, que se ha utilizado como indicador de la activación de esta ruta en sus inicios y monitorizar la actividad de ATM. Sin irradiar, vemos que los niveles de pH2Av son comparables en ambos compartimentos (Fig. R22 A,C). Sin embargo, tras la irradiación, los niveles de fosforilación de H2Av aumentan significativamente en el compartimento anterior control en comparación con la condición no irradiada (Fig. R22 A-C), indicando que se produce la activación de la quinasa ATM. A pesar de que en el compartimento posterior *ph^{KD}* irradiado los niveles de pH2Av también aumentan respecto a la condición sin irradiar (Fig. R22 A-C), vemos que presenta una falta de respuesta significativa en comparación con el compartimento anterior control irradiado (Fig. R22 B,C). Estas diferencias en los niveles de fosforilación de H2Av se visualizan especialmente bien en las imágenes que mostramos de determinadas regiones del disco a altos aumentos (Fig. R22 A'',B''): claramente, se observa que hay una falta de focos intensos de fosforilación de H2Av en el caso del compartimento *ph^{KD}* irradiado que, por el contrario, sí se observan en los núcleos de las células del compartimento anterior control (Fig. R22 B'').

Resultados

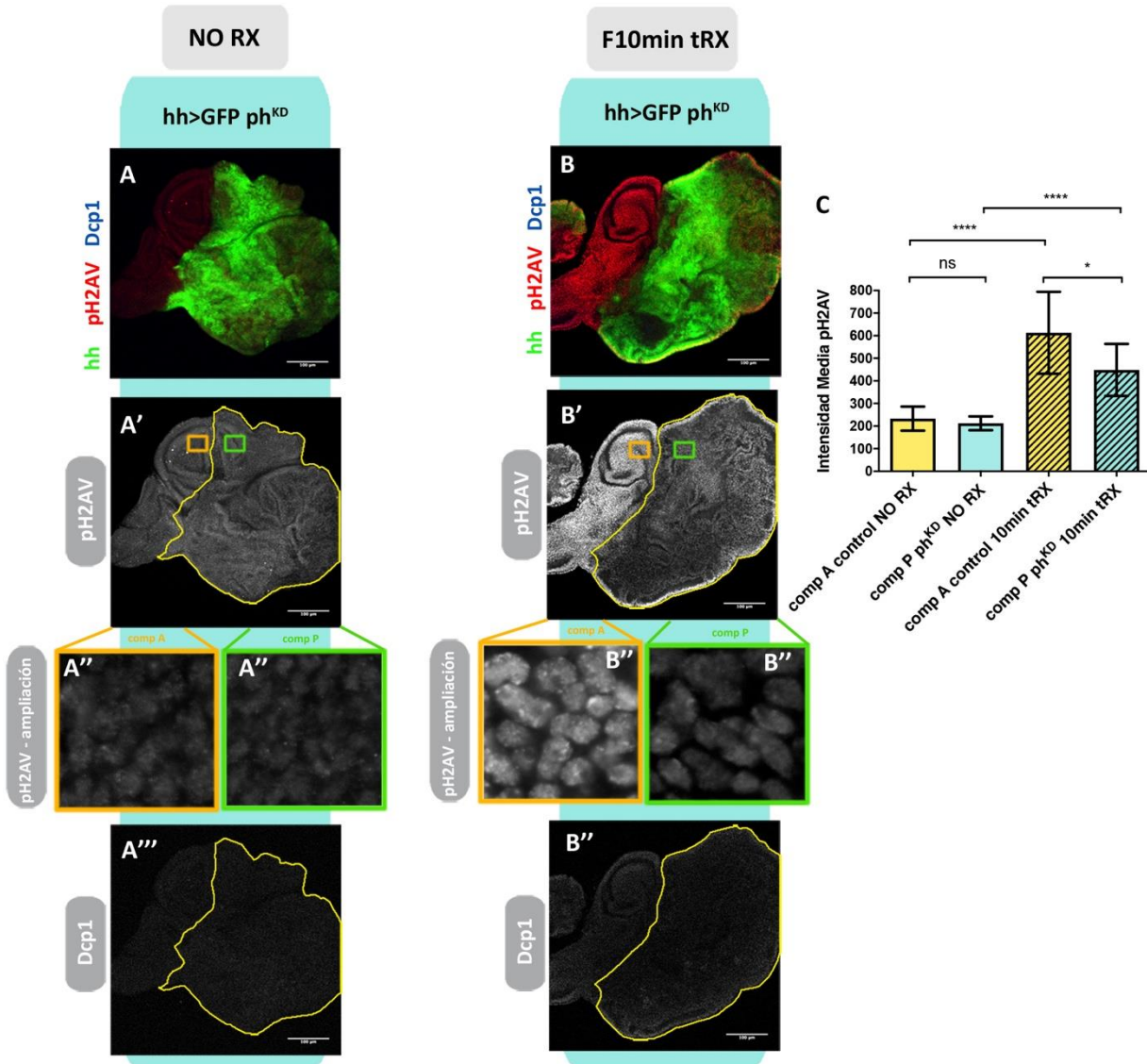


Figura R22: Células con falta de función de *ph* presentan bajos niveles de fosforilación de H2Av en respuesta a Rayos X. A,B) Se muestran las tinciones de pH2Av (en rojo) y Dcp1 (en azul) en discos *hh>GFP ph^{KD}* sin irradiar (A) y discos del mismo genotipo fijados 10 minutos tras la irradiación (B). En estas condiciones no hay marcaje con Dcp1 en ninguno de los casos (A''',B'''). En A'' y B'' se muestran ampliaciones de las regiones correspondientes a los compartimentos anteriores (naranja) o posteriores (verde). Nótese la respuesta a la irradiación del compartimento anterior (B'' naranja) en forma de focos intensos de fosforilación de H2Av en la cromatina; esta respuesta es muy inferior en el compartimento posterior *ph^{KD}* (B'' verde). Las líneas amarillas representan los compartimentos posteriores. C) Se representa la intensidad media de la señal de pH2Av en cada compartimento de discos *hh>GFP ph^{KD}* no irradiados (histogramas lisos) e irradiados (histogramas con rayas diagonales). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación de cada comparativa (ns=no significativo a $P>0.05$, *=significativo a $P<0.05$ y ****=significativo a $P<0.0001$). $n=9$ discos (C, NO RX) y $n=13$ discos (C, RX). Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

Previo al experimento de p $H2Av$, la falta de respuesta apoptótica en células ph^{KD} la estábamos analizando 24 horas después del tratamiento con los Rayos X (Fig. 13,15,17,19 y 20). Sin embargo, en la literatura se ha descrito que la caspasa iniciadora Dronc tiene también un rol no apoptótico promoviendo la respuesta al daño en el ADN, ya que activa a ATM y esto da lugar a la fosforilación de H2Av (C. Khan *et al.*, 2017). Los resultados que hemos mostrado a lo largo de este apartado indican que el bloqueo de la ruta apoptótica en células ph^{KD} en respuesta a irradiación se encuentra *upstream* de p53 y JNK. Aún así, para asegurarnos de que realmente estábamos detectando una falta de respuesta de p $H2Av$ a un nivel muy inicial tras los Rayos X y no una consecuencia de un posible bloqueo en la cascada apoptótica a niveles más bajos que pudiera afectar a esta activación de ATM por parte de Dronc, en este caso diseccionamos los discos tan solo 10 minutos después de la irradiación (Fig. R22). Es importante mencionar que, a estos tiempos tan tempranos, los discos aún no presentan tinción con la caspasa efectora Dcp1 (Fig. R22 A''',B'''), lo que hace improbable la activación de ATM por la caspasa iniciadora Dronc. El hecho de que en estas condiciones veamos una falta de respuesta de la fosforilación de H2Av confirma que el bloqueo de la ruta apoptótica se encuentra a niveles muy *upstream* de la vía de respuesta al daño en el ADN, lo que muy probablemente explique la falta de apoptosis que vemos tras los Rayos X en células con falta de función de ph .

2. Análisis del comportamiento de clones de falta de función de ph

En el apartado anterior hemos visto que la eliminación de ph en el disco entero o en determinadas regiones del ala hace que las células proliferen en exceso y ocasionen grandes sobrecrecimientos tumorales, lo que indica que las células ph^{KD} son viables. Habiendo demostrado su viabilidad, nos propusimos a continuación analizar el comportamiento de clones de células con falta de función de ph (clones ph^{KD}) en un contexto de células con función normal de ph (ph^+), con el objetivo principal de estudiar su conexión con el fenómeno de competición celular.

2.1. Descripción general de los clones ph^{KD}

Utilizamos el método FLP/FRT para inducir clones ph^{KD} "flip-out" y también clones mutantes nulos ph^{505} (ver Materiales y Métodos: Análisis clonal). En primer lugar, quisimos demostrar que el fenotipo de clones ph^{KD} generados mediante la sobreexpresión de un ARNi frente a ph era similar al descrito para clones

Resultados

homocigóticos para el alelo mutante nulo ph^{505} (Martinez *et al.*, 2009; Gandille *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011; Beira *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018), y así poder validarlo como herramienta. Para ello, recogimos embriones de cada cruce experimental durante 5 días a 25°C, indujimos un choque térmico a 37°C en el momento en el que vimos aparecer las primeras larvas de tercer estadio y las diseccionamos a distintos tiempos tras la inducción de los clones. 48 horas tras su inducción, los clones ph^{KD} (marcados positivamente con GFP) mantienen aún el fenotipo típico de clones silvestres (comparar Fig. R23 A con Fig. R24 A), mientras que los clones ph^{505} (marcados por falta de GFP: 0XGFP) presentan ya una apariencia redondeada característica de la falta de función de ph (Fig. R23 E). Sin embargo, a partir de las 72 horas los clones ph^{KD} adquieren un fenotipo mutante comparable al de los clones ph^{505} (Fig. R23 B-D, F-H). Estos resultados indican que los clones ph^{KD} generados por la técnica “flip-out” son una herramienta válida para estudiar el comportamiento de células deficientes para ph . Debido a que el fenotipo mutante en clones ph^{KD} se establece a las 72 horas, a lo largo del trabajo se analizaron siempre los efectos producidos al menos 72 horas después de su inducción.

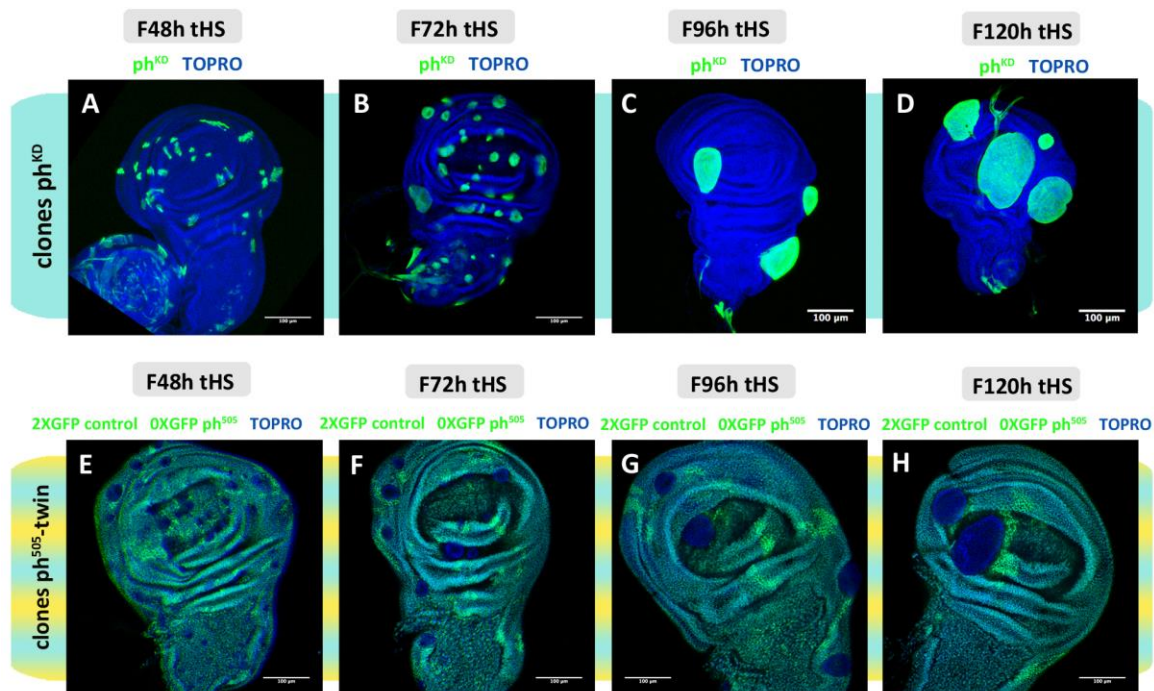


Figura R23: Cinética de clones ph^{KD} y clones ph^{505} a lo largo del tiempo. A-D) Clones ph^{KD} “flip-out” marcados positivamente con GFP y fijados a las 48 (A), 72 (B), 96 (C) y 120 (D) horas tras su inducción. El fenotipo de falta de función de ph se establece a las 72 horas. E-H) Clones ph^{505} marcados por la ausencia de GFP (0XGFP) fijados 48 (E), 72 (F), 96 (G) y 120 (H) horas tras su inducción. El disco de ala se marca con una copia de GFP, mientras que los clones “twin” silvestres se marcan con dos copias de GFP (2XGFP). Las barras de escala representan 100μm.

A continuación, comparamos el fenotipo de los clones ph^{KD} con el de clones neutros de sobreexpresión de GFP (Fig. R24). Tal y como anunciábamos anteriormente, los clones ph^{KD} presentan una morfología redondeada y forman unos bordes muy nítidos con las células silvestres de al lado, lo que sugiere que las células ph^{KD} minimizan el contacto con ellas (Fig. R24 C). En contraste, los clones control presentan una forma muy irregular (Fig. R24 A), indicando que sus células se mezclan libremente con las vecinas. Además, si analizamos los cortes ortogonales de los discos y nos fijamos en la organización que presentan los núcleos teñidos con TOPRO también observamos diferencias: contrariamente a los clones GFP^+ , que permanecen integrados en el epitelio (Fig. R24 B,B'), los clones ph^{KD} se segregan del epitelio en forma de esferas o vesículas de una única capa de células (Fig. R24 D,D') (Gandille *et al.*, 2010). La mayoría de estos clones quedan segregados en la parte basal del disco de ala (Fig. R24 D asteriscos amarillos), aunque los hay que se localizan en apical también (Fig. R24 D asterisco blanco). Nótese que algunos clones ph^{KD} presentan un tamaño grande, superior a clones neutros inducidos al mismo tiempo, dando lugar a un disco de ala sobrecrecido (Fig. R24 C). Más adelante, presentaremos un análisis más detallado del tamaño de los clones ph^{KD} y su capacidad proliferativa.

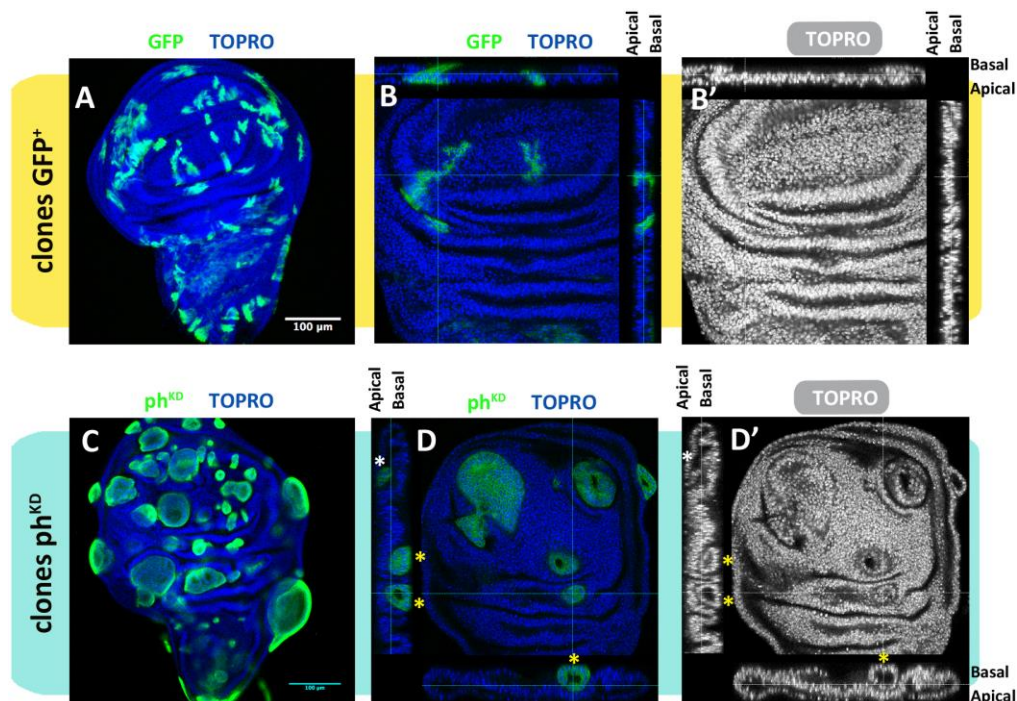


Figura R24: Morfología y organización epitelial de clones de sobreexpresión de GFP (GFP^+) y clones ph^{KD} . A,C) Los clones GFP^+ tienen una forma muy irregular (A), mientras que los clones ph^{KD} adoptan una morfología redondeada (C). B,B') La tinción con TOPRO muestra que los clones GFP^+ se integran en el epitelio del disco de ala. D,D') Los clones ph^{KD} quedan mayormente segregados en la zona basal del disco (asteriscos amarillos) y se observan algunos en la zona apical (asteriscos blancos). Las barras de escala representan $100\mu m$.

2.2. Fenotipo de segregación de los clones ph^{KD} : caracterización de la interfase con las células vecinas

El concepto de “afinidades celulares” se refiere a las propiedades que poseen unas células que las hacen más miscibles entre sí que con otro tipo de células que las rodean (Lawrence, 1997). Creemos que la segregación de los clones ph^{KD} probablemente es una consecuencia de que adquieren unas propiedades de afinidades celulares diferentes debido al cambio de identidad celular que produce la falta de función de ph (Randsholt *et al.*, 2000).

Para validar esta hipótesis, primero quisimos confirmar que la falta de ph modifica la identidad de las células. Para ello, analizamos la expresión de una batería de genes selectores que determinan la identidad celular. En primer lugar, examinamos la expresión de *Abdominal-B* (*AbdB*), *Ultrabithorax* (*Ubx*) y *Caudal* (*Cad*), ya que se conoce que ph es necesario para mantener el silenciamiento de estos tres genes Hox (Beuchle *et al.*, 2001). Estos genes no se activan en el disco de ala y, sin embargo, observamos que la falta de función de ph provoca una activación ectópica de los mismos (Fig. R25 A,B,C). También se ha descrito que la expresión de *engrailed* (*en*) y *Cubitus interruptus* (*Ci*) está afectada en los clones ph^{KD} (Randsholt *et al.*, 2000). En condiciones normales, *en* se expresa en el compartimento posterior del disco de ala y *Ci* en el anterior. Sin embargo, encontramos que los clones ph^{KD} del compartimento anterior y del posterior activan ectópicamente *en* y *Ci*, respectivamente (Fig. R25 D,E). Nótese que las células silvestres fuera del clon presentan niveles más elevados de *Ci* (Fig. R25 E, flechas). Además de estos genes de identidad celular que se conocía que están alterados en células ph^{KD} , también quisimos examinar la expresión de otros genes no descritos hasta el momento: *vestigial* (*vg*), *nubbin* (*nub*) y *eyegone* (*eyg*). *vg* se expresa en las partes más distales del ala, a ambos lados del borde dorsoventral, mientras que *nub* se expresa en el pouch y en parte del hinge. Sin embargo, los clones ph^{KD} que caen en estas regiones pierden su identidad de ala ya que desaparece la expresión de *vg* (Fig. R25 F) y de *nub* (Fig. R25 G). Por otra parte, también vimos que las células ph^{KD} que se encuentran en la región del notum que especifica *eyg* pierden la identidad de notum al disminuir su expresión (Fig. R25 H, flechas).

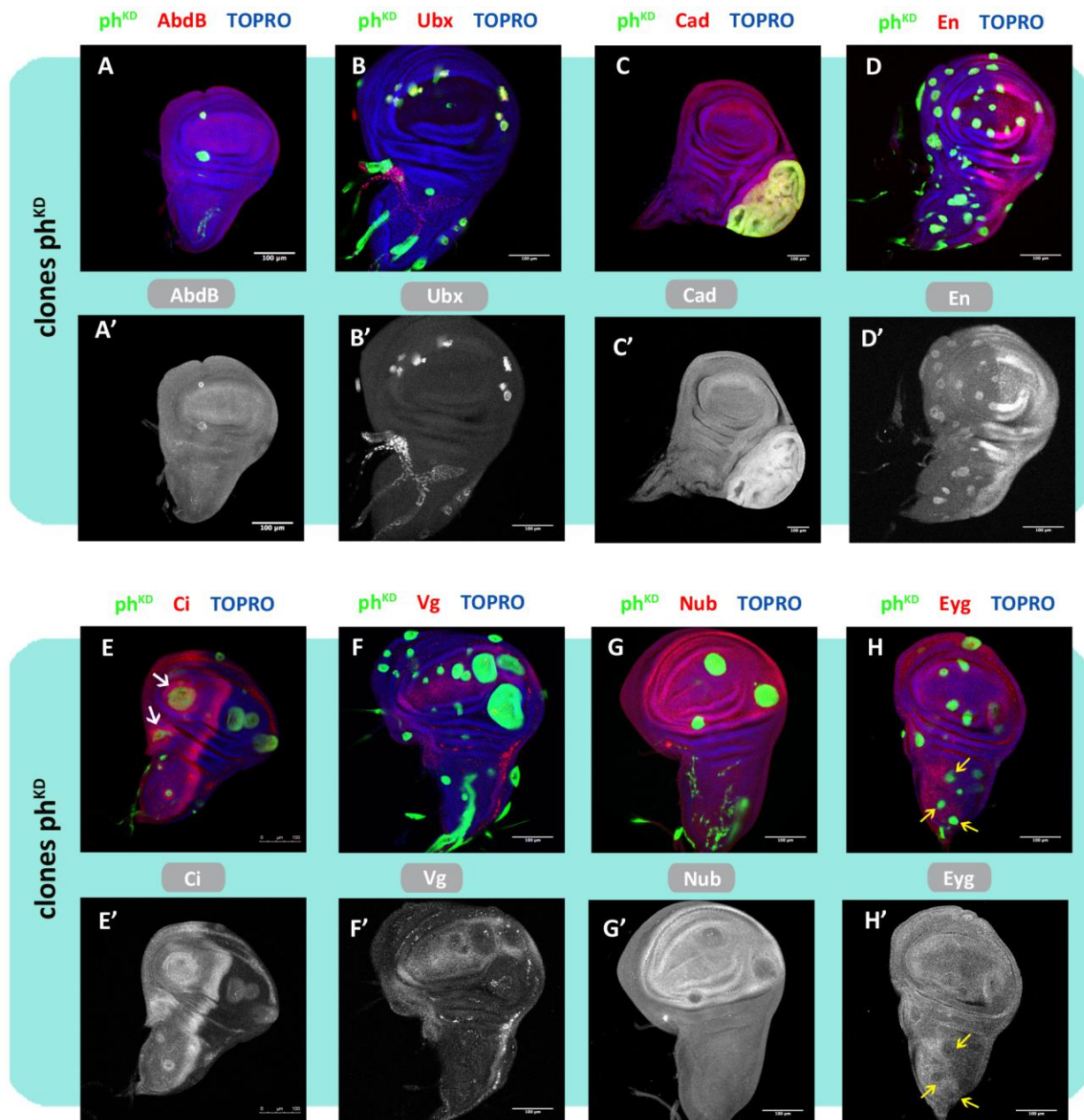


Figura R25: Expresión de genes que confieren identidad celular en clones *ph^{KD}*. A,B,C) Los clones *ph^{KD}* activan ectópicamente la expresión de Abdominal B (A), Ultrabithorax (B) y Caudal (C). D,E) Los clones *ph^{KD}* del compartimento anterior presentan activación ectópica de Engrailed (D), mientras que los del compartimento posterior activan Cubitus interruptus (E). Las flechas blancas representan el aumento en los niveles de Ci de las células silvestres que rodean al clon. Los clones *ph^{KD}* pierden la expresión de Vestigial (F), Nubbin (G) y Eyegone (H). Las flechas amarillas indican pérdida de expresión de Eyegone. Las barras de escala representan 100μm.

Tal y como mencionábamos en la Introducción, *ph* es un represor epigenético que, mediante modificaciones en la cromatina, mantiene inactivos los estados transcripcionales de genes que confieren

Resultados

identidad a las células. Así, las alteraciones que observamos en la expresión de los genes que determinan la identidad celular (Fig. R25) son un reflejo de los cambios que se producen en su cromatina tras la falta de *ph*, por lo que quisimos examinar algunos marcadores que muestran el estado de la cromatina. El silenciamiento génico llevado a cabo por el complejo Polycomb se caracteriza por la trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27me3). Como era de esperar, las tinciones con un anticuerpo anti-H3K27me3 indican que esta marca represiva de la cromatina desaparece en clones deficientes para *ph* (Fig. R26 A,B).

Además del grupo Polycomb, existe también otra vía importante de silenciamiento génico que es dependiente de la proteína HP1, cuya característica principal es marcar la cromatina mediante la trimetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9me3). Se trata de una marca represiva presente en los centrómeros y telómeros en forma de heterocromatina constitutiva (Filion *et al.*, 2010). Teñimos los clones *ph^{KD}* con un anticuerpo anti-H3K9me3 y vimos que esta marca represiva también desaparece en la cromatina de células *ph^{KD}* (Fig. R26 C,D). Por último, examinamos también la acetilación en la lisina 12 de la histona 4 (H4K12Ac), una marca característica de la cromatina transcripcionalmente activa – eucromatina, pero no vimos alteraciones significativas en las células *ph^{KD}* (Fig. R26 E).

Estos resultados indican que la falta de *ph* produce alteraciones drásticas en la cromatina, ya que disminuyen significativamente los estados reprimidos de la misma, y esta falta de represión o silenciamiento génico se traduce en las alteraciones que observamos en la expresión de genes que confieren identidad celular (Fig. R25). Es muy probable que, como consecuencia de este cambio de identidad, las células *ph^{KD}* adquieran una afinidad celular diferente que promueve que se unan más entre sí y se segreguen del epitelio para minimizar el contacto con las células silvestres vecinas.

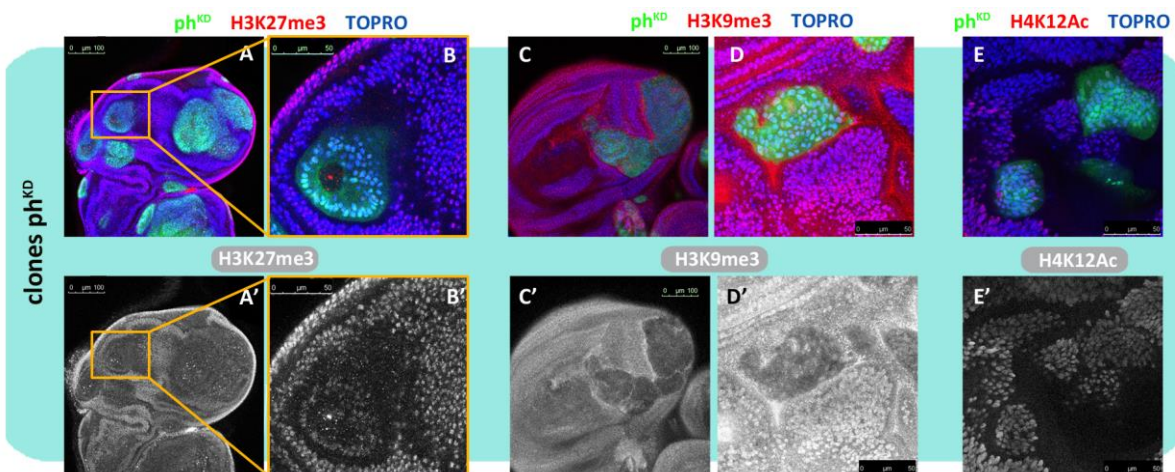


Figura R26: Estado de la cromatina en células ph^{KD} . A-D) Las marcas represivas de la cromatina H3K27me3 (A,B) y H3K9me3 (C,D) dependientes del grupo Polycomb y de la proteína HP1, respectivamente, desaparecen en células ph^{KD} . B es una magnificación de la zona marcada por el rectángulo naranja en A. E) No se aprecian cambios significativos en la marca de eucromatina H4K12Ac en clones ph^{KD} . Las barras de escala en A y C representan 100 μ m y en B, D y E representan 50 μ m.

Las diferencias en las afinidades celulares suelen deberse a que las células tienen diferentes moléculas de adhesión celular o de polaridad. En efecto, el fenotipo de segregación de los clones ph^{KD} se ha asociado con una reorganización de las moléculas implicadas en adhesión y polaridad celular (Gandille *et al.*, 2010). En este artículo se ha descrito que las células ph^{KD} se repolarizan de tal manera que forman vesículas exponiendo el lado apical de las células hacia el interior y el dominio basal hacia el exterior, tal y como indican el marcador apical DE-cadherina, que se localiza exclusivamente entre células ph^{KD} en la cara interna de los clones, y la localización del marcador basal talina en la cara externa de los clones en contacto con las células silvestres ph^+ . Además, se ha visto que la zona basal de las células ph^{KD} está alterada, ya que presenta una mayor acumulación de talina y los marcadores apicales F-actina y β -catenina se encuentran también en basal (Gandille *et al.*, 2010).

En este trabajo quisimos examinar la reorganización de las células ph^{KD} en los clones, con el objetivo de caracterizar más en detalle la interfase de contacto con las células ph^+ vecinas que, como decimos, se encuentra en la zona basal de las células ph^{KD} . En primer lugar, realizamos una tinción de la F-actina y confirmamos que se encuentra mayormente en la cara interna de los clones ph^{KD} , pero que también se acumula en el dominio basal de las células en contacto con las células silvestres (Fig. R27 A,A''). Cabe destacar que la tinción con TOPRO muestra que hay una mayor distancia entre los núcleos de las células ph^{KD} y de las células silvestres que componen esa interfase, en comparación con el espacio que separa a los núcleos de cada tipo celular entre sí (Fig. R27 A',B' flechas amarillas).

Se ha descrito que clones de células con la deficiencia *Psc-Su(z)2* (afecta a los genes *Posterior sex combs (Psc)* y *Suppressor of zeste 2 (Su(z)2)* del PcG) rodeados de células silvestres adquieren también forma de vesícula y se segregan del epitelio, siendo importante para la formación de estos sacos la fuerza contráctil que ejerce un cable de actomiosina que se observa en la interfase entre los dos tipos celulares (Bielmeier *et al.*, 2016). Así, habiendo confirmado en los clones ph^{KD} la acumulación de F-actina en la interfase, a continuación quisimos examinar la posible presencia de miosina. Para ello, analizamos la expresión del reportero *sqh-GFP*, que marca la cadena reguladora de la miosina no muscular de clase II codificada por el gen *spaghetti squash (sqh)*. Lo que observamos es que hay una alta expresión de miosina en la zona

Resultados

apical de las células ph^{KD} (Fig. R27 B'' asterisco), pero que también se acumula en la zona basal, colocalizando con la F-actina (Fig. R27 C) y formando, por tanto, un cable de actomiosina que rodea al clon ph^{KD} en la interfase con las células silvestres.

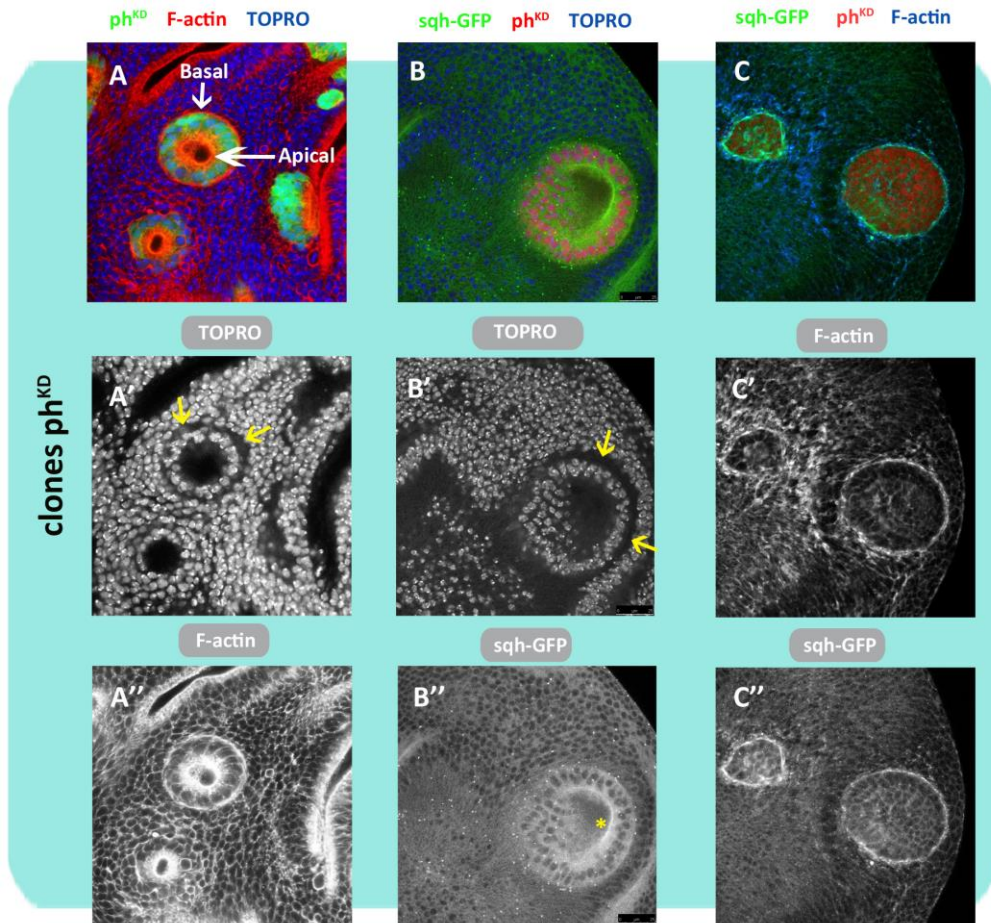


Figura R27: Distribución de F-actina y miosina en clones ph^{KD} . A) F-actina se localiza sobre todo en el lado apical de las células ph^{KD} , en la cara interna del clon, pero también se acumula en el lado basal, en la cara externa del clon en contacto con las células silvestres. B) El reportero $sqh-GFP$ de la miosina presenta niveles altos en la zona apical de las células ph^{KD} (asterisco amarillo) y también en la zona basal. Las flechas amarillas en A' y B' se refieren a la gran separación que hay entre los núcleos de las células ph^{KD} y de las silvestres, visualizado con TOPRO. C) Cable de actomiosina rodeando al clon ph^{KD} en su cara basal.

En la superficie basal de las células del disco imaginal de ala se encuentra la membrana basal, una fina capa compuesta por proteínas de la matriz extracelular. Dos de los principales componentes de esta membrana son la Laminina y el Colágeno IV (Viking en *Drosophila*) y nos propusimos analizar su expresión

en clones ph^{KD} para conocer si también se encuentran presentes en la cara basal de los mismos. Los reporteros $LanB1-GFP$ y $Vkg-GFP$ de la laminina y del colágeno, respectivamente, se expresan en toda la superficie basal del disco de ala (Fig. R28 A,B Basal), pero también en la superficie basal de las células de la membrana peripodial, que se encuentran en la región más apical del epitelio (Fig. R28 A,B Apical). Lo interesante es que los clones ph^{KD} presentan acumulación de laminina en toda su cara externa en contacto con las células silvestres (Fig. R28 A,A' flechas). En cambio, no encontramos colágeno en esta cara basal de los clones ph^{KD} (Fig. R28 B,B').

Las células se unen a la matriz extracelular a través de unas proteínas transmembrana denominadas integrinas, que conectan con el citoesqueleto de actina por mediación de la talina. Anteriormente comentábamos que se ha visto acumulación de talina en la zona basal de las células de clones ph^{KD} (Gandille *et al.*, 2010) y nosotros detectamos también la presencia de al menos una proteína de la matriz extracelular (Fig. R28 A). Así pues, quisimos ver si en esa misma región también hay acumulación de integrinas que unan esa matriz con la célula. Para ello, utilizamos un anticuerpo frente a la subunidad β PS de la integrina, que es común a todas las integrinas presentes en el disco de ala y vimos que, efectivamente, hay acumulación de integrinas en la cara externa de los clones ph^{KD} (Fig. R28 C,C' flechas).

La localización de las diversas proteínas examinadas indica que en la interfase entre las células ph^{KD} y las células silvestres hay una acumulación de proteínas como F-actina, miosina, laminina e integrinas (Fig. R27 y 28). Pensamos que, muy probablemente, este contexto molecular afecta directamente a las propiedades de afinidad celular de las células ph^{KD} , que minimizan su interacción con las silvestres.

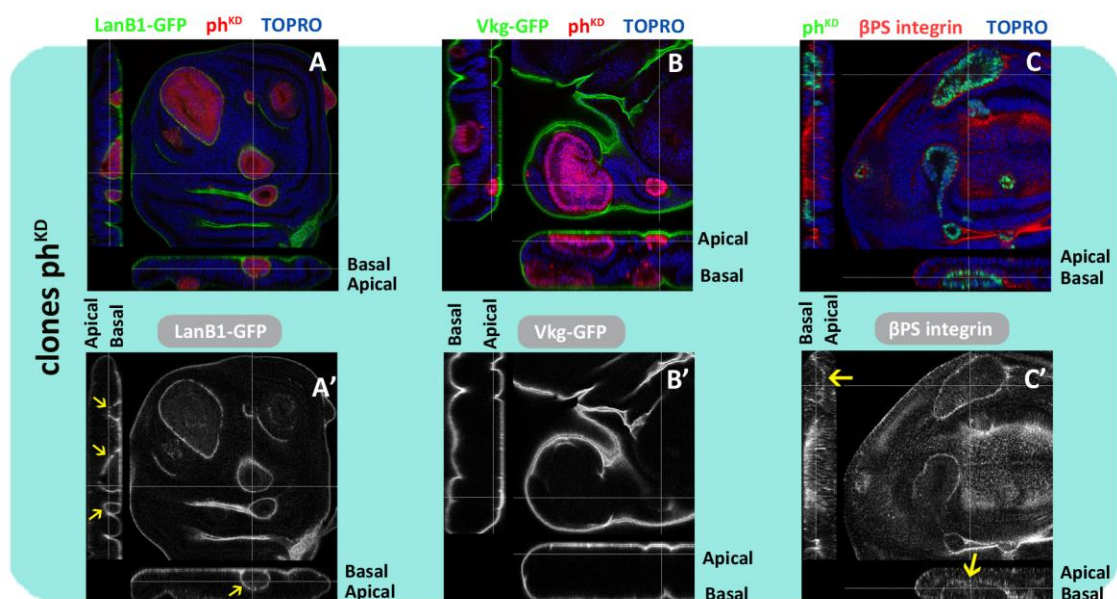


Figura R28: Distribución de componentes de la matriz extracelular e integrinas en clones ph^{KD} . A-B) Los reporteros *LanB1-GFP* y *Vkg-GFP* muestran la localización de la laminina y del colágeno, respectivamente, tanto en la zona basal como en la apical del epitelio del disco de ala. Los clones ph^{KD} se encuentran rodeados de laminina (A' flechas) pero no de colágeno (B'). C) En la cara basal externa de los clones ph^{KD} también hay una acumulación de la subunidad β PS de la integrina.

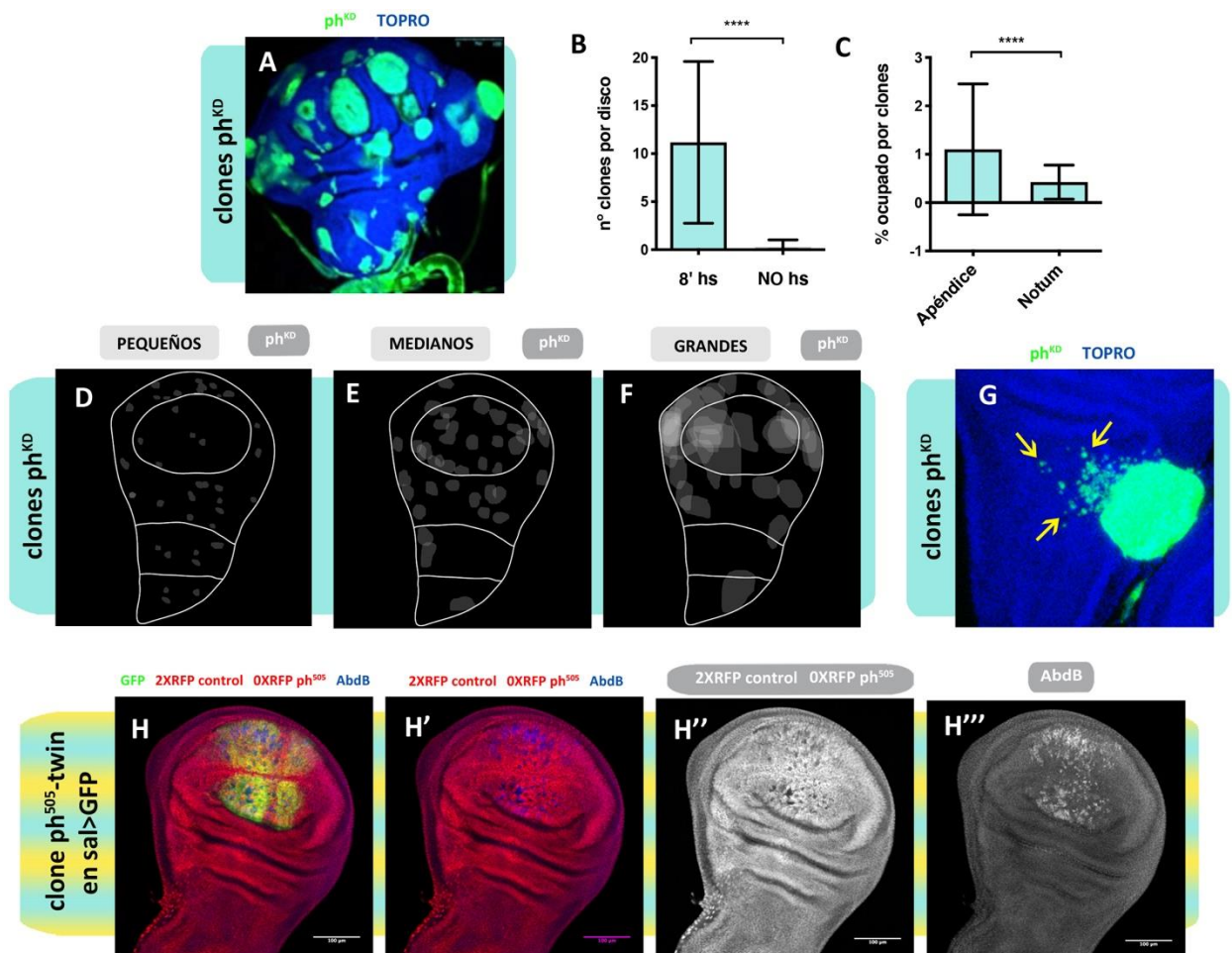
2.3. Análisis de los tamaños y de la capacidad proliferativa de los clones ph^{KD}

Una observación interesante en los clones ph^{KD} es que su tamaño varía enormemente aún dentro de un mismo disco, donde todos los clones se han inducido al mismo tiempo y, por tanto, tienen la misma edad (Fig. R29 A). En ocasiones, las Flipasas que se utilizan para inducir los clones flip-out se activan de forma espontánea e independiente al choque térmico, en cuyo caso se podría explicar la presencia de clones de distinta edad y, por tanto, tamaño. Sin embargo, descartamos esta posibilidad ya que manteniendo las larvas a 25°C sin dar el choque térmico indujimos, de media, menos de 1 clon por disco (Fig. R29 B). En nuestros experimentos tratamos de inducir pocos clones, aproximadamente 10 de media por disco (Fig. R29 B), por lo que las diferencias de tamaño tampoco se deben a que los clones se junten entre sí.

A continuación, quisimos examinar si las diferencias de tamaño se deben a que los clones tienen un crecimiento diferente en las distintas regiones del disco, tal y como hemos descrito en el apartado anterior para regiones enteras ph^{KD} . Para ello, dibujamos un mapa con la distribución de clones ph^{KD} pequeños, medianos y grandes en los discos. La escala de grises implica que la señal es más blanca cuanto mayor es la probabilidad de que los clones ph^{KD} se localicen en esa región. En general, encontramos clones de todos los tamaños en todas las regiones del disco (Fig. R29 D-F), sin embargo, los clones grandes se localizan preferentemente en la zona más proximal del apéndice (Fig. R29 F), similar a lo que veíamos en el análisis de dominios enteros ph^{KD} , donde los sobrecrecimientos ocurrían en esa zona. Además, comparamos también el tamaño de los clones en el notum y en el ala y vimos que son significativamente más pequeños los del notum (Fig. R29 C), de acuerdo también con la observación previa de que el notum ph^{KD} no sobrecrece.

Estos resultados indican que el tamaño de los clones ph^{KD} se ve afectada por el crecimiento diferencial de los mismos en las distintas regiones del disco de ala. Sin embargo, hay otro factor que pensamos podría también contribuir a las diferencias de tamaño que encontramos entre los clones. Aunque los clones ph^{KD} presentan bordes nítidos, con cierta frecuencia observamos que algunas células ph^{KD} se desprenden del grupo principal y quedan rodeadas por células silvestres (Fig. R29 G). Esto ocurre en un 24% de los clones: de un total de 155 clones distribuidos en 24 discos encontramos 38 clones que presentan células

individuales separadas del clon principal. Esto sugiere que las células ph^{KD} podrían adquirir propiedades migratorias, de tal manera que las células que se separan podrían dar lugar a la formación de nuevos clones, generando así una diversidad de tamaños. Hicimos un experimento (ver Materiales y Métodos “Análisis clonal”) en el que indujimos clones ph^{505} (marcados por la falta de RFP y por la activación ectópica de AbdB) exclusivamente en el dominio Sal (marcado por GFP), sin embargo, no observamos ningún clon fuera de dicha región (Fig. R29 H) y, por tanto, no pudimos confirmar esta posible migración de las células deficientes para ph .



Resultados

Figura R29: Diferencia de tamaño entre los clones ph^{KD} y posible migración de células ph^{KD} . A) Dentro de un mismo disco encontramos clones ph^{KD} de tamaños muy distintos. B) El número de clones por disco que encontramos de media sin dar un choque térmico (n=144 discos) es significativamente inferior al que hay tras 8 minutos de choque térmico (n=47 discos). C) El porcentaje medio que ocupan los clones del notum (n=71 clones) es significativamente inferior al de los clones del apéndice (n=188 clones). Este porcentaje se calcula dividiendo el área que ocupa cada clon por el área total del disco. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos muestran el grado de significación (****=significativo a $P<0.0001$). D-F) Mapa de distribución de clones ph^{KD} pequeños (% ocupado por el clon <0.5) (D), medianos (% ocupado por el clon entre 0.5 y 4) (E) y grandes (% ocupado por el clon >4) (F) (n=23 discos). La escala de grises significa que cuanto más blanca es una región más propensa es de presentar clones. G) Las flechas indican presencia de células ph^{KD} aisladas en la cercanía de un clon, que podrían haber migrado. H) Clones ph^{505} marcados por la falta de RFP y por la activación ectópica de *AbdB* y sus twins (con dos dosis de RFP) inducidos exclusivamente en la región Sal (marcada por GFP) de discos con una copia de RFP. No encontramos clones ph^{505} que hayan migrado fuera de la región Sal. Las barras de escala representan $100\mu\text{m}$.

En la literatura se ha descrito que los clones con falta de función de *ph* sobrecrecen (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009; Beira *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018), sin embargo, nos sorprendimos al ver que hay muchos clones que no tienen un tamaño grande (Fig. R29 A). En estos trabajos, también se ha descrito que los clones deficientes para *ph* tienen una mayor tasa proliferativa, por lo que decidimos explorar. Examinamos la incorporación del marcador EdU en los clones a distintos tiempos después de su inducción y vimos que la tasa de proliferación no es la misma en todos los clones ph^{KD} (Fig. R30). Dentro de un mismo disco hay clones que, efectivamente, presentan mayor incorporación de EdU (Fig. R30 A',C' flechas blancas), y esto suele ser el caso de clones medianos y grandes. Es interesante que estos clones que están sobrecrecidos presentan además un aumento de proliferación no autónoma, que sugiere la presencia de señales proliferativas secretadas por las células ph^{KD} del clon que afectan a las células silvestres que se encuentran cerca del clon (Fig. R30 A',C' flechas amarillas). Sin embargo, el resto de las células ph^+ del disco presentan una tasa proliferativa menor (Fig. R30 A'',C'' asteriscos amarillos), en consonancia con lo que veíamos en las células silvestres de discos $hh>GFP\ ph^{KD}$, $ci>GFP\ ph^{KD}$ y $41D11>GFP\ ph^{KD}$ (Fig. R2 y R3 asteriscos amarillos).

Previamente hemos representado la distribución de los clones de tamaño más grande (Fig. R29 F). A pesar de que tratamos de inducir pocos clones por disco, quisimos eliminar completamente la posibilidad de que estos clones presenten un tamaño grande por la unión de varios clones, y no porque realmente el clon tenga una mayor tasa proliferativa. Por esta razón, realizamos un mapa de distribución de todos aquellos clones ph^{KD} que presentan una mayor incorporación de EdU en comparación con las células silvestres de su alrededor. Nuevamente, confirmamos que los clones con mayor potencial tumorigénico se encuentran localizados preferentemente en las zonas más proximales del apéndice (Fig. R30 D), de acuerdo con el análisis previo de regiones enteras ph^{KD} .

Por otro lado, encontramos que hay muchos otros clones con una capacidad proliferativa similar al de las células vecinas. De hecho, hay discos donde ninguno de los clones ph^{KD} presenta una mayor tasa proliferativa (Fig. R30 B''). Estos resultados refuerzan de nuevo la idea de que la falta de ph no es suficiente para producir un aumento de proliferación celular en los clones y que estos sobrecrecimientos dependen también de otros factores, posiblemente factores locales o regionales del disco.

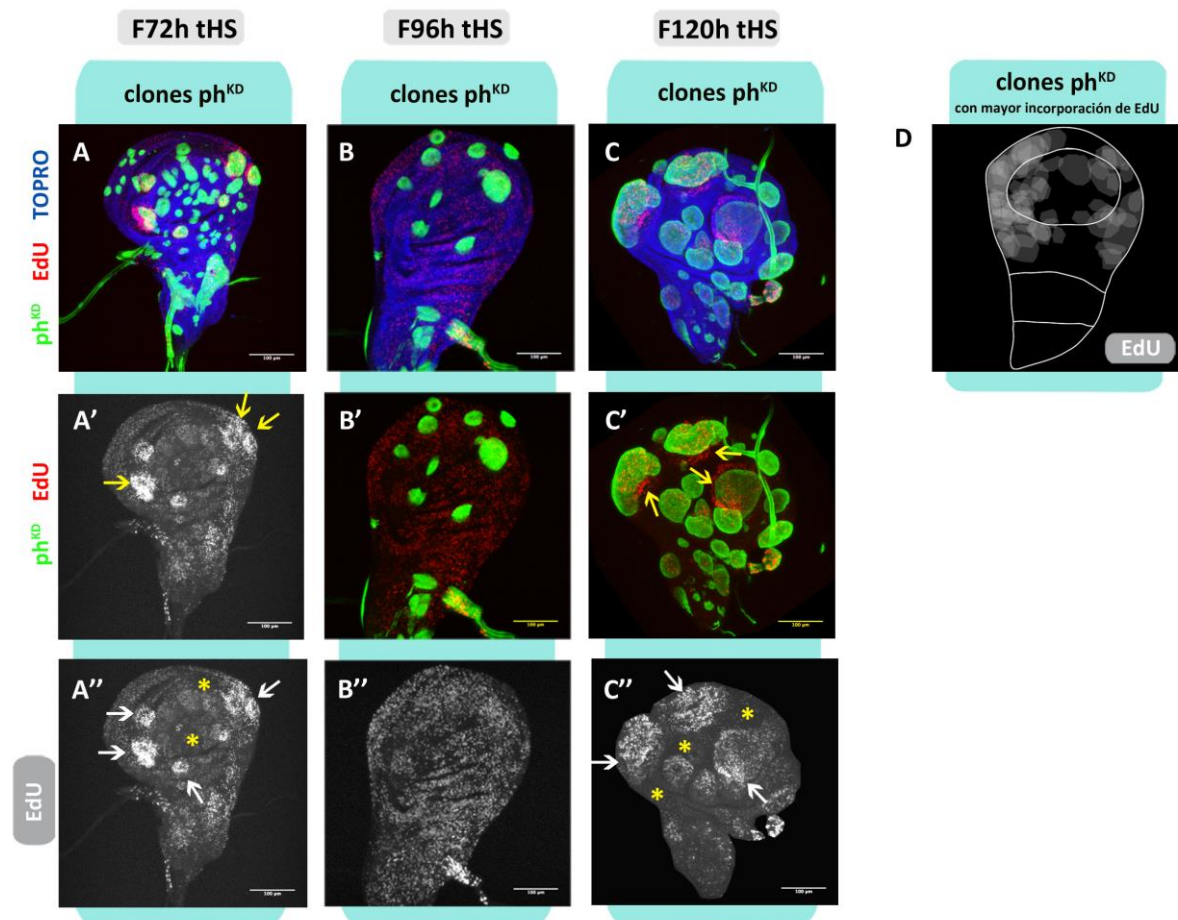
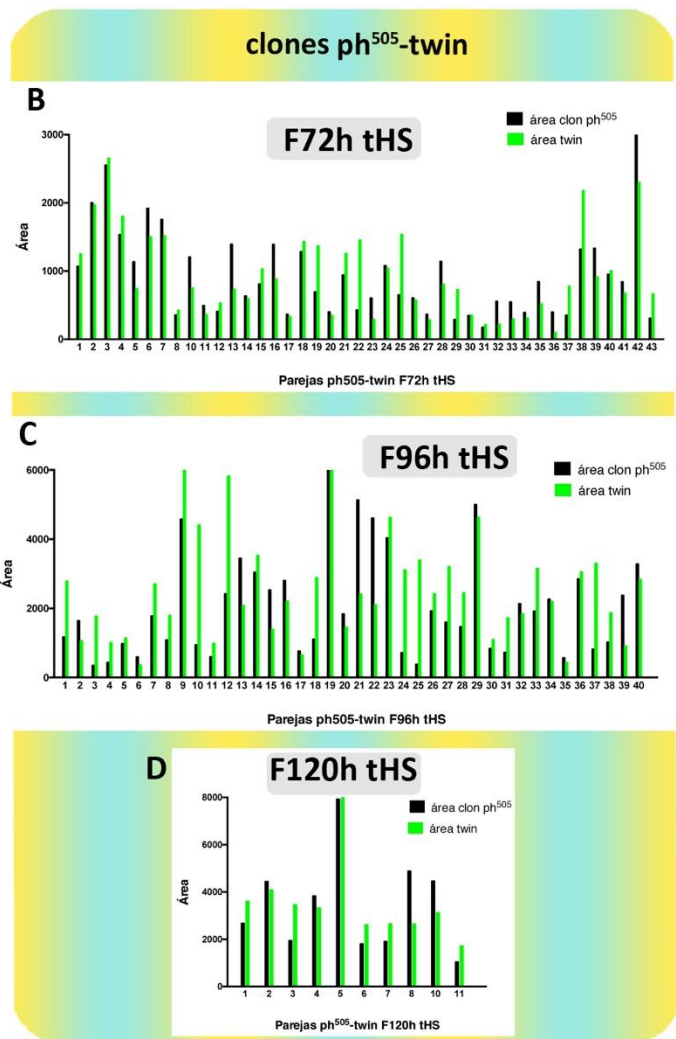
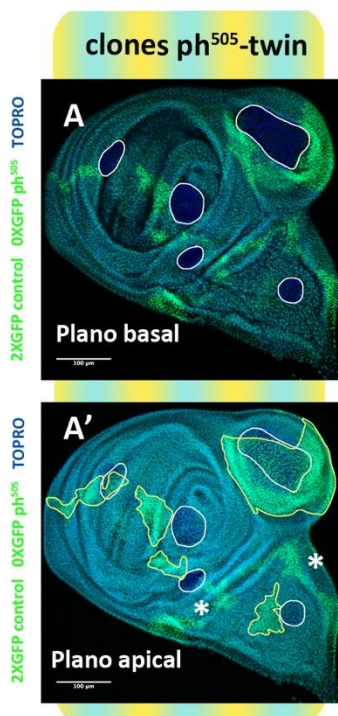


Figura R30: Análisis de la tasa proliferativa de clones ph^{KD} . A-C) Incorporación de EdU en clones ph^{KD} fijados 72 (A), 96 (B) y 120 (C) horas tras su inducción. Las flechas blancas en A'' y C'' señalan clones con un incremento de proliferación celular. Las flechas amarillas en A' y C' muestran un incremento de EdU no autónomo en células silvestres cercanas fuera del clon ph^{KD} . Los asteriscos amarillos en A'' y C'' representan una menor tasa proliferativa del resto de células ph^+ del disco. D) Mapa de distribución de 59 clones ph^{KD} que presentan mayor incorporación de EdU en comparación con las células vecinas. La escala de grises significa que cuanto más blanca es una región más propensa es de presentar clones. En este mapa se han incluido discos fijados 72, 96 y 120 horas tras su inducción. Las barras de escala representan 100 μ m.

Resultados

En vista de que solamente algunos clones ph^{KD} presentan sobrecrecimientos y una mayor tasa proliferativa (Fig. R30), quisimos conocer cuál es el porcentaje de clones que son capaces de sobrecrecer, y así tener una idea más real del potencial tumorigénico de estos clones. Para ello, indujimos clones ph^{505} OXGFP y sus clones “twin” 2XGFP (Fig. R31 A). Medimos el área de cada clon cuidadosamente, teniendo en cuenta que los clones ph^{505} y los twin se encuentran en planos distintos del disco, y representamos en una gráfica la medida para cada pareja de clones ph^{505} -twin a distintos tiempos tras su inducción (Fig. R31 B-D). Tras analizar los datos de estas gráficas (Fig. R31 E), observamos que es un 32,3% de los clones ph^{505} los que sobrecrecen por encima de sus clones gemelos, resultado que encaja con la observación de que solo algunos clones presentan una mayor incorporación de EdU (Fig. R30). Por otra parte, un 29% de los clones ph^{505} tienen un tamaño igual al de su twin y un 38,7% son más pequeños. Estos resultados reflejan también la variedad de tamaño que encontramos entre los clones de un mismo disco.



	72h tHS	96h tHS	120h tHS	Total
% clones $ph^{505} <$ twin	23,3	50,0	60,0	38,7
% clones $ph^{505} =$ twin	37,2	22,5	20,0	29,0
% clones $ph^{505} >$ twin	39,5	27,5	20,0	32,3

Figura R31: Análisis del tamaño de clones ph^{505} en comparación con el de sus clones twin. A) Se indujeron clones ph^{505} marcados por la falta de GFP (rodeados por líneas blancas) y clones twin marcados por dos dosis de GFP (líneas amarillas). Se muestra un plano basal, donde se encuentran presentes los clones ph^{505} (A) y un plano apical del mismo disco (A'). Los asteriscos blancos en A' señalan clones twin que no tienen su clon ph^{505} pareja. B-D) Se representa, en parejas, el tamaño de los clones ph^{505} (histogramas negros) y su correspondiente twin (histogramas verdes) fijados 72 (B), 96 (C) y 120 (D) horas tras su inducción. E) Tabla resumen del porcentaje de clones ph^{505} que tienen un tamaño inferior (ratio área clon ph^{505} /área twin <0.8), igual (ratio área clon ph^{505} /área twin entre 0.8 y 1.2) o mayor (ratio área clon ph^{505} /área twin >1.2) al de sus twins 72, 96 y 120 horas tras su inducción. En la columna "Total" se unifican los datos de todos los tiempos. Las barras de escala representan 100 μ m.

2.4. Competición celular en clones ph^{KD}

Se ha descrito que los clones ph^{KD} se segregan del epitelio del disco pero que no son eliminados (Gandille *et al.*, 2010). Nuestras imágenes también muestran que, en general, los clones sobreviven. Sin embargo, en la comparativa anterior de los tamaños de clones ph^{505} y sus twins hay dos aspectos llamativos: 1) A medida que avanza el tiempo tras la inducción de los clones, predominan los clones ph^{505} que tienen un tamaño inferior al de sus twins (Fig. R31 E) y 2) Hay algunos clones twin que no tienen su correspondiente clon ph^{505} (Fig. R31 A' asteriscos). Además, en la literatura se ha descrito que los clones ph^{KD} tienen células en apoptosis (Feng *et al.*, 2011). Todo esto sugeriría la posibilidad de que la competición celular actúe sobre los clones ph^{KD} pero que no sea suficientemente efectiva como para eliminar muchos de ellos.

Para esclarecer esta cuestión decidimos examinar en detalle el nivel de apoptosis en los clones ph^{KD} . De un total de 256 clones distribuidos en 41 discos, encontramos 125 (un 49%) que tienen células ph^{KD} en apoptosis marcadas por la caspasa efectora Dcp1 (Fig. R32 A). Mirando más en detalle, vemos que la disposición de las células ph^{KD} apoptóticas es indicativo de un escenario de competición celular, ya que se localizan en el borde del clon (Fig. R32 B,C ver clon 2), mientras que las células en la región interna sobreviven, lo que sugiere que la eliminación de las células ph^{KD} se debe a su interacción con las células ph^+ vecinas. Además, si observamos los cortes ortogonales de un clon con altos niveles de Dcp1 en los bordes, apreciamos que la caspasa se concentra principalmente en aquellas células ph^{KD} que están expuestas al contacto con las células silvestres (Fig. R32 D). En ocasiones, también encontramos en la cercanía de los clones células ph^{KD} aisladas que se están muriendo por apoptosis (Fig. R32 E,E'). Un análisis de los cortes ortogonales del disco refleja que estas células no se segregan junto con el clon principal, sino que se encuentran más integradas en el epitelio y, por tanto, presentan más zonas de contacto con las células de al lado (Fig. R32 E'). Esto supone otro argumento a favor de que es la interacción entre las células ph^{KD} y las silvestres la responsable de la eliminación de las células ph^{KD} .

Resultados

Es interesante destacar que estos clones en los que está actuando la competición celular adoptan, en la región donde hay Dcp1, unos bordes muy irregulares formados por células ph^{KD} que se están disgregando del clon, fruto de estar siendo eliminadas por dicha interacción con las células ph^+ (Fig. R32 B,C ver clon 2). En cambio, los clones que no tienen Dcp1 presentan unos bordes redondeados muy nítidos, donde la interacción con las células de al lado parece minimizada (Fig. R32 B,C ver clon 1).

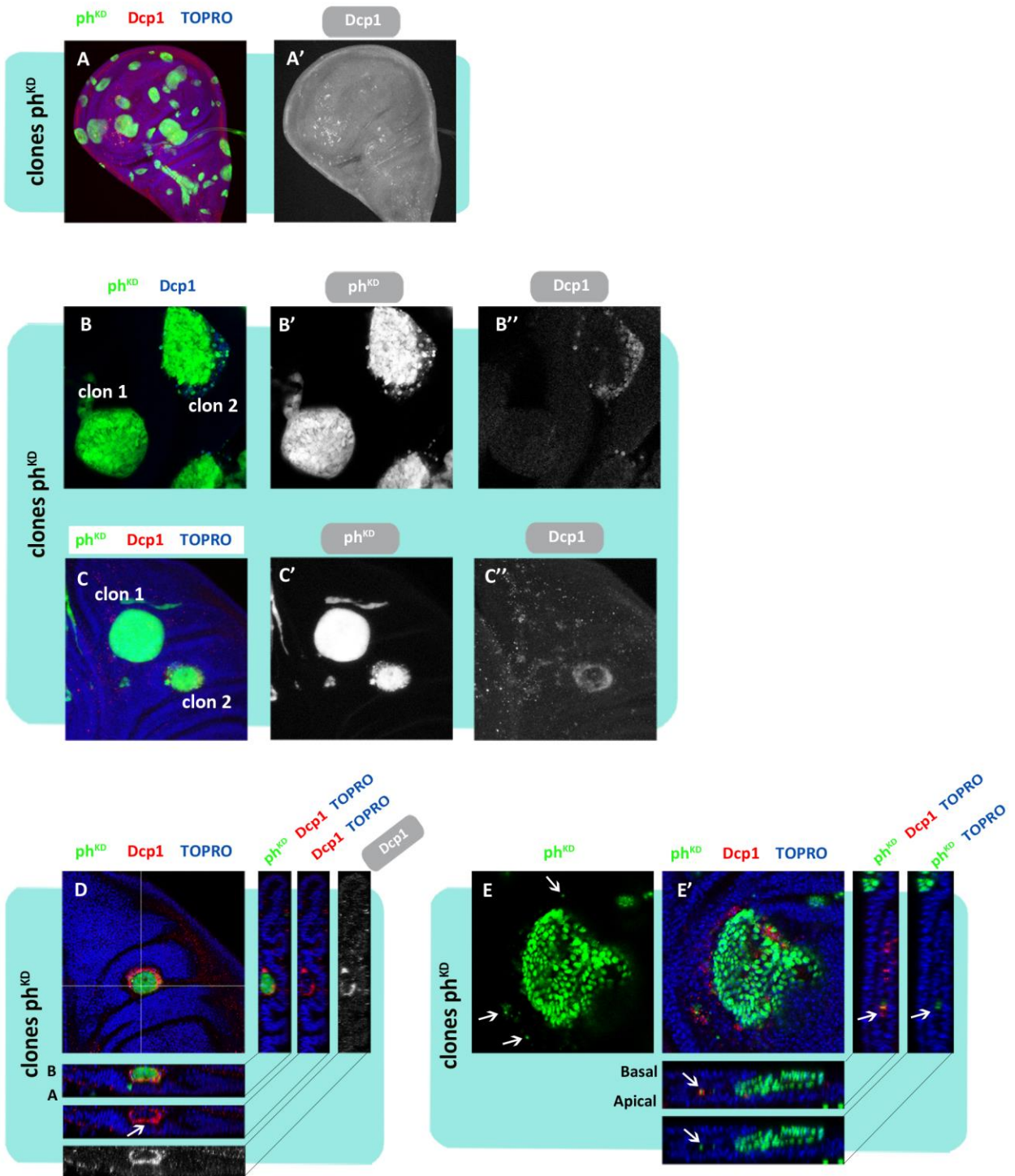


Figura R32: Los clones ph^{KD} sufren competición celular. A) La tinción con Dcp1 muestra que aproximadamente la mitad de los clones ph^{KD} presenta células en apoptosis. B,C) Dos discos ejemplo para ilustrar que los clones que no tienen Dcp1 (clon 1) presentan bordes muy nítidos, mientras que los clones que sufren competición celular (clon 2) presentan una forma muy irregular. D) Cortes ortogonales de un clon que está siendo eliminado por competición celular. La señal de Dcp1 se concentra principalmente en la región del clon en contacto con las células silvestres (flecha). B significa "Basal" y A es "Apical". E) Células ph^{KD} sueltas fuera del clon en apoptosis (flechas). Los cortes ortogonales indican que estas células tienen una superficie de contacto mayor con las células silvestres que les rodean.

2.4.1. Mecanismos de evasión de la competición celular en clones ph^{KD}

A pesar de que la competición celular opera, aproximadamente la mitad de los clones (51%) no se ven afectados por ella. Además, muchos de los clones que sí lo están muestran células apoptóticas solamente en una región del clon, es decir, no todo el borde del clon está siendo eliminado. Esto sugería la posibilidad de que los clones ph^{KD} fueran capaces de evadir parcialmente la competición celular, por lo que tratamos de encontrar algún mecanismo responsable de ello.

Se ha descrito que la inactivación de la vía de señalización Hippo provoca sobrecrecimientos en el disco de ala y que disminuye la apoptosis (Dong *et al.*, 2007), por lo que era un buen candidato a analizar para tratar de explicar por qué hay clones que no sufren apoptosis tras la competición celular. En condiciones de activación de la quinasa principal de la vía Hippo, el activador transcripcional Yorkie (Yki) se encuentra fosforilado en el citoplasma. Sin embargo, cuando se inactiva Hippo, Yki entra en el núcleo y promueve la transcripción de genes diana como *ciclina E*, implicada en proliferación celular, y *diap*, que codifica la proteína inhibidora de apoptosis, promoviendo así la supervivencia de las células. En nuestros clones ph^{KD} vimos que la localización de Yki es citoplasmática (Fig. R33 A) y que no hay mayores niveles de *diap* (Fig. R33 B,C) ni de *expanded (ex)*, otro reportero de la vía de Hippo (Fig. R33 D,E). Por tanto, los resultados sugieren que los clones ph^{KD} no evaden la competición celular por disminuir la actividad de la vía Hippo.

La vía EGFR/Ras también se sabe que promueve la supervivencia celular. Concretamente, en esta vía la activación de Ras conduce, a través de una cascada de MAP quinasas, a la fosforilación de la MAP quinasa ERK, que se ha visto que inhibe al gen proapoptótico *hid* (Bergmann *et al.*, 1998; Kurada and White, 1998). Realizamos, por tanto, una tinción frente a la forma fosforilada de ERK (pERK), pero no apreciamos un aumento en los niveles de activación de esta vía que pudiese justificar la falta de apoptosis por competición celular en los clones ph^{KD} (Fig. R33 F).

Resultados

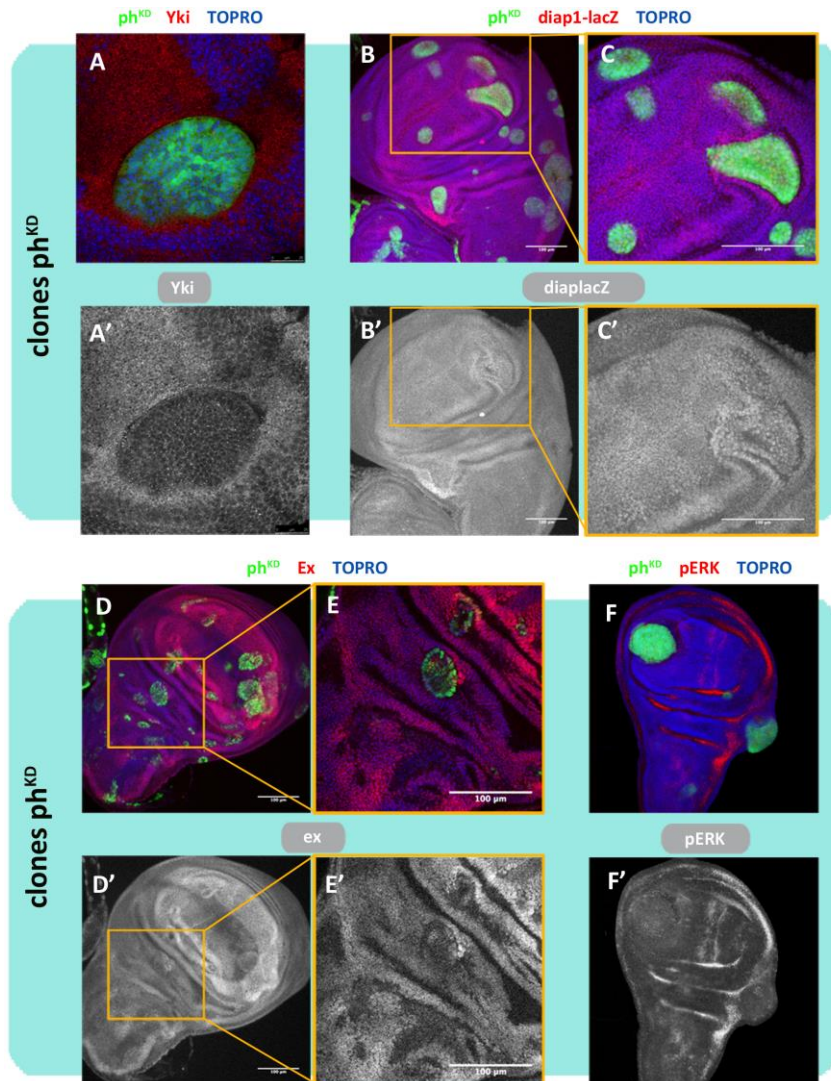


Figura R33: Los clones *ph^{KD}* no disminuyen los niveles de activación de la vía Hippo ni activan la vía EGFR/Ras, ambas implicadas en supervivencia celular. A) La localización subcelular de Yki en células *ph^{KD}* es citoplasmática. B-F) Los clones *ph^{KD}* no presentan un aumento de expresión de *diap* (B,C), de *expanded* (D-E) ni de pERK (F). C es una magnificación de la zona marcada por el rectángulo naranja en B y E es una magnificación de D. Las barras de escala representan 100μm.

Además de estudiar el posible rol de estas vías de señalización implicadas en supervivencia celular, otra hipótesis que quisimos testar fue si la falta de interacción entre las células *ph^{KD}* y las silvestres debido a las afinidades diferenciales que adquieren las *ph^{KD}* pudiera estar dificultando la competición celular entre ellas. Previamente, durante la descripción del fenotipo de segregación de los clones *ph^{KD}*, hemos caracterizado que en la interfase entre las células *ph^{KD}* y las células vecinas hay una acumulación de F-actina, miosina, laminina e integrina (Fig. R27 y 28). Es concebible que estos componentes que hay entre ambos tipos celulares dificulten el contacto necesario para las interacciones que ocurren durante la

competición celular. Por esta razón, examinamos el comportamiento de clones ph^{KD} a los que se les ha eliminado algunos de los elementos presentes en la interfase con las células ph^+ .

En primer lugar, eliminamos la laminina que rodea a los clones ph^{KD} mediante un ARN de interferencia ($LanB1^{KD}$), pero no encontramos un mayor número de clones que sufren competición celular (Fig. R34 B,I). Además de la laminina, en la interfase entre las células ph^{KD} y las silvestres podría haber también otras proteínas de la matriz extracelular que pudiera ser necesario eliminar para favorecer la interacción, por lo que sobreexpresamos en los clones ph^{KD} la metaloproteasa $mmp1$, que degrada la matriz extracelular (Srivastava *et al.*, 2007). Sin embargo, el resultado fue similar al de la eliminación de la laminina (Fig. R34 D,I). A su vez, interferimos con el gen *mysospheroid* (*mys*), que codifica la integrina βPS , y tampoco encontramos un aumento en el porcentaje de clones que sufren competición celular (Fig. R34 F,I). Es importante mencionar que, ni la eliminación de laminina, ni la sobreexpresión de $mmp1$ ni la falta de integrina βPS alteran significativamente los niveles de apoptosis en las células silvestres (Fig. R34 A,C,E). Sin embargo, en los tres casos, los clones ph^{KD} siguen teniendo su característica forma redondeada, por lo que no parece que estas interferencias estén realmente favoreciendo la interacción entre las células ph^{KD} y las silvestres y, por tanto, tampoco la competición celular.

Se ha descrito que la presencia de un cable de actomiosina en el borde de compartimentos A/P es importante para impedir que las células del compartimento anterior y posterior se mezclen entre sí (Monier *et al.*, 2010) y que haya competición celular entre ellas (Levayer *et al.*, 2015). Así pues, nosotros también quisimos reducir los niveles de miosina en los clones ph^{KD} para tratar de favorecer su contacto con las células silvestres y ver si se incrementaba la competición celular. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes porque eliminar miosina solamente de las células silvestres induce apoptosis (Fig. R34 G-I).

Resultados

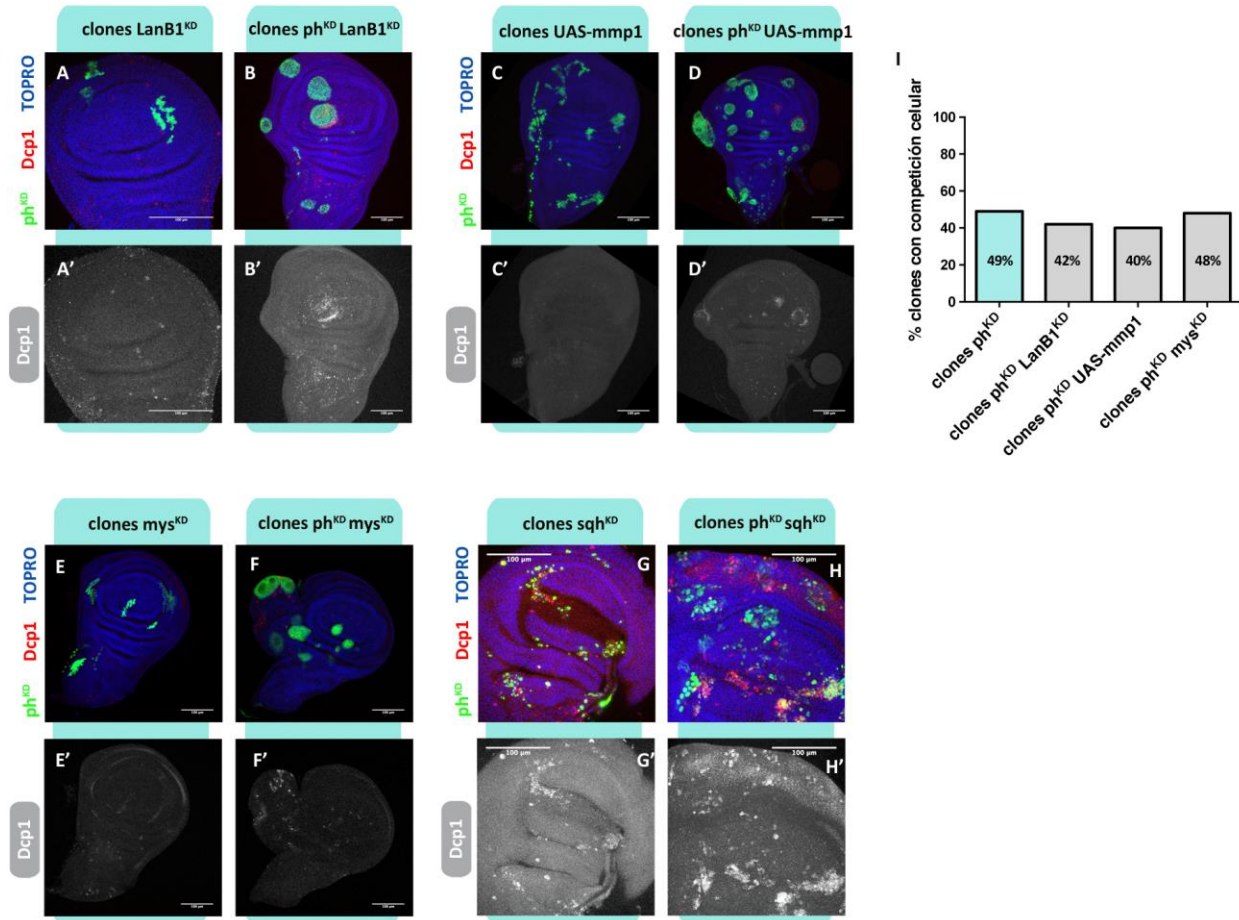


Figura R34: Eliminación de proteínas que se acumulan en la interfase entre las células *ph^{KD}* y las células silvestres *ph⁺*. A,C,E) La eliminación de laminina (A), la sobreexpresión de *mmp1* (C) y la falta de integrinas β PS (E) no producen apoptosis en el disco de ala. B,D,F) Si además eliminamos *ph*, los clones doble mutantes mantiene su morfología redondeada y no sufren más competición celular. G-H) La eliminación de miosina de los clones *ph^{KD}* altera su morfología y produce apoptosis en muchas células (H), pero la falta de miosina *per se* también provoca muerte (G). I) Se representa para cada caso el porcentaje de clones *ph^{KD}* que tiene signos de competición celular, que detectamos por la presencia de *Dcp1* específicamente en el borde de los clones. Las barras de escala representan 100 μ m.

2.4.2. Activación de JNK y ROS en clones *ph^{KD}* que sufren competición celular

A continuación, quisimos poner de nuevo el foco en los clones *ph^{KD}* que sí se ven afectados por la competición celular, tal y como indica la señal de *Dcp1* que presentan las células *ph^{KD}* del borde (Fig. R32). En *Drosophila*, las células “loser” se eliminan por apoptosis mediada por la activación de JNK (Moreno *et al.*, 2002). Así pues, en el caso de las células *ph^{KD}* comprobamos que ocurre lo mismo, ya que tanto las células del borde de los clones (Fig. R35 A) como aquellas células *ph^{KD}* que encontramos aisladas alrededor

de los clones (Fig. R35 B) presentan, además de Dcp1, activación de JNK, tal y como sugiere la tinción con el reportero de JNK *mmp1* (Uhlirova and Bohmann, 2006).

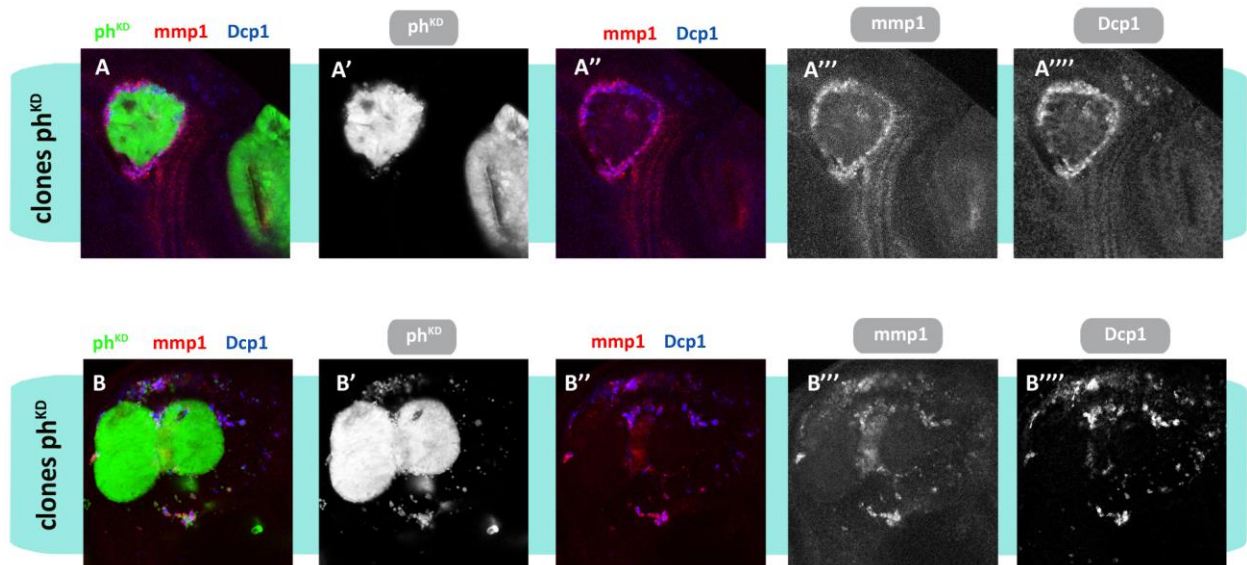


Figura R35: Los clones ph^{KD} con competición celular activan la vía JNK. A) El clon de la izquierda está siendo eliminado por competición celular: presenta un borde muy irregular (A') con niveles altos de apoptosis (A'''), que colocalizan con la activación de JNK que se visualiza con el reportero *mmp1* (A'', A'''). El clon de la derecha, en cambio, tiene unos bordes muy nítidos y no tiene signos de Dcp1 ni de *mmp1*. B) Células ph^{KD} aisladas en la cercanía de los clones (B') activan JNK y mueren por competición celular, tal y como sugieren los niveles de apoptosis (B''') y la activación de *mmp1* (B'', B''').

Utilizando el marcador *mmp1*, hemos visto que la activación de JNK se encuentra restringida al borde de los clones (Fig. R35 A), sin embargo, resultados previos de la literatura muestran que JNK se expresa en todas las células ph^{KD} de los clones (Beira *et al.*, 2018). Para esclarecer esta cuestión, analizamos la expresión de JNK mediante el reportero *TRE:RFP*, que resulta más sensible que la *mmp1* (Chatterjee and Bohmann, 2012). En primer lugar, vimos que todas las células de los clones ph^{KD} presentan unos niveles moderados de activación de *TRE:RFP* (Fig. R36 A), tal y como se había descrito (Beira *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2018). En algunos clones, vemos además una activación no autónoma de JNK en las células ph^+ silvestres alrededor del clon (Fig. R36 A flechas), de la misma manera que veíamos en el compartimento anterior de discos con falta de función de *ph* en el posterior (Fig. R10 B). Además de esta señal uniforme y generalizada, vemos que las células ph^{KD} del borde de los clones presentan una activación de JNK diferente, ya que la señal *TRE:RFP* es más intensa y tiene un patrón punteado (Fig. R36 B), parecida a la que encontramos en compartimentos silvestres irradiados (Fig. R17 B''). Es más, encontramos que las

Resultados

células con esta activación de JNK intensa están sufriendo apoptosis, tal y como indica la colocalización de la señal *TRE:RFP* y Dcp1 (Fig. R36 C). Así pues, entendemos que la activación moderada y uniforme de JNK es una característica general de los clones *ph^{KD}*, mientras que la expresión alta y punteada es una manifestación de que la competición celular está operando en el borde de los clones.

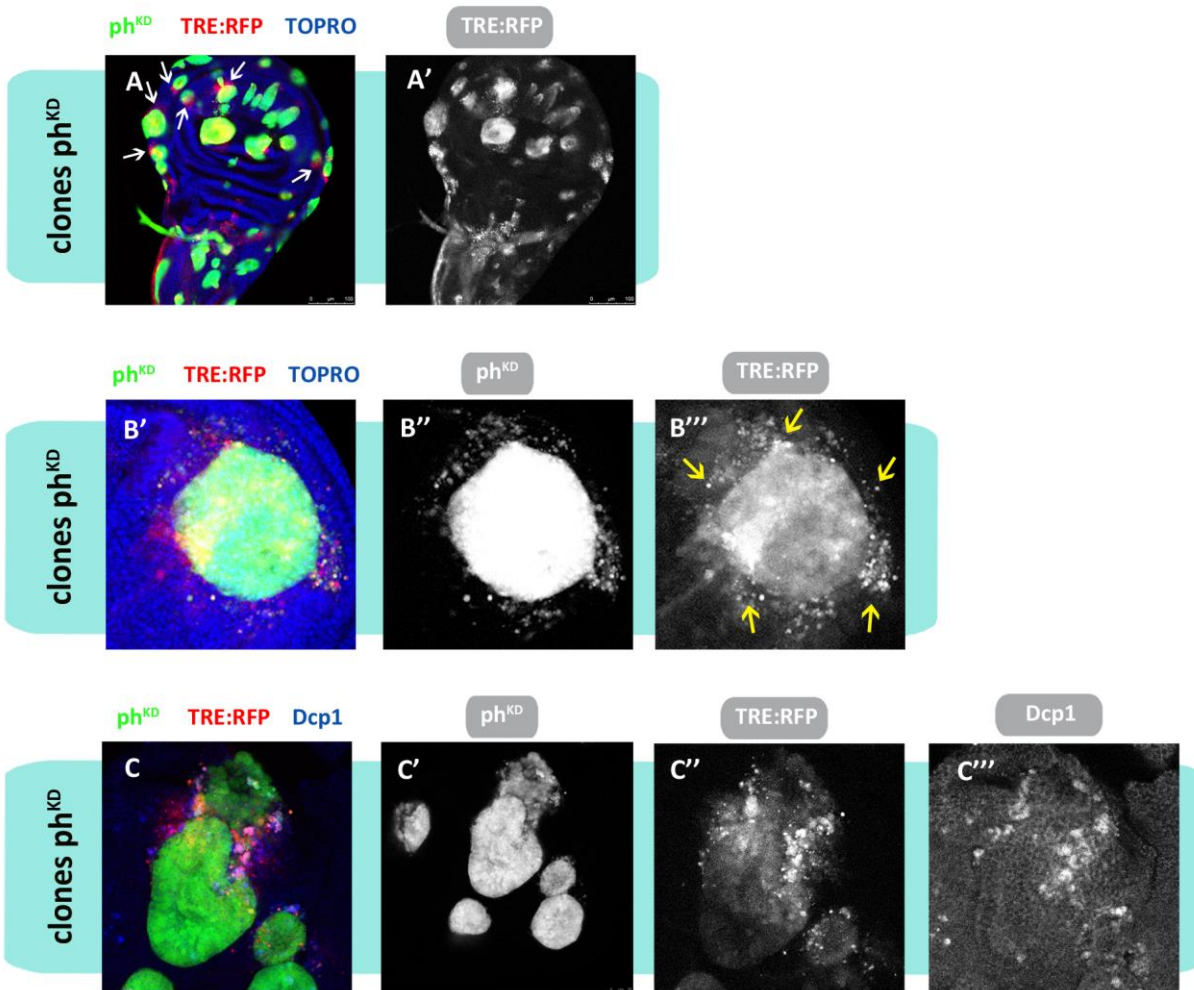


Figura R36: Los clones *ph^{KD}* presentan dos formas de expresión de JNK. A) Todos los clones presentan niveles moderados de activación de JNK, visualizado con el reportero *TRE:RFP*, y algunos incluso tienen activación no autónoma de JNK en las células silvestres que les rodean (flechas blancas). B) Algunos clones tienen, además, una señal de *TRE:RFP* punteada e intensa en los bordes (flechas amarillas). C) Esta activación fuerte de JNK se asocia con apoptosis, tal y como indica la colocalización de las señales *TRE:RFP* y Dcp1 en las células *ph^{KD}*.

La activación ectópica de JNK en los clones *ph^{KD}* requiere de algún mecanismo de inducción. Muy recientemente se ha descrito que, en un escenario de competición celular, las células “loser” sufren estrés proteotóxico, que puede monitorizarse por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

(Baumgartner *et al.*, 2021; Recasens-Alvarez *et al.*, 2021). Además, se conoce que ROS es capaz de inducir activación de JNK (Santabárbara-Ruiz *et al.*, 2015). Así pues, examinamos la presencia de ROS en los clones ph^{KD} mediante tinción con DHE. Lo que encontramos es que en este caso también hay dos formas de expresión: muchos clones presentan una activación moderada y uniforme de ROS (Fig. R37 A) y, además, muchos tienen células ph^{KD} en el borde o células aisladas en la cercanía que poseen una señal intensa y punteada de ROS (Fig. R37 B,C), lo que sugiere que están siendo eliminadas por competición celular.

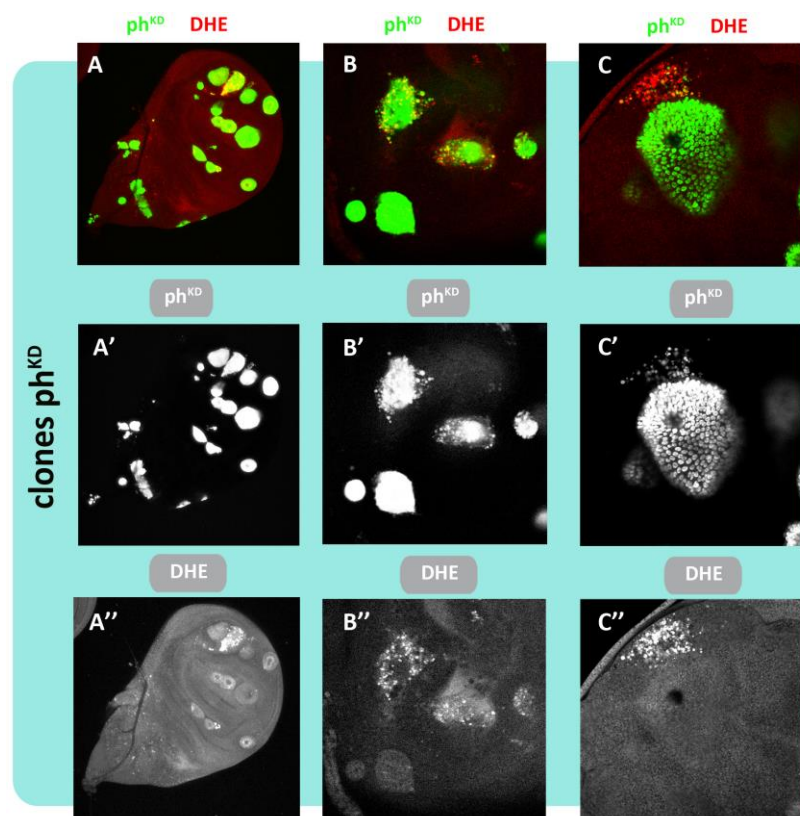


Figura R37: Los clones ph^{KD} activan ROS. A) Los clones ph^{KD} en general producen niveles moderados y uniformes de ROS, monitorizado por un marcaje in vivo con dihidroetidio (DHE). B-C) Las células ph^{KD} en los bordes irregulares de los clones (B) y las células ph^{KD} aisladas en la cercanía de los clones (C) presentan niveles elevados de ROS con un patrón punteado. Nótese que los dos clones de la parte inferior de la imagen B tienen unos bordes más nítidos y no presentan señal intensa de ROS.

A continuación, quisimos demostrar que la activación de JNK en los clones ph^{KD} es crítica a la hora de inducir la eliminación de las células ph^{KD} por competición celular. Para ello, suprimimos la vía JNK mediante la sobreexpresión de Bsk^{DN} y vimos que se pierde la señal del reportero $TRE:RFP$ dentro de los clones (Fig. R38). En cambio, nótese que se sigue observando la activación moderada de JNK en las células

Resultados

ph^+ fuera del clon, tal y como comentábamos anteriormente (Fig. R36 A flechas), que no se corresponde con apoptosis (Fig. R38 A). El resultado del experimento es que al eliminar JNK de los clones la apoptosis se suprime completamente en las células ph^{KD} del borde (Fig. R38), lo que indica que la eliminación de las células ph^{KD} por competición celular depende de la vía JNK.

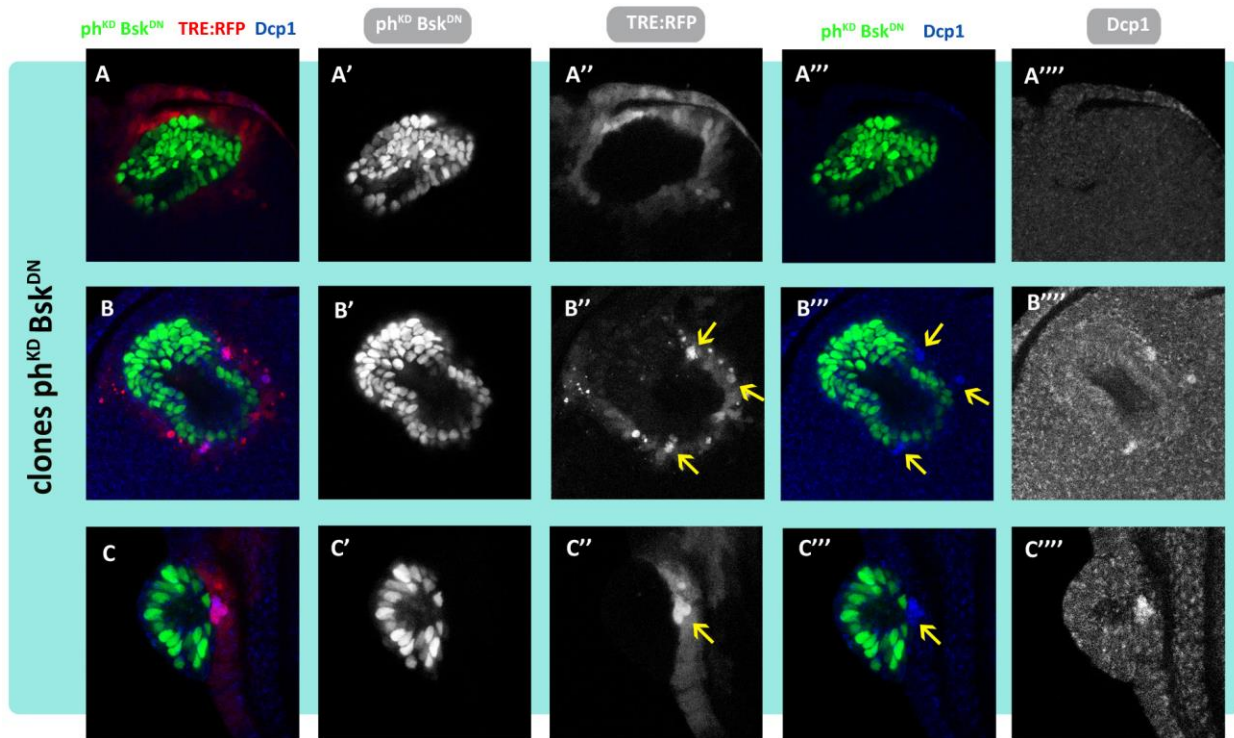


Figura R38: La eliminación de las células ph^{KD} por competición celular depende de JNK. A-C) La sobreexpresión de la forma dominante negativa de Basket en clones ph^{KD} inactiva la vía JNK, ya que se pierde la señal del reportero $TRE:RFP$ en los clones, y suprime también la apoptosis (Dcp1) de las células ph^{KD} . A) Se observa una activación ectópica moderada de JNK en las células ph^+ fuera del clon, que no se corresponde con apoptosis. B-C) Ejemplos de clones $ph^{KD} Bsk^{DN}$ que muestran células ph^+ que activan $TRE:RFP$ de manera intensa y tienen también Dcp1 (flechas amarillas).

Nuestra interpretación de los resultados es que las células ph^{KD} "loser" de la periferia de los clones activan la vía estándar de competición celular: dado que ROS es capaz de activar JNK, los niveles elevados de DHE y $TRE:RFP$ coincidentes en el borde de los clones sugiere que las células ph^{KD} sufren estrés oxidativo y que esto provoca los altos niveles de activación de JNK, que a su vez conducen a la eliminación de las células por apoptosis mediada por la caspasa efectora Dcp1.

2.4.3. Competición celular bidireccional en clones ph^{KD}

El experimento de los clones $ph^{KD} Bsk^{DN}$ puso de manifiesto la importancia de la vía JNK para provocar la eliminación de las células ph^{KD} , pero también otro resultado muy interesante: al suprimir la competición celular en las células ph^{KD} apreciamos células ph^+ silvestres que presentan una activación intensa y punteada de $TRE:RFP$ que colocaliza con Dcp1 (Fig. R38 B,C), lo que sugiere que las células silvestres también pueden ser eliminadas por competición celular. En efecto, cuantificamos que en un 20% de los clones ph^{KD} (55 de 270 clones) hay células ph^+ silvestres interaccionando con células ph^{KD} que se marcan con Dcp1 (Fig. R39 A flechas). Es interesante mencionar que de este total de 55 clones que poseen células ph^+ siendo eliminadas 37 se encuentran en la región más proximal del disco, 14 en distal y 4 en el notum. Por otro lado, si inducimos clones ph^{505} y marcamos positivamente los clones twin (2XGFP), vemos también varios ejemplos que muestran claramente que son las células 2XGFP silvestres las que están siendo eliminadas por apoptosis al interaccionar con las células ph^{505} (Fig. R39 B,C).

Además, si analizamos los clones ph^{KD} teñidos con $TRE:RFP$ y Dcp1, vemos que hay células ph^+ silvestres que también presentan la activación de JNK intensa y punteada característica de células que están en apoptosis, tal y como indican sus altos niveles de Dcp1 (Fig. R39 D'' flechas blancas). Nótese que los clones de la Fig. R39 C y D, además de tener una región donde la competición celular está eliminando las células silvestres (flechas blancas), tienen otra donde las células afectadas son las deficientes para ph (flechas amarillas), lo que pone de manifiesto la bidireccionalidad de la competición celular. Finalmente, vimos que las células ph^+ silvestres también activan altos niveles de ROS cuando están siendo eliminadas por las células ph^{KD} (Fig. R39 E). Estos resultados sugieren que las células ph^+ silvestres también activan la vía típica de competición celular: ROS, JNK y finalmente apoptosis mediada por caspasas.

Estos resultados son novedosos y muestran que en poblaciones celulares donde interaccionan células deficientes para ph con células silvestres, el proceso de competición celular puede actuar en direcciones opuestas, bien eliminando las células deficientes para ph , como ocurre en la mayoría de los casos, pero también eliminando las ph^+ .

Resultados

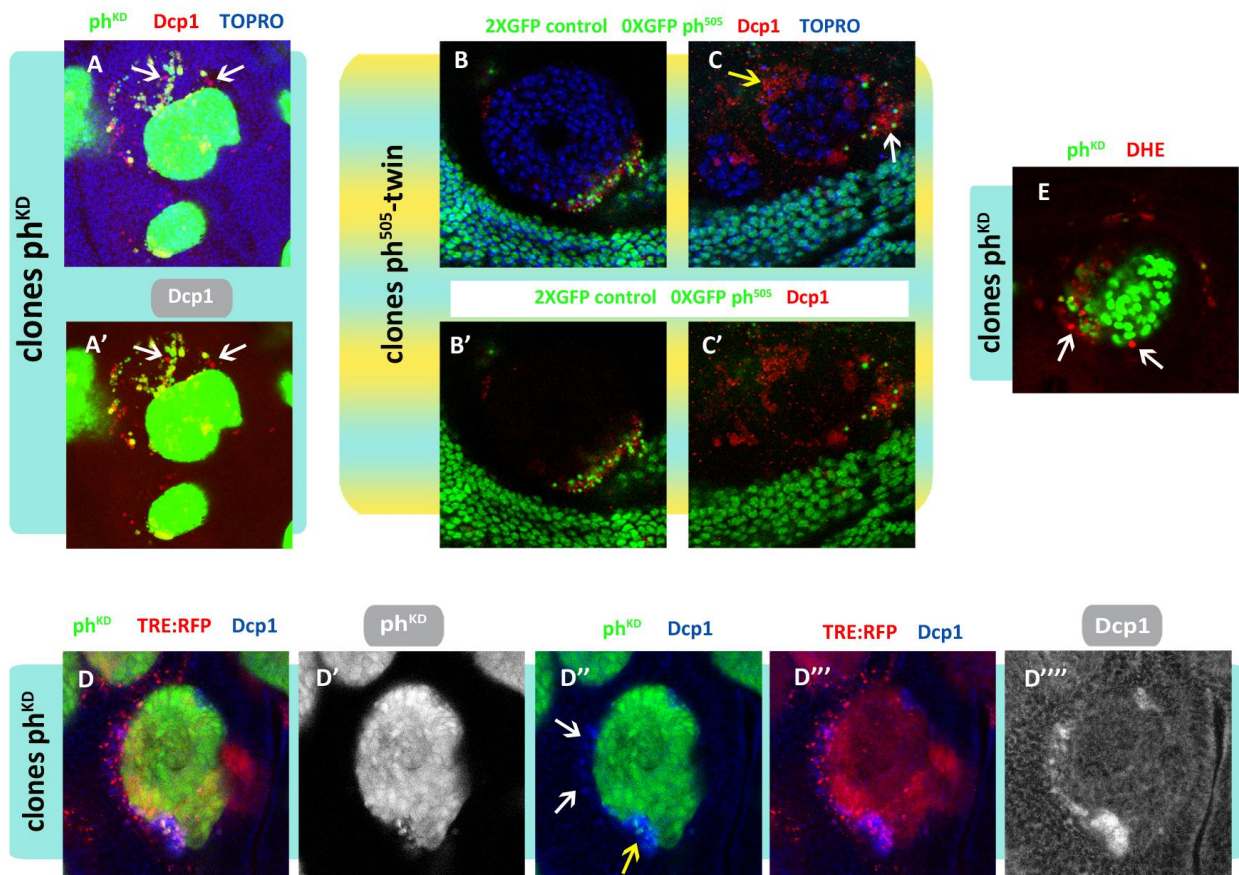


Figura R39: La interacción entre células deficientes para *ph* y células *ph⁺* conduce a una competición celular bidireccional que elimina también las células silvestres. A) Las flechas blancas representan células silvestres en apoptosis tras el contacto estrecho con células *ph^{KD}* del clon. B-C) Células twin silvestres marcadas con doble dosis de GFP (2XGFP) sufren apoptosis en el borde de un clon *ph⁵⁰⁵*. Nótese que el clon en C, además de las células *ph⁺* 2XGFP con Dcp1 (flecha blanca), también presenta células *ph⁵⁰⁵* en apoptosis (flecha amarilla), poniendo de manifiesto la bidireccionalidad de la competición celular. D) Ejemplo de un clon *ph^{KD}* con competición celular bidireccional, donde hay tanto células silvestres (D' flechas blancas) como células *ph^{KD}* (D'' flecha amarilla) con activación intensa y punteada de *TRE:RFP* que colocaliza con altos niveles de Dcp1. E) Las células *ph⁺* que se mueren tras el contacto con células *ph^{KD}* también producen altos niveles de ROS (flechas blancas).

Discusión



Comprender las bases genéticas del cáncer es objeto de extensa investigación en el mundo. Tradicionalmente, el cáncer se ha entendido como una enfermedad que se debe a la adquisición secuencial de mutaciones génicas y se han identificado cientos de genes cuyas mutaciones pueden dar lugar a tumores. Sin embargo, hay evidencia de que alteraciones en reguladores epigenéticos provocan patrones de expresión génica inapropiados que, a pesar de no modificar las secuencias génicas, también pueden resultar en transformaciones celulares malignas. Un ejemplo de reguladores epigenéticos son las proteínas del grupo Polycomb (PcG), unos represores transcripcionales que silencian conjuntos específicos de genes mediante modificaciones en la cromatina. Los genes PcG se encuentran mutados con frecuencia en cánceres humanos (Piunti and Shilatifard, 2016), por lo que resulta importante estudiar los mecanismos genéticos y moleculares por los que promueven el desarrollo del cáncer.

En esta Tesis Doctoral nos centramos en entender el papel tumorigénico de la falta de función de un gen del PcG denominado *polyhomeotic* (*ph*). Para ello, investigamos el resultado de eliminar la función *ph* en dominios grandes del disco imaginal de ala de *Drosophila* y también el fenotipo de clones aislados para ver su relación con la competición celular, un fenómeno relevante en el contexto de la tumorigénesis (Morata and Calleja, 2020). A continuación, discutimos las observaciones más relevantes.

1. La falta de función de *ph* produce efectos diferentes en distintas regiones del disco de ala

Utilizamos el sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS} para comprometer la función del gen *ph* en regiones específicas del disco de ala e investigar los efectos que produce. La conclusión principal es que la falta de *ph* afecta de manera muy diferente al crecimiento de las distintas partes del disco: provoca un aumento de la proliferación celular en la región proximal del apéndice, dando lugar a grandes sobrecrecimientos, pero por el contrario, no provoca sobrecrecimientos en el notum ni en la región distal del apéndice, los cuales sufren una leve disminución de tamaño.

1.1. El efecto tumorogénico de la falta de *ph* se restringe a las células proximales del apéndice

Cuando eliminamos *ph* en zonas del disco que incluyen tanto apéndice como notum, como es el caso del compartimento anterior (Fig. R2 D,E) y de las regiones especificadas por *homothorax-Gal4* (Fig. R3 A,B), *41D11-Gal4* (Fig. R3 C,D) y *248-Gal4* (Fig. R3 E,F), vemos una respuesta muy diferencial entre ambos: el apéndice presenta sobrecrecimientos tumorales pero el notum no. Sin embargo, dentro del apéndice también encontramos un comportamiento diferencial de las células según su localización. De hecho, la mayor proliferación celular y sobrecrecimiento provocado por la falta de *ph* se encuentra restringida al hinge y a la zona más proximal del pouch, tal y como muestran los resultados obtenidos con la línea *nub-Gal4* (Fig. R9 A,B). La localización de clones *ph^{KD}* grandes (Fig. R29 F) y, lo que es más importante, de clones con mayor tasa proliferativa (Fig. R30 D) preferentemente en la región más proximal del apéndice también son reflejo de que el efecto tumorogénico de la falta de *ph* es exclusiva de esta zona.

En la región más distal del apéndice, en cambio, no hay ningún efecto tumorogénico, es más, se observa que disminuye un 12% su tamaño (Fig. R9 F). Si nos fijamos en los discos *nub>GFP ph^{KD}* vemos que la eliminación de *ph* de la zona proximal y distal del apéndice provoca una disminución de la incorporación de EdU en la región más distal (Fig. R9 B'' asterisco). Sin embargo, la falta de *ph* únicamente en la zona más central del pouch mediante la línea *sal-Gal4* no parece que disminuya los niveles de proliferación (Fig. R9 D,E) y los clones *ph^{KD}* que observamos en esta región distal mantienen también los niveles proliferativos normales del disco (Fig. R30 A-C). Estos resultados son de interés ya que sugieren que es la proliferación excesiva de las células *ph^{KD}* de la zona más proximal del apéndice la que podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento de la región central. Esto es consistente con que en discos *sal>GFP ph^{KD}* la proliferación celular sea normal (Fig. R9 E), ya que no hay aumento de crecimiento en la región proximal. En cambio, la disminución del 12% del tamaño del dominio Sal que vemos al final del periodo larvario tras la falta de *ph* no encaja totalmente con el hecho de que no encontremos una menor proliferación y, además, sabemos que tampoco hay apoptosis (dato no mostrado). Es posible que sea en etapas más tempranas del desarrollo cuando se vean afectados alguno de estos dos procesos.

1.1.1. La tumorigénesis está mediada por la activación ectópica de las vías JNK y JAK/STAT

El hecho de que la falta de *ph* tenga un efecto tumorigénico en la región proximal del disco pero no en otras zonas indica que la falta de *ph per se* no es suficiente para ocasionar una mayor proliferación celular, sino que requiere de determinados factores locales. Hay evidencia previa en el disco de ojo de que las vías JNK, Notch y JAK/STAT contribuyen a los sobrecrecimientos del tejido deficiente para *ph* (Beira *et al.*, 2018), lo cual confirmamos nosotros para el caso de JNK (Fig. R11). Se sabe que Notch actúa *downstream* JNK (Beira *et al.*, 2018), así pues, barajamos una respuesta diferencial de las vías JNK y JAK/STAT como posible factor responsable de que los sobrecrecimientos provocados por la falta de *ph* se localicen exclusivamente en la región proximal del apéndice. En el caso de JNK, los experimentos realizados con las líneas *nub-Gal4* (Fig. R10 C,D), *sal-Gal4* (Fig. R10 E,F) y *pnr-Gal4* (dato no mostrado) muestran que solo se activa ectópicamente en la zona proximal del apéndice. Cabe mencionar que el análisis clonal parece contradecir esto último, ya que observamos que todos los clones, incluyendo los que aparecen en la zona distal del apéndice y en el notum, presentan activación de JNK (Fig. R36 A). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que esto realmente es consecuencia del contexto clonal: cuando hacemos un compartimento entero *ph^{KD}* no observamos producción de ROS (Fig. R19 A), en cambio, cuando las células *ph^{KD}* se encuentran rodeadas de células silvestres lo perciben como un ambiente impropio y producen ciertos niveles de estrés oxidativo (Fig. R37 A) que, consecuentemente, activarían a JNK (Santabábara-Ruiz *et al.*, 2015). Esto explicaría que JNK se exprese en todos los clones del disco y que, sin embargo, el análisis de la falta de *ph* en las distintas regiones muestre que la activación de JNK está restringida a las células *ph^{KD}* de la región proximal. Respecto a JAK/STAT, cabe señalar que su dominio de expresión normal es precisamente una región muy proximal, el hinge (Ayala-Camargo *et al.*, 2013). Además, el análisis de discos *nub>RFP ph^{KD}* y clones *ph^{KD}* muestra que la activación ectópica de esta vía se concentra también en la región proximal (Fig. R12). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la restricción del efecto tumorigénico de las células deficientes para *ph* a la región proximal del disco de ala está mediado por la activación conjunta de las vías JNK y JAK/STAT, que solamente se produce en dicha zona.

Estas observaciones podrían entrar en conflicto con el hecho de que la eliminación de *ph* del disco de ala entero (Fig. R1 D) o de los compartimentos posterior y anterior (Fig. R2 B,E) produce un sobrecrecimiento que aparentemente afecta a todo el apéndice, incluyendo a la región distal, que también presenta niveles altos de incorporación de EdU (Fig. R2 B'',E'') y activación de la vía JNK (Fig. R10 B''). Nuestra explicación es que las líneas *esg-Gal4*, *hh-Gal4* y *ci-Gal4* son de expresión más temprana que *nub-Gal4* y *sal-Gal4*, lo que hace que las células proximales del ala tengan ventaja proliferativa durante más tiempo en el

desarrollo. Así pues, es probable que los sobrecrecimientos que vemos en las zonas distales de los compartimentos posteriores y anteriores ph^{KD} (Fig. R2 B,E) sea fruto del crecimiento de las células proximales, que afectaría además negativamente a la proliferación de la región distal, tal y como ocurre en discos $nub>GFP\ ph^{KD}$ (Fig. R9 B'' asterisco), y acabarían colonizando la mayor parte del apéndice.

1.1.2. La falta de función de ph induce proliferación celular no autónoma

Es importante destacar que la falta de ph no solamente se traduce en una mayor proliferación de las propias células mutantes proximales, sino que encontramos también efectos no autónomos, que afectan a la proliferación de células ph^+ de su alrededor. Por ejemplo, cuando utilizamos la línea $41D11-Gal4$ observamos que los altos niveles de incorporación de EdU de la zona proximal del apéndice se extienden a las células ph^+ de la cercanía (Fig. R3 D',D'' flechas amarillas). Además, en el caso de clones ph^{KD} , y en especial en aquellos de la zona proximal del apéndice que presentan una mayor incorporación de EdU, vemos también una mayor proliferación de las células ph^+ que se encuentran alrededor del clon (Fig. R30 A',C' flechas amarillas). En el caso de discos $hh>GFP\ ph^{KD}$ y $ci>GFP\ ph^{KD}$ las células ph^+ de los compartimentos contiguos inmediatamente cercanas al tejido mutante también presentan una mayor incorporación de EdU (Fig. R2 B',B'',E',E'' flechas amarillas). Todos estos efectos no autónomos sugieren que las células ph^{KD} secretan señales proliferativas que llegan a las células silvestres.

Se sabe que JNK es una vía implicada en señalización proliferativa (Pérez-Garijo *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2004), sin embargo, al suprimirla en un compartimento posterior ph^{KD} seguimos viendo los altos niveles proliferativos en las células del compartimento anterior cercanas al borde A/P (Fig. R11 B'',C'' flechas). Esto señala a JAK/STAT como otro factor responsable, aunque también se ha descrito que tras su inactivación en clones ph^{KD} se sigue observando dicho efecto no autónomo en la proliferación de las células silvestres (Feng *et al.*, 2012). Estos resultados apoyan la idea de que se necesitan ambas vías para dar lugar a la señalización mitogénica tras la falta de ph . Se conoce que JNK y JAK/STAT contribuyen de manera independiente al sobrecrecimiento de los clones ph^{KD} y que Notch actúa mayormente *downstream* JNK (Beira *et al.*, 2018). Sin embargo, también se sabe que la vía Notch induce proliferación no autónoma (Reynolds-Kenneally and Mlodzik, 2005) y se ha visto que su inactivación disminuye moderadamente la activación de JAK/STAT (Beira *et al.*, 2018). Así pues, no descartamos la posibilidad de que Notch también pueda contribuir al fenotipo ph^{KD} de forma paralela a JNK y JAK/STAT y que sea un factor más que se requiera.

En la literatura se ha descrito que los clones mutantes para *ph* en el disco de ojo experimentan rondas adicionales de división celular (Martinez *et al.*, 2009) y que la activación de las vías de señalización JNK, Notch y JAK/STAT es responsable de los sobrecrecimientos que se producen (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009; Beira *et al.*, 2018). Nuestro análisis del comportamiento de la falta de función de *ph* en las diversas regiones del disco de ala apoya todas estas observaciones pero, además, nos permite aportar un modelo más refinado. Nosotros proponemos que el fenotipo tumorogénico causado por la falta de *ph* no se debe a un aumento de la tasa proliferativa intrínseco a las células deficientes para *ph*, es decir, las células *ph^{KD}* *per se* no proliferan más, sino solo aquellas de la región proximal donde confluyen la actividad de las vías JNK y JAK/STAT. Además, como consecuencia de la activación de estas vías en las células *ph^{KD}* proximales, se genera una señalización proliferativa que no solamente hace que crezca el tejido mutante, sino que afecta de forma no autónoma a las células *ph⁺*, haciendo que probablemente también contribuyan al fenotipo tumoral. Esto último se encuentra en línea con la observación de que la falta de *ph* induce un aumento de proliferación no autónoma (Feng *et al.*, 2011). Sin embargo, en la literatura hay cierta controversia respecto a la forma en la que la falta de *ph* induce tumores, ya que los sobrecrecimientos provocados por estos efectos no autónomos aparentemente entran en conflicto con el aumento de proliferación celular autónomo descrito (Martinez *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011). Nuestra propuesta es que ambos mecanismos celulares están implicados, de tal manera que la falta de *ph* induciría tumorogénesis a través del aumento de proliferación de las propias células mutantes y también de las células silvestres vecinas.

1.1.3. La proliferación excesiva de las células *ph^{KD}* afecta negativamente a la proliferación de las células a distancia

En contraste con la mayor respuesta proliferativa que observamos en células *ph⁺* que se encuentran muy próximas a las células deficientes para *ph*, encontramos un efecto opuesto en aquellas células silvestres que se encuentran a mayor distancia. Esto es muy notorio en el caso de discos *hh>GFP ph^{KD}* y *ci>GFP ph^{KD}*, donde los altos niveles de incorporación de EdU en los compartimentos *ph^{KD}* se asocian con una tasa proliferativa muy baja de los compartimentos controles (Fig. R2 B',B'' y E',E'' asteriscos amarillos), mucho menor al esperado en discos control de la misma edad (Fig. R2 A',A'' y D',D''), quedando los compartimentos control bastante reducidos en tamaño. En el caso de discos *41D11>GFP ph^{KD}* también encontramos este efecto no autónomo de bajada de la proliferación en células *ph⁺* que se encuentran más lejos de la región delimitada por la línea *41D11-Gal4* (Fig. R3 D',D'' asteriscos amarillos).

La presencia de clones ph^{KD} con altos niveles de incorporación de EdU se asocia también con una menor tasa proliferativa de las células ph^+ del disco (Fig. R30 A'',C'' asteriscos amarillos). En cambio, en discos donde los clones ph^{KD} no presentan una mayor incorporación de EdU, la proliferación de las células ph^+ no parece disminuida (Fig. R30 B''). Además, cuando disminuimos el sobrecrecimiento de compartimentos posteriores ph^{KD} mediante la inactivación de la vía JNK la tasa proliferativa del compartimento anterior ph^+ muestra un ligero incremento (Fig. R11 comparar C'' con B'', asteriscos amarillos).

Estos resultados muestran que el sobrecrecimiento de las regiones ph^{KD} tiene un efecto negativo en la proliferación de las células ph^+ que se encuentran a mayor distancia. Así, uno podría especular que, además de la activación ectópica de las vías JNK y JAK/STAT y la respuesta mitogénica que se genera en las células ph^+ vecinas, otra propiedad tumorogénica de la falta de ph podría ser inhibir la proliferación de las células silvestres a distancia, lo que les permitiría colonizar el disco entero. Cabría la posibilidad de que el exceso de proliferación de las células deficientes para ph se produjese incluso a expensas de las propias células ph^{KD} que no sobrecrecen, como puede deducirse del experimento de $nub>GFP\ ph^{KD}$ (Fig. R9 B'' asterisco amarillo), tal y como comentábamos anteriormente.

1.2. La eliminación de ph en el notum tiene efectos opuestos al apéndice

Una gran mayoría de los trabajos publicados en *Drosophila* extraen conclusiones generales sobre los mecanismos celulares del disco de ala centrandose sus observaciones en el apéndice y no en el notum, estructura a la que se le suele prestar poca atención. Sin embargo, hay evidencia de que el apéndice y el notum, a pesar de compartir el mismo linaje, tienen comportamientos muy diferentes. Por ejemplo, genes importantes en el desarrollo del apéndice como *hh*, *dpp* y *wg* funcionan de forma muy diferente en el notum (revisado en Morata and Sánchez-Herrero, 1999). Además, la función de los genes Hox también difiere entre el apéndice y el notum: en este último, los genes Hox requieren la participación de las proteínas cofactoras Homothorax y Extradenticle, que no están activas en el apéndice (Mann and Morata, 2000). Es importante destacar que en el contexto de la regeneración también se han encontrado diferencias entre estas dos estructuras del disco de ala, ya que solo el apéndice presenta capacidad regenerativa en respuesta al daño (Martín *et al.*, 2017).

En nuestro trabajo comparamos el potencial tumorogénico de las distintas regiones del disco, con especial atención a la distinción entre apéndice y notum. En los experimentos en los que eliminamos ph

simultáneamente en ambas estructuras, hemos visto que el apéndice sobrecrece pero el notum no, de hecho, parece disminuido en tamaño (Fig. R2 D,E; Fig. R3 A,B; Fig. R3 C,D; Fig. R3 E,F). Además, en contraste con lo que sucede en el apéndice, los niveles de proliferación en el territorio notum son muy bajos (Fig. R2 E'' y Fig. R3 B'',D'',F'' flechas blancas), lo que encaja con la observación de que se hace más pequeño. Cabría pensar que es la proliferación excesiva de las células ph^{KD} del apéndice la que ocasiona la disminución de la proliferación en las células del notum, similar a lo que vemos en el experimento de $nub>GFP\ ph^{KD}$ (Fig. R9 B'' asterisco). Sin embargo, tras eliminar ph exclusivamente del notum confirmamos que éste se comporta de manera opuesta al apéndice, ya que no solo no sobrecrece sino que incluso disminuye su tamaño en un 33% (Fig. R4). La observación de que los clones deficientes para ph del notum son significativamente más pequeños que los del apéndice (Fig. R29 C) también apoya esta diferencia entre ambas regiones.

Lo que se ha descrito en publicaciones anteriores es que la falta de ph produce tumores, sin embargo, en este trabajo matizamos que esto es específico de la zona proximal del apéndice del disco de ala, mientras que el notum sufre el efecto opuesto. Es interesante mencionar que también se ha descrito en la literatura que, en función de la posición de las células ph^{KD} dentro del disco de ala, hay diferencias en el momento en el que se produce la pérdida de silenciamiento de algunos genes Hox: la activación ectópica de *Ubx*, *Abd-B* y *Caudal* se observa primero en clones ubicados en el pouch y más tarde en aquellos localizados en el hige y notum (Beuchle *et al.*, 2001). Estos y nuestros resultados indican que, aunque la función de ph se requiere de manera ubicua, su actividad está regulada por factores posicionales, es decir, es muy posible que genes que se expresan de manera diferencial en cada región del disco cooperen con ph para llevar a cabo su función. Como consecuencia, la reprogramación genética causada por la pérdida de ph y, por extensión de todo el complejo PRC1, es muy diferente en las células del notum y del apéndice. Pensamos que esta diferencia puede explicar el diferente potencial tumorigénico de estas regiones. Este hallazgo es novedoso y el estudio de los mecanismos responsables de esta diferencia puede ser muy útil para entender las bases que rigen el desarrollo del cáncer.

1.2.1. En el notum no se produce activación conjunta de las vías JNK y JAK/STAT

Previamente hemos mostrado que la capacidad tumorigénica de la falta de ph se restringe a la región proximal del apéndice porque en esa zona se produce una activación conjunta de las vías proliferativas JNK y JAK/STAT. En discos $pnr>GFP\ ph^{KD}$ no hay activación de JNK (dato no mostrado) y, aunque los clones ph^{KD} del notum sí presentan activación de JNK (Fig. R36 A), no se observa ganancia de JAK/STAT en ellos

(Fig. R12 C flecha blanca). Pensamos que el hecho de que en el notum no se produce la activación simultánea de ambas vías explicaría la ausencia de tumores al eliminar *ph*, al igual que en la región distal del apéndice, donde tampoco se activan JNK y JAK/STAT tras la falta de *ph*. Sería interesante forzar la actividad de JNK y JAK/STAT simultáneamente en ambas regiones, aunque también cabe la posibilidad de que en el notum tampoco se produzcan sobrecrecimientos, ya que se conoce que al menos la vía JNK funciona muy diferente en el notum y en el apéndice: se ha descrito que en la región distal del apéndice la sobreexpresión de la vía JNK en un fondo resistente a apoptosis es capaz de producir grandes sobrecrecimientos (Pinal *et al.*, 2018), sin embargo, en otro contexto se ha descrito que aún forzando la expresión de JNK en el notum no da lugar a sobrecrecimientos, posiblemente debido a que *downstream* JNK se activan distintos genes diana en esta región del disco (Martín *et al.*, 2017).

1.2.2. La falta de *ph* en el notum disminuye la tasa proliferativa de las células

Las proteínas del grupo PcG están implicadas en la regulación del ciclo celular, tanto en *Drosophila* como en vertebrados, ya sea de manera directa o porque afectan genes implicados en el control del ciclo celular (Martinez and Cavalli, 2006). En la literatura se han descrito alteraciones en el perfil del ciclo celular en clones mutantes para *ph* (Oktaba *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009) y se ha visto que su fenotipo tumorigénico puede ser debido a una expresión elevada de la *ciclina B* (Oktaba *et al.*, 2008). Así pues, quisimos identificar cuál es el estado del ciclo celular en células *ph^{KD}* del notum y tratar de encontrar razones que pudiesen justificar su comportamiento diferencial.

Analizamos varios marcadores del ciclo celular en el dominio Pnr y vimos que en ausencia de *ph* hay un menor número de células por área en las fases S (Fig. R6 A-C) y M (Fig. R6 D-F) del ciclo celular. Es muy posible que la disminución de tamaño que sufre el notum tras la falta de *ph* sea el resultado de tener una tasa de división celular más baja que el resto del disco, por lo que quisimos estudiar más en detalle a qué podría deberse esto. Una menor tasa de división celular podría sencillamente deberse a una ralentización del ciclo celular, es decir, que el ritmo de división general de las células fuera menor pero que la progresión de una fase del ciclo a otra no estuviera impedida o dificultada. Sin embargo, este no es nuestro caso, ya que en el análisis por citometría de flujo encontramos variaciones en el porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular.

Más concretamente, nuestros resultados con la técnica FACS indican que la falta de *ph* en el dominio Pnr conduce a una acumulación moderada de células en la fase G2 del ciclo (Fig. R8). Este resultado es

compatible con el hecho de que no encontramos tras la falta de *ph* cambios en la expresión de la *ciclina A* (Fig. R7 G-I), que es un marcador de la fase G2 temprana (Fig. 17), lo que ubica a las células *ph^{KD}* en dicha fase del ciclo. Sin embargo, la disminución que observamos en el dominio *pnr>GFP ph^{KD}* de los niveles de expresión de la *ciclina B* (Fig. R7 D-F), que se requiere a finales de la fase G2 (Fig. 17), dificultaría la transición G2/M de las células. Es interesante destacar que en trabajos anteriores en células S2 de *Drosophila* y en embriones se ha descrito que *ph* reprime directamente a *ciclina A* (Martinez *et al.*, 2006) y que la *ciclina B* es también un gen diana de *ph* en el disco imaginal de ala (Oktaba *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros resultados en el notum no encajan con estas observaciones, ya que no vemos mayores niveles de estos reguladores tras la falta de *ph*. Pensamos que este aspecto podría tratarse de una manifestación más del efecto diferencial de la falta de *ph* en distintas regiones del disco de ala.

En cualquier caso, la consecuencia natural de este arresto de las células *ph^{KD}* del notum en la fase G2 sería una disminución en el porcentaje de células presentes en las siguientes fases del ciclo, que es lo que precisamente observamos: disminución de células presentes en la fase M (Fig. R6 D-F) seguido de una bajada en la fase G1 (Fig. R7 A-C) y, por consiguiente, también en la fase S (Fig. R6 A-C). Pensamos que esta falta de progresión celular que provoca la eliminación de *ph* en el dominio Pnr posiblemente contribuye a explicar la disminución que observamos en el tamaño del notum al final del periodo larvario.

2. Los clones con falta de función de *ph* sufren competición celular pero muchos pueden evadirla

Tal y como hemos comentado en la Introducción, en *Drosophila* hay evidencia de que las células mutantes para Genes Supresores de Tumores (TSGs) como *scrib*, *lgl*, *dlg*, *rab5*, *ept*, *avl* y *vsp25* se eliminan por competición celular (Igaki *et al.*, 2009; Menéndez *et al.*, 2010; Tamori *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Ballesteros-Arias *et al.*, 2014). Estos clones son capaces de crecer de manera normal hasta las 48 horas tras su inducción, pero a las 120 horas la mayoría de ellos ya han desaparecido o están muy reducidos en tamaño y presentan marcadores de apoptosis (Menéndez *et al.*, 2010; Ballesteros-Arias *et al.*, 2014). Sin embargo, el caso de las células oncogénicas deficientes para *ph* es totalmente diferente, ya que los clones sobreviven y algunos incluso desarrollan sobrecrecimientos tumorales (Fig. R23). Este hecho podría sugerir que la competición celular no opera en el caso de los clones *ph^{KD}*. Sin embargo, en la literatura se ha observado que clones mutantes para *ph* presentan células en apoptosis, aparentemente además en los bordes (Feng *et al.*, 2011), por lo que quisimos llevar a cabo un análisis detallado de este fenómeno.

Discusión

Nuestros experimentos indican, por primera vez, que la competición celular realmente sí actúa sobre los clones ph^{KD} . En un 49% de los clones encontramos que hay células mutantes en apoptosis, generalmente localizadas en el borde de los clones (Fig. R32), lo que representa un escenario típico de competición celular. Es muy importante destacar también que hay muy poca apoptosis en compartimentos que son ph^{KD} en su totalidad (Fig. R13 A,C,D,F), ya que el hecho de que las células mutantes sean viables cuando están rodeadas de otras células mutantes pero que actúen como “loser” si se rodean de células ph^+ indica que su eliminación es un fenómeno dependiente de contexto que se desencadena por la interacción con las células silvestres. Estos resultados sugieren que el mecanismo de competición celular está implicado en la eliminación de células ph^{KD} de los clones. Además, vemos que en los clones se activa la vía estándar de competición celular: presencia de ROS indicando estrés oxidativo (Fig. R37), seguido de la activación de JNK (Fig. R35) y finalmente apoptosis originada por caspasas efectoras como Dcp1 (Fig. R32). Es importante matizar aquí que, de las dos formas de expresión que se observan, es la activación intensa y punteada de ROS (Fig. R37 B,C) y JNK (Fig. R36 B,C) en el borde de los clones la que colocaliza con Dcp1 y la que consideramos por tanto manifestación de la competición celular. En cambio, la señal uniforme, generalizada y menos intensa de ROS y JNK en el interior de los clones no genera apoptosis; creemos que esto se debe a que los clones crecen en un ambiente heterólogo, lo que genera un estrés que no es suficiente para activar JNK a niveles apoptóticos.

En conclusión, los clones ph^{KD} sufren competición celular y, por tanto, se comportan como la falta de función de otros TSGs descritos. La diferencia es que la competición celular no es capaz de eliminarlos, ya que observamos que los clones ph^{KD} sobreviven a pesar de que algunas de sus células mueran por apoptosis. Estos resultados reivindican el papel de la competición celular como mecanismo supresor de tumores, ya que aunque en un 51% de los clones no vemos muestras de ello, su presencia en mayor o menor medida en los demás clones nos dice que la competición celular realmente está intentando actuar para deshacerse de las células oncogénicas ph^{KD} . De hecho, no podemos descartar que algunos clones ph^{KD} se eliminen totalmente, ya que en ocasiones encontramos en el análisis de clones ph^{505} y sus clones gemelos “twins” algunos “twins” que no tienen a su clon ph^{505} pareja (Fig. R31 A’ asteriscos). En cualquier caso, es muy claro que muchos clones ph^{KD} son capaces de evadir el control de la competición celular.

El estudio de situaciones en las que las células oncogénicas superan la competición celular e incluso desarrollan tumores es muy importante, ya que puede proporcionar información sobre los mecanismos por los que las células tumorales generan tumores en humanos. Trabajos previos de nuestro laboratorio (Menéndez *et al.*, 2010; Ballesteros-Arias *et al.*, 2014; Morata and Calleja, 2020) mostraron que uno de estos mecanismos es el de “protección de grupo”, que consiste en que si las células oncogénicas forman

un grupo suficientemente grande llamado “microambiente”, las células del interior se quedan fuera del alcance de la competición celular y siguen proliferando, dando lugar así a tumores. En esta Tesis Doctoral, nosotros analizamos nuevas formas por las que las células mutantes para *ph* podrían evadir la competición celular.

Un descubrimiento relevante de este trabajo es que el fenotipo de sobrecrecimiento inducido por la falta de *ph* está influenciado por factores locales, por lo que cabría preguntarse si la competición celular también lo está. Por ejemplo, uno podría esperar que los clones que presentan signos de competición celular (ROS, JNK y apoptosis) son los que se encuentran en la región distal del apéndice y en el notum, mientras que aquellos que sobreviven a ella serían los clones de la zona proximal, los más tumorigénicos. Sin embargo, no detectamos ningún tipo de patrón local en este sentido: la competición celular opera en todas las regiones del disco y aquellos clones *ph^{KD}* que están protegidos y no presentan apoptosis se localizan también en cualquier zona. En consecuencia, argumentamos que la capacidad de las células deficientes para *ph* de evadir la competición celular no parece estar ligada a su potencial tumorigénico.

Pensamos que hay al menos dos factores que permiten a los clones *ph^{KD}* sobrevivir a la competición celular:

2.1. Las células con falta de función de *ph* son refractarias a apoptosis

Un posible factor deriva de la observación de que las células deficientes para *ph* son refractarias a apoptosis inducida por Rayos X, tal y como se deduce tras comparar los niveles de Dcp1 en los compartimentos de discos *hh>GFP ph^{KD}* y *ci>GFP ph^{KD}* irradiados (Fig. R13). Es importante destacar que esta resistencia a apoptosis es parcial, ya que los niveles de apoptosis en compartimentos *ph^{KD}* irradiados son significativamente inferiores al de los compartimentos control irradiados pero superiores a los que hay en compartimentos *ph^{KD}* que no han sido sometidos a Rayos X (Fig. R13).

Tras analizar los distintos componentes implicados en la ruta apoptótica (Fig. I8) dedujimos que el bloqueo de la apoptosis se encuentra a niveles muy *upstream* de la ruta, por encima de la activación de p53 (Fig. R21) y JNK (Fig. R18). Concretamente, argumentamos que la falta de apoptosis que vemos tras los Rayos X en células con falta de función de *ph* podría deberse a que la ruta ATM de respuesta al daño en el ADN está comprometida, tal y como muestran los bajos niveles de fosforilación de la histona H2Av (Fig. R22). De hecho, en trabajos anteriores se ha visto que en ausencia de ATM o Chk2 la apoptosis inducida por

Discusión

roturas de ADN de doble cadena se ve reducida (Duchaud *et al.*, 1994, 1996; Mak, 2000). Así, pensamos que lo que estaría sucediendo en las células *ph^{KD}* es que ATM no activaría a Chk2, lo que explicaría los bajos niveles de p53 que encontramos en los compartimentos *ph^{KD}* en respuesta a irradiación (Fig. R20) y, consecuentemente, la falta de activación de JNK (Fig. R17) y ROS (Fig. R19). Esto se traduciría en una menor activación de los genes proapoptóticos como *hid* (Fig. R15) y en la falta de respuesta de caspasas efectoras como Dcp1 (Fig. R13).

Esta resistencia a la apoptosis de las células con falta de función de *ph* podría tener implicaciones en la clínica. Los pacientes oncológicos son sometidos a tratamientos de estrés (Rayos X, quimioterapia etc) que normalmente producen apoptosis. Sin embargo, en trabajos previos del laboratorio hemos demostrado que células deficientes para apoptosis que sufren un estrés como la irradiación son potencialmente carcinogénicas (Pinal *et al.*, 2018). Debido a que las células mutantes para *ph* son insensibles a estímulos apoptóticos, estos tratamientos podrían estimular el desarrollo del tumor, lo que pone en cuestión el uso de dichas opciones terapéuticas en la lucha contra cánceres en los que esta mutación esté implicada.

Hemos visto que las células deficientes para *ph* tienen gran dificultad para entrar en apoptosis tras recibir Rayos X y pensamos que este resultado podría contribuir a explicar, en parte, por qué los clones *ph^{KD}* están protegidos frente a la competición celular, un fenómeno también apoptótico, donde la célula “winner” provoca la eliminación por apoptosis de la célula “loser”. No se ha reportado que la competición celular produzca daño en el ADN de la célula eliminada y, por tanto, hemos de tener en cuenta que los Rayos X podrían provocar una respuesta en las células *ph^{KD}* diferente a la que induce la competición celular. Sin embargo, a pesar de que el estrés que desencadene la apoptosis pueda ser diferente, la ruta apoptótica en respuesta a irradiación comparte algunos elementos que están también implicados en competición celular, como son la activación de la vía JNK y la producción de ROS. Estos elementos son fundamentales para que se produzca la eliminación de las células “loser”, de hecho, se ha visto que la producción de ROS está asociada con la eliminación de células “loser” deficientes para *mahjong* y *scribble* (Kucinski *et al.*, 2017; Pinal *et al.*, 2019). Por tanto, el hecho de que las células deficientes para *ph* sean incapaces de producir niveles suficientes de ROS (Fig. R19) y activar JNK (Fig. R17) en respuesta a irradiación sugiere que también podrían tener dificultad para activarse en respuesta a competición celular. Es por ello que proponemos que esta resistencia a apoptosis podría contribuir a la supervivencia de muchos clones *ph^{KD}*.

2.2. La segregación de los clones ph^{KD} minimiza la interacción necesaria con las células de alrededor para que ocurra la competición celular

El segundo factor que podría estar implicado en la supervivencia de los clones deriva del hecho de que las células ph^{KD} adquieren expresión ectópica de genes responsables de identidad celular como *en*, *ci*, *Ubx*, *Abd-B* y *Cad*, entre otros (Fig. R25). Esto ya se observó en trabajos anteriores (Randsholt *et al.*, 2000; Beuchle *et al.*, 2001; Oktaba *et al.*, 2008) y posiblemente se debe a los cambios que se producen en la cromatina tras la falta de *ph* (Fig. R26). La identidad y función de una célula viene determinada por su característico perfil de expresión génica, por lo que estos cambios de expresión génica que se producen en las células ph^{KD} provocan una alteración drástica de su identidad original. Como consecuencia de este cambio de identidad los clones ph^{KD} tienden a segregarse, separándose de las células ph^+ que las rodean (Fig. R24) (Gandille *et al.*, 2010), un comportamiento característico de células que poseen propiedades de afinidades celulares diferentes (García-Bellido, 1966).

Para que la competición celular tenga lugar es necesario que las células “winner” y “loser” estén muy próximas (Simpson and Morata, 1981). Se desconoce el número de células que han de interactuar, sin embargo, se ha visto que la probabilidad de que las células “loser” sean eliminadas se correlaciona con la superficie de contacto que tengan con las células “winner” (Levayer *et al.*, 2015), lo que sugiere que la muerte de una “loser” requiere la interacción con varias células “winner”. Esto se ve apoyado también por observaciones anteriores sobre clones $M^{+/+}$ que crecen en discos $M^{+/-}$, donde a pesar de que las células de clones $M^{+/+}$ contactan con células $M^{+/-}$ a lo largo de todo su perímetro, solo un pequeño porcentaje de células son eliminadas (Martin *et al.*, 2009). En el caso de los clones ph^{KD} , el hecho de que adquieran bordes redondeados y se segreguen del epitelio hace que minimicen el contacto con las células vecinas, lo que plantea la posibilidad de que esta falta de interacción resulte un impedimento para que la competición celular actúe o sea efectiva. Así pues, tratamos de favorecer la interacción entre las células ph^{KD} y las silvestres a base de eliminar algunas de las proteínas que se encuentran en la interfase entre los dos tipos celulares (Fig. R27, R28) y que pensamos podrían estar implicadas en contribuir a las diferencias en las afinidades celulares. Sin embargo, tras eliminar proteínas de la matriz extracelular o interferir con el cable de actomiosina que rodea al clon el fenotipo de segregación no varía y tampoco aumenta la competición celular (Fig. R34).

Aunque no pudimos demostrar experimentalmente la hipótesis de que los clones ph^{KD} evaden la competición celular debido a la falta de interacción que supone la segregación de los mismos, es un argumento que pensamos ha de estar implicado. De hecho, es de interés que las células ph^{KD} aisladas que

a menudo vemos en la cercanía de los clones adquieran altos niveles de JNK y se mueran por apoptosis (Fig. R32 E, R35 B), ya que sugiere que su incapacidad de segregarse junto al resto de las células del clon y, por tanto, el interaccionar en mayor medida con las células vecinas conduce a su eliminación. Además, la propuesta de que las afinidades celulares diferentes previene la competición celular también se ve apoyada por la observación realizada hace años de que la competición celular no ocurre entre las células anteriores y posteriores del borde de compartimentos (Simpson and Morata, 1981). Así pues, resulta en cierta manera paradójico que los dos tipos celulares que interaccionan se tengan que percibir diferentes para que se produzca la competición celular, pero si las diferencias son demasiado profundas, ésta no se induce y ambos tipos celulares proliferan de forma autónoma.

En conjunto, nuestros resultados refuerzan el papel supresor de tumores de la competición celular, que es capaz de eliminar células deficientes para la función *ph*, ya que aproximadamente la mitad de los clones *ph^{KD}* muestran signos de apoptosis en sus células. Pero, además, nuestras observaciones indican que las células *ph^{KD}* poseen propiedades que hacen que en muchos casos puedan escapar el control de la competición celular, como pueden ser la resistencia parcial a la apoptosis y la tendencia a segregarse de las células silvestres que las rodean.

3. En discos con clones deficientes para *ph* la competición celular puede actuar en direcciones opuestas

Un resultado sorprendente del análisis de la competición celular en clones *ph^{KD}* es que dentro de un mismo disco las interacciones entre las células mutantes y las silvestres pueden dar lugar a resultados opuestos: en la mayoría de los casos (en un 49% de los clones) son las células *ph^{KD}* las que actúan como “loser”, pero en un 20% de los clones *ph^{KD}* hay células *ph⁺* de alrededor que se eliminan por competición celular (Fig. R39). Es curioso también ver algunos ejemplos donde un clon presenta células *ph^{KD}* siendo eliminadas por competición celular y que a su vez algunas células *ph^{KD}* de ese mismo clon eliminen células silvestres con las que interaccionan (Fig. R39 D). Encontramos que estas células *ph⁺* también presentan las características típicas de las células “loser”: altos niveles de ROS, activación de JNK y muerte por apoptosis mediada por Dcp1 (Fig. R39).

Se entiende en modelos clásicos de competición celular que todas las células con bajos niveles de *Minute* o *myc* tienen el mismo destino, el de convertirse en “losers” (Morata and Ripoll, 1975; Moreno *et al.*,

2002; De La Cova *et al.*, 2004; Moreno and Basler, 2004). Sin embargo, nuestros datos con clones deficientes para *ph* son un claro ejemplo de la complejidad de las interacciones celulares que se producen y de la variedad de resultados que pueden acompañar a la competición celular. Así, nuestros resultados, que podrían aportar una nueva perspectiva en el campo de la competición celular, indican que el resultado de las interacciones célula-célula que conducen a la competición celular no depende estrictamente del genotipo de las células, sino que parece también estar influenciado por otros factores.

Es concebible pensar que el hecho de convertirse en “winner” o “loser” dependa, además del genotipo, del estado fisiológico particular que tenga en un momento y posición determinada cada una de las células que interacciona. En nuestro caso, vemos que el porcentaje de clones con células *ph^{KD}* actuando como “winner” sobre las células *ph⁺* es significativamente superior en la región más proximal del disco (aproximadamente un 67% de clones), donde la falta de *ph* resulta más tumorigénico, en comparación con la zona distal y el notum, que representan un 25% y 7% de los clones, respectivamente. En vista de estos resultados, uno podría especular que esta capacidad de eliminar por competición celular las células *ph⁺* podría contribuir al carácter tumorigénico de las células *ph^{KD}* proximales, ya que les facilitaría el poder colonizar el tejido. Es decir, las células *ph^{KD}* de los clones, al actuar como “winner”, se protegerían de la eliminación por competición celular y esto favorecería la progresión del tumor.

Cabe destacar que, a menudo, las células *ph⁺* de alrededor de los clones adquieren algunas características que son propias de las células *ph^{KD}*: activan la vía JNK (Fig. R36 A flechas) y JAK/STAT (Fig. R12 C asteriscos), adquieren una mayor tasa proliferativa (Fig. R30 A',C' flechas amarillas) e incluso presentan mayores niveles de expresión de *cubitus interruptus* en el caso de los clones *ph^{KD}* del compartimento anterior (Fig. R25 E, flechas). Esto último posiblemente sea fruto de la ganancia ectópica de *engrailed* en los clones (Fig. R25 D), que haría que secreten Hedgehog y conduciría a un aumento en la concentración de Ci alrededor del clon. Teniendo en cuenta estos resultados, contemplamos la posibilidad de que las células *ph^{KD}* reprogramen, de manera no autónoma, las células *ph⁺* hacia un estado *ph^{KD}*. Este proceso podría tratarse de un fenómeno similar al “Efecto de comunidad”, que describe que la capacidad de una célula para diferenciarse depende de su interacción con un grupo de células vecinas que se diferencien al mismo tiempo (Gurdon, 1988). De hecho, interacciones celulares que conducen a una reprogramación genética también se han descrito durante la regeneración del disco de ala en *Drosophila*, donde las células del compartimento anterior pueden cambiar su identidad a posterior si se encuentran rodeadas de células de identidad posterior (Herrera and Morata, 2014). Así, es posible imaginar que en nuestros experimentos las células *ph⁺* reprogramadas hacia un estado *ph^{KD}* serían las eliminadas por las células *ph⁺* vecinas no

Discusión

transformadas, de tal manera que esto podría ser un mecanismo que protegería al tumor *ph^{KD}* de la competición celular.

Las observaciones que realizamos en esta Tesis Doctoral podrían tener un valor general, ya que *ph* lleva a cabo su función a través de su interacción con otras proteínas del grupo Polycomb y, por ello, es concebible que algunos fenómenos que describimos pudieran extenderse a células mutantes para otras proteínas del complejo PRC1 o incluso de PRC2. Además, se sabe que formas mutantes para otros genes PcG también forman tumores invasivos, tanto en *Drosophila* como en la especie humana (Beuchle *et al.*, 2001; Classen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Sería de interés, por tanto, estudiar si propiedades como el carácter local de la tumorigénesis, la resistencia a apoptosis o la capacidad de evadir la competición celular son una característica común al resto de los mutantes del PcG.

Conclusiones



- 1) El efecto tumorigénico de la falta de función de *ph* está influenciado por factores locales del disco de ala: el aumento de proliferación celular y los sobrecrecimientos están restringidos a la región proximal del apéndice, mientras que en la región distal del apéndice y en el notum se produce una disminución de tamaño, el efecto opuesto.
- 2) La activación ectópica conjunta de las vías JNK y JAK/STAT solamente se produce en la región proximal del apéndice tras la falta de *ph* y es responsable del fenotipo tumorigénico de dicha zona. La activación de estas vías genera, además, una señalización proliferativa que provoca, de manera no autónoma, un aumento de proliferación de las células *ph*⁺ vecinas más cercanas.
- 3) La proliferación excesiva de las células *ph*^{KD} afecta negativamente a la proliferación de las células que se encuentran a mayor distancia, con independencia de si son células silvestres o células deficientes para *ph*.
- 4) La falta de *ph* provoca cambios en el perfil del ciclo celular del notum, ya que se produce una acumulación moderada de las células en la fase G2 y una disminución en el porcentaje de células presentes en las fases M, G1 y S. Esta disminución de la tasa proliferativa de las células *ph*^{KD} del notum posiblemente se traduce en una disminución de tamaño de dicha región.
- 5) Los clones con falta de función de *ph* sufren la vía estándar de competición celular, que se caracteriza porque las células 1) sufren estrés oxidativo, 2) activan la vía JNK y 3) se produce su eliminación por apoptosis mediada por actividad caspasa.
- 6) Las células deficientes para *ph* son parcialmente refractarias a apoptosis inducida por Rayos X, probablemente debido a que eventos tempranos de la ruta apoptótica como la fosforilación de la histona H2Av se encuentra inhibida.
- 7) Las células deficientes para *ph* sufren un cambio de su identidad original debido a los profundos cambios que se producen en la cromatina y, por tanto, en su perfil de expresión génica. Este cambio de identidad hace que las células adquieran propiedades de afinidades celulares diferentes y que los clones *ph*^{KD} tiendan a segregarse del tejido *ph*⁺ que les rodea.
- 8) Aunque los clones *ph*^{KD} sufren competición celular muchos pueden evadirla, posiblemente debido a dos factores: 1) la resistencia de las células *ph*^{KD} a la apoptosis y 2) su tendencia a separarse de

Conclusiones

las células ph^+ que las rodean dificulta las interacciones necesarias para que la competición celular ocurra.

- 9) En discos de ala que contienen clones de células deficientes para ph junto con células ph^+ la competición celular puede actuar en direcciones opuestas. En la mayoría de los casos se eliminan las células ph^{KD} , pero ocasionalmente se pueden eliminar las células ph^+ , siguiendo además la vía típica de competición celular: 1) producción de ROS, 2) activación de JNK y 3) muerte por apoptosis debida a actividad caspasa.

Bibliografía



- Abrams, J. M.** (2002) "Competition and compensation: Coupled to death in development and cancer", *Cell*. Elsevier B.V., pp. 403–406. doi:10.1016/S0092-8674(02)00904-2.
- Adachi-Yamada, T. and O'Connor, M. B.** (2002) "Morphogenetic apoptosis: A mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients", *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 251(1), pp. 74–90. doi:10.1006/dbio.2002.0821.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000) "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*", *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 2185–2195. doi:10.1126/science.287.5461.2185.
- van Attikum, H. and Gasser, S. M.** (2009) "Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response", *Trends in Cell Biology*. Elsevier, pp. 207–217. doi:10.1016/j.tcb.2009.03.001.
- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J. and Strasser, A.** (2018) "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?", *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, pp. 104–113. doi:10.1038/cdd.2017.169.
- Ayala-Camargo, A., Anderson, A. M., Amoyel, M., Rodrigues, A. B., Flaherty, M. S. and Bach, E. A.** (2013) "JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc", *Developmental Biology*. Academic Press, 382(2), pp. 413–426. doi:10.1016/J.YDBIO.2013.08.016.
- Bach, E. A., Ekas, L. A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M. S., Lee, H., Perrimon, N. and Baeg, G. H.** (2007) "GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo", *Gene Expression Patterns*. Elsevier, 7(3), pp. 323–331. doi:10.1016/J.MODGEP.2006.08.003.
- Ballesteros-Arias, L., Saavedra, V. and Morata, G.** (2014) "Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in *Drosophila*", *Oncogene 2014 33:35*. Nature Publishing Group, 33(35), pp. 4377–4384. doi:10.1038/onc.2013.407.
- Basler, K. and Struhl, G.** (1994) "Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein", *Nature*. Nature Publishing Group, 368(6468), pp. 208–214. doi:10.1038/368208a0.
- Baumgartner, M. E., Dinan, M. P., Langton, P. F., Kucinski, I. and Piddini, E.** (2021) "Proteotoxic stress is a driver of the loser status and cell competition", *Nature Cell Biology*. Nature Research, 23(2), pp. 136–146. doi:10.1038/s41556-020-00627-0.
- Beira, J. V., Torres, J. and Paro, R.** (2018) "Signalling crosstalk during early tumorigenesis in the absence of Polycomb silencing", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 14(1), p. e1007187. doi:10.1371/journal.pgen.1007187.
- Beisel, C. and Paro, R.** (2011) "Silencing chromatin: Comparing modes and mechanisms", *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 123–135. doi:10.1038/nrg2932.
- Bejarano, F. and Milán, M.** (2009) "Genetic and epigenetic mechanisms regulating hedgehog expression in the *Drosophila* wing", *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 327(2), pp. 508–515. doi:10.1016/j.ydbio.2009.01.006.

Bibliografía

Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. and Steller, H. (1998) "The Drosophila gene hid is a direct molecular target of ras-dependent survival signaling", *Cell*. Elsevier B.V., 95(3), pp. 331–341. doi:10.1016/S0092-8674(00)81765-1.

Beuchle, D., Struhl, G. and Muller, J. (2001) "Polycomb group proteins and heritable silencing of Drosophila Hox genes", *Development*. The Company of Biologists, 128(6), pp. 993–1004. doi:10.1242/dev.128.6.993.

Bieli, D., Kanca, O., Requena, D., Hamaratoglu, F., Gohl, D., Schedl, P., Affolter, M., Slattery, M., Müller, M. and Estella, C. (2015) "Establishment of a Developmental Compartment Requires Interactions between Three Synergistic Cis-regulatory Modules", *PLOS Genetics*. Edited by C. Desplan. Public Library of Science, 11(10), p. e1005376. doi:10.1371/journal.pgen.1005376.

Bielmeier, C., Alt, S., Weichselberger, V., La Fortezza, M., Harz, H., Jülicher, F., Salbreux, G. and Classen, A. K. (2016) "Interface Contractility between Differently Fated Cells Drives Cell Elimination and Cyst Formation", *Current Biology*. Cell Press, 26(5), pp. 563–574. doi:10.1016/j.cub.2015.12.063.

Bilak, A. and Su, T. T. (2009) "Regulation of Drosophila melanogaster pro-apoptotic gene hid", *Apoptosis*. Apoptosis, 14(8), pp. 943–949. doi:10.1007/s10495-009-0374-2.

Bilder, D. (2004) "Epithelial polarity and proliferation control: Links from the Drosophila neoplastictumor suppressors", *Genes and Development*. Genes Dev, pp. 1909–1925. doi:10.1101/gad.1211604.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K. and Hafen, E. (1999) "Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4", *Cell*. Elsevier B.V., 97(7), pp. 865–875. doi:10.1016/S0092-8674(00)80799-0.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.", *Development (Cambridge, England)*, 118(2), pp. 401–15. doi:10.1101/lm.1331809.

Breen, T. R., Chinwalla, V. and Harte, P. J. (1995) "Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells", *Mechanisms of Development*. Mech Dev, 52(1), pp. 89–98. doi:10.1016/0925-4773(95)00393-F.

Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. and Abrams, J. M. (2000) "Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus.", *Cell*, 101, pp. 103–113. doi:10.1016/S0092-8674(00)80627-3.

Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L. and Kassis, J. A. (1998) "The Drosophila polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1", *Molecular Cell*. Cell Press, 1(7), pp. 1057–1064. doi:10.1016/S1097-2765(00)80106-9.

Brown, S., Pineda, C. M., Xin, T., Boucher, J., Suozzi, K. C., Park, S., Matte-Martone, C., Gonzalez, D. G., Rytlewski, J., Beronja, S. and Greco, V. (2017) "Correction of aberrant growth preserves tissue homeostasis", *Nature*. Nature Publishing Group, 548(7667), pp. 334–337. doi:10.1038/nature23304.

- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H. and Arndt-Jovin, D. J.** (1998) "The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: Impact on models for silencing", *Journal of Cell Biology*. *J Cell Biol*, 141(2), pp. 469–481. doi:10.1083/jcb.141.2.469.
- Busturia, A. and Morata, G.** (1988) "Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis", *Development*. The Company of Biologists, 104(4), pp. 713–720. doi:10.1242/dev.104.4.713.
- Cabrera, C. V., Botas, J. and Garcia-Bellido, A.** (1985) "Distribution of Ultrabithorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex and its transregulatory genes", *Nature*, 318(6046), pp. 569–571. doi:10.1038/318569a0.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996) "Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 274(5285), pp. 252–255. doi:10.1126/science.274.5285.252.
- Campbell, P. J., Yachida, S., Mudie, L. J., Stephens, P. J., Pleasance, E. D., Stebbings, L. A., Morsberger, L. A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M. L. et al.** (2010) "The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer", *Nature*. *Nature*, 467(7319), pp. 1109–1113. doi:10.1038/nature09460.
- Casas-Tinto, S., Torres, M. and Moreno, E.** (2011) "The flower code and cancer development", in *Clinical and Translational Oncology*. *Clin Transl Oncol*, pp. 5–9. doi:10.1007/s12094-011-0610-4.
- Chatterjee, N. and Bohmann, D.** (2012) "A versatile ϕ C31 based reporter system for measuring AP-1 and NRF2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture", *PLoS ONE*. *PLoS One*, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0034063.
- Chen, C.-L., Schroeder, M. C., Kango-Singh, M., Tao, C. and Halder, G.** (2012) "Tumor suppression by cell competition through regulation of the Hippo pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), pp. 484–489. doi:10.1073/pnas.1113882109.
- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W.** (1995) "Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex", *Development*. The Company of Biologists, 121(6), pp. 1681–1689. doi:10.1242/dev.121.6.1681.
- Classen, A. K., Bunker, B. D., Harvey, K. F., Vaccari, T. and Bilder, D.** (2009) "A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling", *Nature Genetics*. *Nat Genet*, 41(10), pp. 1150–1155. doi:10.1038/ng.445.
- Clavería, C., Giovinazzo, G., Sierra, R. and Torres, M.** (2013) "Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo.", *Nature*, 500(7460), pp. 39–44. doi:10.1038/nature12389.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992) "apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins", *Genes and Development*. *Genes Dev*, 6(5), pp. 715–729. doi:10.1101/gad.6.5.715.
- Crocker, J. A., Ziegenhorn, S. L. and Holmgren, R. A.** (2006) "Regulation of the *Drosophila* transcription factor, *Cubitus interruptus*, by two conserved domains", *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 291(2), pp. 368–381. doi:10.1016/j.ydbio.2005.12.020.

Bibliografía

- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and De Celis, J. F.** (2009) "A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing", *Genetics*. *Genetics*, 183(3), pp. 1005–1026. doi:10.1534/genetics.109.107748.
- Deatrick, J., Daly, M., Randsholt, N. B. and Brock, H. W.** (1991) "The complex genetic locus polyhomeotic in *Drosophila melanogaster* potentially encodes two homologous zinc-finger proteins", *Gene*. Elsevier, 105(2), pp. 185–195. doi:10.1016/0378-1119(91)90150-A.
- Deshpande, A. M., Akunowicz, J. D., Reveles, X. T., Patel, B. B., Saria, E. A., Gorlick, R. G., Naylor, S. L., Leach, R. J. and Hansen, M. F.** (2007) "PHC3, a component of the hPRC-H complex, associates with E2F6 during G 0 and is lost in osteosarcoma tumors", *Oncogene*. *Oncogene*, 26(12), pp. 1714–1722. doi:10.1038/sj.onc.1209988.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993) "Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*", *Cell*. *Cell*, 75(4), pp. 741–752. doi:10.1016/0092-8674(93)90494-B.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F. F., Anders, R. A., Maitra, A. and Pan, D.** (2007) "Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals", *Cell*. Elsevier B.V., 130(6), pp. 1120–1133. doi:10.1016/j.cell.2007.07.019.
- Du, W. and Dyson, N.** (1999) "The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis", *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 18(4), pp. 916–925. doi:10.1093/emboj/18.4.916.
- Du, W., Xie, J. E. and Dyson, N.** (1996) "Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the *Drosophila* eye", *EMBO Journal*. Wiley-VCH Verlag, 15(14), pp. 3684–3692. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00738.x.
- Duchaud, E., Ridet, A., Delic, Y., Cundari, E., Moustacchi, E. and Rosselli, F.** (1994) "Radio-induced apoptosis is impaired in individuals homozygous and heterozygous for the ataxia-telangiectasia gene(s)", *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie*, 317(11), pp. 983–989.
- Duchaud, E., Ridet, A., Stoppa-Lyonnet, D., Janin, N., Moustacchi, E. and Rosselli, F.** (1996) "Deregulated Apoptosis in Ataxia Telangiectasia: Association with Clinical Stigmata and Radiosensitivity", *Cancer Research*, 56(6).
- Dura, J. M., Randsholt, N. B., Deatrick, J., Erk, I., Santamaria, P., Freeman, J. D., Freeman, S. J., Weddell, D. and Brock, H. W.** (1987) "A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*", *Cell*, 51(5), pp. 829–839. doi:10.1016/0092-8674(87)90106-1.
- Duronio, R. J., Brook, A., Dyson, N. and O'Farrell, P. H.** (1996) "E2F-induced S phase requires cyclin E", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10(19), pp. 2505–2513. doi:10.1101/gad.10.19.2505.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1990) "The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string", *Cell*. NIH Public Access, 62(3), pp. 469–480. doi:10.1016/0092-8674(90)90012-4.

- Ellis, S. J., Gomez, N. C., Levorse, J., Mertz, A. F., Ge, Y. and Fuchs, E.** (2019) "Distinct modes of cell competition shape mammalian tissue morphogenesis", *Nature*. Nature Research, 569(7757), pp. 497–502. doi:10.1038/s41586-019-1199-y.
- Fan, Y., Lee, T. V., Xu, D., Chen, Z., Lamblin, A. F., Steller, H. and Bergmann, A.** (2010) "Dual roles of Drosophila p53 in cell death and cell differentiation", *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ, 17(6), pp. 912–921. doi:10.1038/cdd.2009.182.
- Feng, S., Huang, J. and Wang, J.** (2011) "Loss of the Polycomb group gene polyhomeotic induces non-autonomous cell overproliferation", *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization, 12(2), pp. 157–163. doi:10.1038/embor.2010.188.
- Feng, S., Thomas, S. and Wang, J.** (2012) "Diverse tumor pathology due to distinctive patterns of JAK/STAT pathway activation caused by different Drosophila polyhomeotic alleles", *Genetics*. Genetics, 190(1), pp. 279–282. doi:10.1534/genetics.111.135442.
- Filion, G. J., Van Bommel, J. G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L. D., Brugman, W., De Castro Genebra De Jesus, I., Kerkhoven, R. M., Bussemaker, H. J. and Van Steensel, B.** (2010) "Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells". doi:10.1016/j.cell.2010.09.009.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998) "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans", *Nature*. Nature, 391(6669), pp. 806–811. doi:10.1038/35888.
- La Fortezza, M., Schenk, M., Cosolo, A., Kolybaba, A., Grass, I. and Classen, A. K.** (2016) "JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress", *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, 143(16), pp. 2907–2919. doi:10.1242/dev.132340.
- Francis, N. J., Follmer, N. E., Simon, M. D., Aghia, G. and Butler, J. D.** (2009) "Polycomb Proteins Remain Bound to Chromatin and DNA during DNA Replication In Vitro", *Cell*. Elsevier B.V., 137(1), pp. 110–122. doi:10.1016/j.cell.2009.02.017.
- Francis, N. J. and Kingston, R. E.** (2001) "Mechanisms of transcriptional memory", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 409–421. doi:10.1038/35073039.
- Frohnhofer, H. G., Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C.** (1986) "Manipulating the anteroposterior pattern of the Drosophila embryo", *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 97(SUPPL.), pp. 169–179. doi:10.1242/dev.97.supplement.169.
- Gandille, P., Narbonne-Reveau, K., Boissonneau, E., Randsholt, N., Busson, D. and Pret, A. M.** (2010) "Mutations in the Polycombgroup gene polyhomeotic lead to epithelial instability in both the ovary and wing imaginal disc in Drosophila", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 5(11). doi:10.1371/journal.pone.0013946.
- García-Bellido, A.** (1966) "Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of Drosophila melanogaster", *Developmental Biology*. Academic Press, 14(2), pp. 278–306. doi:10.1016/0012-1606(66)90017-0.

Bibliografía

Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973) "Developmental compartmentalisation of the wing disk of drosophila", *Nature New Biology*. Nat New Biol, pp. 251–253. doi:10.1038/newbio245251a0.

Garcia Bellido, A. (1975) "Genetic control of wing disc development in Drosophila", *CIBA FOUND.SYMP.* Ciba Found Symp, N.S. 29(29), pp. 161–182. doi:10.1002/9780470720110.ch8.

Golic, K. G. and Lindquist, S. (1989) "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the drosophila genome", *Cell*. Cell, 59(3), pp. 499–509. doi:10.1016/0092-8674(89)90033-0.

Goto, S. and Hayashi, S. (1999) "Proximal to distal cell communication in the Drosophila leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning", *Development*. Development, 126(15), pp. 3407–3413.

Grossniklaus, U. and Paro, R. (2014) "Transcriptional Silencing by Polycomb-Group Proteins", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(11), pp. 1–26. doi:10.1101/cshperspect.a019331.

Gurdon, J. B. (1988) "A community effect in animal development", *Nature 1988 336:6201*. Nature Publishing Group, 336(6201), pp. 772–774. doi:10.1038/336772a0.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) "The hallmarks of cancer", *Cell*. Elsevier, pp. 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*. Cell, pp. 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hansen, K. H., Bracken, A. P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S. S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M. and Helin, K. (2008) "A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark", *Nature Cell Biology*. Nat Cell Biol, 10(11), pp. 1291–1300. doi:10.1038/ncb1787.

Hariharan, I. K. and Bilder, D. (2006) "Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in Drosophila", *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, pp. 335–361. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.100738.

Hay, B. a and Guo, M. (2006) "Caspase-dependent cell death in Drosophila.", *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp. 623–650. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093845.

Herrera, S. C. and Bach, E. A. (2021) "The emerging roles of jnk signaling in drosophila stem cell homeostasis", *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 22(11), p. 5519. doi:10.3390/ijms22115519.

Herrera, S. C. and Morata, G. (2014) "Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in Drosophila", *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 3. doi:10.7554/ELIFE.01831.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V. (2000) "Structure of a Polycomb Response Element and In Vitro Binding of Polycomb Group Complexes Containing GAGA Factor", *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 20(9), pp. 3187–3197. doi:10.1128/mcb.20.9.3187-3197.2000.

- Hu, Q., Wu, W., Zeng, A., Yu, T., Shen, F., Nie, E., Wang, Y., Liu, N., Zhang, J. and You, Y.** (2017) "Polycomb group expression signatures in the malignant progression of gliomas", *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 13(4), pp. 2583–2590. doi:10.3892/ol.2017.5753.
- Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A.** (2004) "Compensatory proliferation induced by cell death in the Drosophila wing disc requires activity of the apical cell death caspase dronc in a nonapoptotic role", *Current Biology*, 14(14), pp. 1262–1266. doi:10.1016/j.cub.2004.06.015.
- Igaki, T., Pastor-Pareja, J. C., Aonuma, H., Miura, M. and Xu, T.** (2009) "Intrinsic Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Endocytic Activation of Eiger/TNF Signaling in Drosophila", *Developmental Cell*. Cell Press, 16(3), pp. 458–465. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.002.
- Iwata, S., Takenobu, H., Kageyama, H., Koseki, H., Ishii, T., Nakazawa, A., Tatezaki, S. ichiro, Nakagawara, A. and Kamijo, T.** (2010) "Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma", *Cancer Science*. Cancer Sci, 101(7), pp. 1646–1652. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01586.x.
- Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G.** (1992) "Transcriptional control by Drosophila gap genes", in *Journal of Cell Science*. J Cell Sci Suppl, pp. 39–51. doi:10.1242/jcs.1992.supplement_16.6.
- Jackson, S. P. and Bartek, J.** (2009) "The DNA-damage response in human biology and disease", *Nature*. Europe PMC Funders, pp. 1071–1078. doi:10.1038/nature08467.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. and Gallant, P.** (1999) "Drosophila myc regulates cellular growth during development", *Cell*. Elsevier B.V., 98(6), pp. 779–790. doi:10.1016/S0092-8674(00)81512-3.
- Jürgens, G.** (1985) "A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila", *Nature*. Nature Publishing Group, 316(6024), pp. 153–155. doi:10.1038/316153a0.
- Kassis, J. A.** (1994) "Unusual properties of regulatory DNA from the Drosophila engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region.", *Genetics*, 136(3).
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G.** (1990) "Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of drosophila melanogaster", *Advances in Genetics*. Academic Press Inc., 27(C), pp. 309–362. doi:10.1016/S0065-2660(08)60029-2.
- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W.** (1988) "Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in Drosophila", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 85(21), pp. 8136–8140. doi:10.1073/pnas.85.21.8136.
- Khan, C., Muliylil, S., Ayyub, C. and Rao, B. J.** (2017) "The initiator caspase Dronc plays a non-apoptotic role in promoting DNA damage signalling in D. melanogaster". doi:10.1242/jcs.200782.
- Khan, S., Iqbal, M., Tariq, M., Baig, S. M. and Abbas, W.** (2018) "Epigenetic regulation of HIV-1 latency: Focus on polycomb group (PcG) proteins", *Clinical Epigenetics*. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s13148-018-0441-z.

Bibliografía

Khan, S. J., Abidi, S. N. F., Skinner, A., Tian, Y. and Smith-Bolton, R. K. (2017) "The *Drosophila* Duox maturation factor is a key component of a positive feedback loop that sustains regeneration signaling", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 13(7). doi:10.1371/journal.pgen.1006937.

Khan, S. J., Bajpai, A., Alam, M. A., Gupta, R. P., Harsh, S., Pandey, R. K., Goel-Bhattacharya, S., Nigam, A., Mishra, A. and Sinha, P. (2013) "Epithelial neoplasia in *Drosophila* entails switch to primitive cell states", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(24). doi:10.1073/pnas.1212513110.

Kim, J., Irvine, K. D. and Carroll, S. B. (1995) "Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *drosophila* wing", *Cell*. Cell Press, 82(5), pp. 795–802. doi:10.1016/0092-8674(95)90476-X.

Kim, W. and Jain, R. (2020) "Picking Winners and Losers: Cell Competition in Tissue Development and Homeostasis", *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, pp. 490–498. doi:10.1016/j.tig.2020.04.003.

Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C. F. (1994) "Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation", *Cell*. Elsevier, 77(1), pp. 107–120. doi:10.1016/0092-8674(94)90239-9.

Köhler, C. and Hennig, L. (2010) "Regulation of cell identity by plant Polycomb and trithorax group proteins", *Current Opinion in Genetics and Development*. Curr Opin Genet Dev, pp. 541–547. doi:10.1016/j.gde.2010.04.015.

Kolahgar, G., Suijkerbuijk, S. J. E., Kucinski, I., Poirier, E. Z., Mansour, S., Simons, B. D. and Piddini, E. (2015) "Cell Competition Modifies Adult Stem Cell and Tissue Population Dynamics in a JAK-STAT-Dependent Manner", *Developmental Cell*. Cell Press, 34(3), pp. 297–309. doi:10.1016/j.devcel.2015.06.010.

Kucinski, I., Dinan, M., Kolahgar, G. and Piddini, E. (2017) "Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signalling causes the loser cell status", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–13. doi:10.1038/s41467-017-00145-y.

Kurada, P. and White, K. (1998) "Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression", *Cell*. Elsevier B.V., 95(3), pp. 319–329. doi:10.1016/S0092-8674(00)81764-X.

De La Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. (2004) "*Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition", *Cell*. Elsevier B.V., 117(1), pp. 107–116. doi:10.1016/S0092-8674(04)00214-4.

Lanzuolo, C. and Orlando, V. (2007) "The function of the epigenome in cell reprogramming", *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci, pp. 1043–1062. doi:10.1007/s00018-007-6420-8.

Lanzuolo, C., Sardo, F. Lo, Diamantini, A. and Orlando, V. (2011) "PcG complexes set the stage for epigenetic inheritance of gene silencing in early S phase before replication", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 7(11), p. 1002370. doi:10.1371/journal.pgen.1002370.

Laugesen, A. and Helin, K. (2014) "Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer", *Cell Stem Cell*. Cell Press, pp. 735–751. doi:10.1016/j.stem.2014.05.006.

- Lawrence, P. A.** (1997) "Straight and wiggly affinities", *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 546–547. doi:10.1038/39188.
- Lawrence, P. A.** (Peter A. (1992) *The making of a fly : the genetics of animal design*. Oxford ; Blackwell Scientific Publications.
- Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1976) "Compartments in the wing of *Drosophila*: A study of the engrailed gene", *Developmental Biology*. Dev Biol, 50(2), pp. 321–337. doi:10.1016/0012-1606(76)90155-X.
- Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1977) "The early development of mesothoracic compartments in *Drosophila*. An analysis of cell lineage and fate mapping and an assessment of methods", *Developmental biology*. Dev Biol, 56(1), pp. 40–51. doi:10.1016/0012-1606(77)90153-1.
- Leal-Esteban, L. C. and Fajas, L.** (2020) "Cell cycle regulators in cancer cell metabolism", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., p. 165715. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165715.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996) "Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing", *Nature*. Nature Publishing Group, 381(6581), pp. 387–393. doi:10.1038/381387a0.
- Lehner, C. F. and O'Farrell, P. H.** (1990) "*Drosophila* cdc2 homologs: A functional homolog is coexpressed with a cognate variant", *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 9(11), pp. 3573–3581. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07568.x.
- Levayer, R., Hauert, B. and Moreno, E.** (2015) "Cell mixing induced by myc is required for competitive tissue invasion and destruction", *Nature*. Nature Publishing Group, 524(7566), pp. 476–480. doi:10.1038/nature14684.
- Lewis, E. B.** (1963) "Genes and developmental pathways", *Integrative and Comparative Biology*. Oxford Academic, 3(1), pp. 33–56. doi:10.1093/icb/3.1.33.
- Lewis, E. B.** (1978) "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*", *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 565–570. doi:10.1038/276565a0.
- Lu, H. and Bilder, D.** (2005) "Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*", *Nature Cell Biology*. Nat Cell Biol, 7(12), pp. 1132–1139. doi:10.1038/ncb1324.
- Mak, T. W.** (2000) "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2", *Science*, 287(5459), pp. 1824–1827. doi:10.1126/SCIENCE.287.5459.1824.
- Mandaravally Madhavan, M. and Schneiderman, H. A.** (1977) "Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*", *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. Springer-Verlag, 183(4), pp. 269–305. doi:10.1007/BF00848459.
- Mann, R. S. and Morata, G.** (2000) "The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, pp. 243–271. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.243.

Bibliografía

Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury, W. J., Voigt, P., Martin, S. R., Taylor, W. R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D. and Gamblin, S. J. (2009) "Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks", *Nature*. *Nature*, 461(7265), pp. 762–767. doi:10.1038/nature08398.

Martin, F. A., Herrera, S. C. and Morata, G. (2009) "Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc", *Development*. *Development*, 136(22), pp. 3747–3756. doi:10.1242/dev.038406.

Martín, R., Pinal, N. and Morata, G. (2017) "Distinct regenerative potential of trunk and appendages of *Drosophila* mediated by JNK signalling", *Development*. *The Company of Biologists*, 144(21), pp. 3946–3956. doi:10.1242/DEV.155507.

Martincorena, I. (2019) "Somatic mutation and clonal expansions in human tissues", *Genome Medicine*. *BioMed Central Ltd.*, pp. 1–3. doi:10.1186/s13073-019-0648-4.

Martinez, A. M. and Cavalli, G. (2006) "The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development", *Cell Cycle*. *Taylor and Francis Inc.*, pp. 1189–1197. doi:10.4161/cc.5.11.2781.

Martinez, A. M., Colomb, S., Déjardin, J., Bantignies, F. and Cavalli, G. (2006) "Polycomb group-dependent Cyclin A repression in *Drosophila*", *Genes and Development*. *Genes Dev*, 20(4), pp. 501–513. doi:10.1101/gad.357106.

Martinez, A. M., Schuettengruber, B., Sakr, S., Janic, A., Gonzalez, C. and Cavalli, G. (2009) "Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling", *Nature Genetics*, 41(10), pp. 1076–1082. doi:10.1038/ng.414.

Martins, V. C., Busch, K., Juraeva, D., Blum, C., Ludwig, C., Rasche, V., Lasitschka, F., Mastitsky, S. E., Brors, B., Hielscher, T., Fehling, H. J. and Rodewald, H.-R. (2014) "Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus", *Nature*, 509(7501), pp. 465–470. doi:10.1038/nature13317.

Matsuoka, S., Huang, M. and Elledge, S. J. (1998) "Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase", *Science*. *American Association for the Advancement of Science*, 282(5395), pp. 1893–1897. doi:10.1126/science.282.5395.1893.

McEwen, D. G. and Peifer, M. (2005a) "Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis", *Development*. *The Company of Biologists*, 132(17), pp. 3935–3946. doi:10.1242/dev.01949.

McEwen, D. G. and Peifer, M. (2005b) "Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis", *Development*. *Development*, 132(17), pp. 3935–3946. doi:10.1242/dev.01949.

McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003) "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*.", *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), pp. 1765–8. doi:10.1126/science.1089035.

Medina, I., Calleja, M. and Morata, G. (2021) "Tumorigenesis and cell competition in *Drosophila* in the absence of polyhomeotic function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *National Academy of Sciences*, 118(45), p. e2110062118. doi:10.1073/PNAS.2110062118.

- Menéndez, J., Pérez-Garijo, A., Calleja, M. and Morata, G.** (2010) "A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(33), pp. 14651–14656. doi:10.1073/pnas.1009376107.
- Menut, L., Vaccari, T., Dionne, H., Hill, J., Wu, G. and Bilder, D.** (2007) "A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation", *Genetics*. Genetics, 177(3), pp. 1667–1677. doi:10.1534/genetics.107.078360.
- Milán, M., Pérez, L. and Cohen, S. M.** (2002) "Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing", *Developmental Cell*. Cell Press, 2(6), pp. 797–805. doi:10.1016/S1534-5807(02)00169-7.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. and Schedl, P.** (2001) "The *iab-7* Polycomb Response Element Maps to a Nucleosome-Free Region of Chromatin and Requires Both GAGA and Pleiohomeotic for Silencing Activity", *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 21(4), pp. 1311–1318. doi:10.1128/mcb.21.4.1311-1318.2001.
- Moberg, K. H., Schelble, S., Burdick, S. K. and Hariharan, I. K.** (2005) "Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth", *Developmental Cell*. Cell Press, 9(5), pp. 699–710. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.018.
- Monier, B., Péliissier-Monier, A., Brand, A. H. and Sanson, B.** (2010) "An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in *Drosophila* embryos", *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 60–65. doi:10.1038/ncb2005.
- Morata, G.** (2021) "Cell competition: A historical perspective", *Developmental Biology*. Elsevier Inc., pp. 33–40. doi:10.1016/j.ydbio.2021.02.012.
- Morata, G. and Calleja, M.** (2020) "Cell competition and tumorigenesis in the imaginal discs of *Drosophila*", *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, pp. 19–26. doi:10.1016/j.semcan.2019.06.010.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975) "Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*", *Nature*. Nature, 255(5510), pp. 614–617. doi:10.1038/255614a0.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1979) "Development of the eye-antenna imaginal disc of *Drosophila*", *Developmental Biology*. Academic Press, 70(2), pp. 355–371. doi:10.1016/0012-1606(79)90033-2.
- Morata, G. and Ripoll, P.** (1975) "Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate", *Developmental Biology*, 42(2), pp. 211–221. doi:10.1016/0012-1606(75)90330-9.
- Morata, G. and Sánchez-Herrero, E.** (1999) "Patterning mechanisms in the body trunk and the appendages of *Drosophila*", *Development*. The Company of Biologists, 126(13), pp. 2823–2828. doi:10.1242/DEV.126.13.2823.
- Moreno, E.** (2008) "Is cell competition relevant to cancer?", *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer, pp. 141–147. doi:10.1038/nrc2252.

Bibliografía

Moreno, E. and Basler, K. (2004) "dMyc transforms cells into super-competitors", *Cell*. Elsevier B.V., 117(1), pp. 117–129. doi:10.1016/S0092-8674(04)00262-4.

Moreno, E., Basler, K. and Morata, G. (2002) "Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development", *Nature*. Nature, 416(6882), pp. 755–759. doi:10.1038/416755a.

Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W. (2001) "A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in Drosophila", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(26), pp. 15050–15055. doi:10.1073/pnas.261408198.

Nagata, R. and Igaki, T. (2018) "Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors", *Development Growth and Differentiation*. Blackwell Publishing, pp. 522–530. doi:10.1111/dgd.12575.

Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K. (1996) "Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient", *Cell*. Elsevier B.V., 85(3), pp. 357–368. doi:10.1016/S0092-8674(00)81114-9.

Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1997) "Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing", *Development*. The Company of Biologists, 124(4), pp. 871–880. doi:10.1242/dev.124.4.871.

Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M. (1996) "Specification of the wing by localized expression of wingless protein", *Nature*. Nature, 381(6580), pp. 316–318. doi:10.1038/381316a0.

Norman, M., Wisniewska, K. a, Lawrenson, K., Garcia-Miranda, P., Tada, M., Kajita, M., Mano, H., Ishikawa, S., Ikegawa, M., Shimada, T. and Fujita, Y. (2012) "Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells", *Journal of Cell Science*, 125(Pt 1), pp. 59–66. doi:10.1242/jcs.085803.

Nüsslein-volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) "Mutations affecting segment number and polarity in drosophila", *Nature*. Nature, 287(5785), pp. 795–801. doi:10.1038/287795a0.

Oertel, M., Menthena, A., Dabeva, M. D. and Shafritz, D. A. (2006) "Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells", *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 130(2), pp. 507–520. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.049.

Oktaba, K., Gutiérrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. M. and Müller, J. (2008) "Dynamic Regulation by Polycomb Group Protein Complexes Controls Pattern Formation and the Cell Cycle in Drosophila", *Developmental Cell*. Elsevier, 15(6), pp. 877–889. doi:10.1016/J.DEVCEL.2008.10.005.

Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarlé, S. A. and Glaser, T. (2004) "Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute", *Development*. The Company of Biologists Ltd, 131(16), pp. 3907–3920. doi:10.1242/dev.01268.

Olivier-Van Stichelen, S. and Hanover, J. A. (2014) "X-inactivation normalizes O-GlcNAc transferase levels and generates an O-GlcNAc-depleted Barr body", *Frontiers in Genetics*. Frontiers Research Foundation, 5(AUG). doi:10.3389/fgene.2014.00256.

- Owusu-Ansah, E., Yavari, A. and Banerjee, U.** (2008) "A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species", *Protocol Exchange*. Springer Nature. doi:10.1038/nprot.2008.23.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Santé, J. M. and Rubin, G. M.** (2003) "Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development", *Developmental Cell*. Elsevier, 4(1), pp. 95–106. doi:10.1016/S1534-5807(02)00400-8.
- Paull, T. T.** (2015) "Mechanisms of ATM activation", *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews Inc., pp. 711–738. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034335.
- Penzo-Méndez, A. I., Chen, Y. J., Li, J., Witze, E. S. and Stanger, B. Z.** (2015) "Spontaneous cell competition in immortalized mammalian cell lines", *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(7), p. e0132437. doi:10.1371/journal.pone.0132437.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F. a and Morata, G.** (2004) "Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in Drosophila.", *Development (Cambridge, England)*, 131(22), pp. 5591–8. doi:10.1242/dev.01432.
- Pérez-Garijo, A., Shlevkov, E. and Morata, G.** (2009) "The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the Drosophila wing disc.", *Development (Cambridge, England)*, 136(7), pp. 1169–1177. doi:10.1242/dev.034017.
- Pinal, N., Calleja, M. and Morata, G.** (2019) "Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of drosophila: Roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration", *Open Biology*. Royal Society Publishing, 9(3). doi:10.1098/rsob.180256.
- Pinal, N., Martín, M., Medina, I. and Morata, G.** (2018) "Short-term activation of the Jun N-terminal kinase pathway in apoptosis-deficient cells of Drosophila induces tumorigenesis", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-04000-6.
- Piunti, A. and Shilatifard, A.** (2016) "Epigenetic balance of gene expression by polycomb and compass families", *Science*. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.aad9780.
- Poux, S., Kostic, C. and Pirrotta, V.** (1996) "Hunchback-independent silencing of late Ubx enhancers by a Polycomb Group response element", *EMBO Journal*. Wiley-VCH Verlag, 15(17), pp. 4713–4722. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00848.x.
- Poux, S., McCabe, D. and Pirrotta, V.** (2001) "Recruitment of components of Polycomb group chromatin complexes in Drosophila", *Development*. The Company of Biologists, 128(1), pp. 75–85. doi:10.1242/dev.128.1.75.
- Raaphorst, F. M., Vermeer, M., Fieret, E., Blokzijl, T., Dukers, D., Sewalt, R. G. A. B., Otte, A. P., Willemze, R. and Meijer, C. J. L. M.** (2004) "Site-Specific Expression of Polycomb-Group Genes Encoding the HPC-HPH/PRC1 Complex in Clinically Defined Primary Nodal and Cutaneous Large B-Cell Lymphomas", *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology Inc., 164(2), pp. 533–542. doi:10.1016/S0002-9440(10)63143-4.
- Randsholt, N. B., Maschat, F. and Santamaria, P.** (2000) "Polyhomeotic controls engrailed expression and the hedgehog signaling pathway in imaginal discs", *Mechanisms of Development*. Elsevier, 95(1–2), pp. 89–99. doi:10.1016/S0925-4773(00)00342-7.

Bibliografía

- Recasens-Alvarez, C., Alexandre, C., Kirkpatrick, J., Nojima, H., Huels, D. J., Snijders, A. P. and Vincent, J. P.** (2021) "Ribosomopathy-associated mutations cause proteotoxic stress that is alleviated by TOR inhibition", *Nature Cell Biology*. Nature Research, 23(2), pp. 127–135. doi:10.1038/s41556-020-00626-1.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E.** (2001) "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*", *Genome Research*. Genome Res, 11(6), pp. 1114–1125. doi:10.1101/gr.169101.
- Reynolds-Kenneally, J. and Mlodzik, M.** (2005) "Notch signaling controls proliferation through cell-autonomous and non-autonomous mechanisms in the *Drosophila* eye", *Developmental Biology*. Academic Press, 285(1), pp. 38–48. doi:10.1016/J.YDBIO.2005.05.038.
- Rhiner, C., López-Gay, J. M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martín, F. A., Lombardía, L. and Moreno, E.** (2010) "Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*", *Developmental Cell*. Cell Press, 18(6), pp. 985–998. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.010.
- Rhiner, C. and Moreno, E.** (2009) "Super competition as a possible mechanism to pioneer precancerous fields", *Carcinogenesis*. Carcinogenesis, pp. 723–728. doi:10.1093/carcin/bgp003.
- Rodrigues, A. B., Zoranovic, T., Ayala-Camargo, A., Grewal, S., Reyes-Robles, T., Krasny, M., Christine Wu, D., Johnston, L. A. and Bach, E. A.** (2012) "Activated STAT regulates growth and induces competitive interactions independently of Myc, Yorkie, Wingless and ribosome biogenesis", *Development (Cambridge)*. The Company of Biologists, 139(21), pp. 4051–4061. doi:10.1242/dev.076760.
- Roos, W. P. and Kaina, B.** (2006) "DNA damage-induced cell death by apoptosis", *Trends in Molecular Medicine*. Trends Mol Med, pp. 440–450. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007.
- Royzman, I., Whittaker, A. J. and Orr-Weaver, T. L.** (1997) "Mutations in *Drosophila* DP and E2F distinguish G1-S progression from an associated transcriptional program", *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(15), pp. 1999–2011. doi:10.1101/gad.11.15.1999.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H.** (2004) "Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the wingless signaling pathways", *Developmental Cell*, 7(4), pp. 491–501. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.019.
- Salomon, R. N. and Rob Jackson, F.** (2008) "Tumors of testis and midgut in aging flies", *Fly*. Taylor and Francis Inc., 2(6), pp. 265–268. doi:10.4161/fly.7396.
- Sánchez-Herrero, I, V., R, M. and G, M.** (1985) "Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex", *Nature*. Nature, 313(5998), pp. 108–113. doi:10.1038/313108A0.
- Sancho, M., Di-Gregorio, A., George, N., Pozzi, S., Sánchez, J. M., Pernaute, B. and Rodríguez, T. A.** (2013) "Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation", *Developmental Cell*. Elsevier, 26(1), pp. 19–30. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.012.
- Santabárbara-Ruiz, P., López-Santillán, M., Martínez-Rodríguez, I., Binagui-Casas, A., Pérez, L., Milán, M., Corominas, M. and Serras, F.** (2015) "ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 11(10). doi:10.1371/journal.pgen.1005595.

- Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Croce, L. Di and Cavalli, G.** (2017) "Leading Edge Review Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting". doi:10.1016/j.cell.2017.08.002.
- Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. and Cavalli, G.** (2011) "Trithorax group proteins: Switching genes on and keeping them active", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 799–814. doi:10.1038/nrm3230.
- Shah, N. and Sukumar, S.** (2010) "The Hox genes and their roles in oncogenesis", *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 361–371. doi:10.1038/nrc2826.
- Shlevkov, E. and Morata, G.** (2012) "A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila", *Cell Death and Differentiation*, 19(3), pp. 451–460. doi:10.1038/cdd.2011.113.
- Simpson, P.** (1976) "Analysis of the compartments of the wing of *Drosophila melanogaster* mosaic for a temperature-sensitive mutation that reduces mitotic rate", *Developmental Biology*. Dev Biol, 54(1), pp. 100–115. doi:10.1016/0012-1606(76)90289-X.
- Simpson, P.** (1979) "Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*", *Developmental Biology*. Academic Press, 69(1), pp. 182–193. doi:10.1016/0012-1606(79)90284-7.
- Simpson, P. and Morata, G.** (1981) "Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing", *Developmental Biology*. Academic Press, 85(2), pp. 299–308. doi:10.1016/0012-1606(81)90261-X.
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R. and Xu, T.** (2007) "Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(8), pp. 2721–2726. doi:10.1073/pnas.0611666104.
- Steffen, P. A. and Ringrose, L.** (2014) "What are memories made of? How polycomb and trithorax proteins mediate epigenetic memory", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 340–356. doi:10.1038/nrm3789.
- Steller, H.** (2008) "Regulation of apoptosis in *Drosophila*", *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ, pp. 1132–1138. doi:10.1038/cdd.2008.50.
- Struhl, G. and Basler, K.** (1993) "Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*", *Cell*. Cell, 72(4), pp. 527–540. doi:10.1016/0092-8674(93)90072-X.
- Suijkerbuijk, S. J. E., Kolahgar, G., Kucinski, I. and Piddini, E.** (2016) "Cell competition drives the growth of intestinal adenomas in *Drosophila*", *Current Biology*. Cell Press, 26(4), pp. 428–438. doi:10.1016/j.cub.2015.12.043.
- Tabata, T. and Kornberg, T. B.** (1994) "Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs", *Cell*. Cell Press, 76(1), pp. 89–102. doi:10.1016/0092-8674(94)90175-9.

- Tamori, Y., Bialucha, C. U., Tian, A. G., Kajita, M., Huang, Y. C., Norman, M., Harrison, N., Poulton, J., Ivanovitch, K., Disch, L., Liu, T., Deng, W. M. and Fujita, Y.** (2010) "Involvement of Lgl and mahjong/VprBP in cell competition", *PLoS Biology*. Public Library of Science, 8(7), p. e1000422. doi:10.1371/journal.pbio.1000422.
- Tanimoto, H., Itoh, S., Ten Dijke, P. and Tabata, T.** (2000) "Hedgehog creates a gradient of DPP activity in Drosophila wing imaginal discs", *Molecular Cell*. Cell Press, 5(1), pp. 59–71. doi:10.1016/S1097-2765(00)80403-7.
- Tokimasa, S., Ohta, H., Sawada, A., Matsuda, Y., Kim, J. Y., Nishiguchi, S., Hara, J. and Takihara, Y.** (2001) "Lack of the Polycomb-group gene *rae28* causes maturation arrest at the early B-cell developmental stage", *Experimental Hematology*. Exp Hematol, 29(1), pp. 93–103. doi:10.1016/S0301-472X(00)00620-2.
- Torres, J., Monti, R., Moore, A. L., Seimiya, M., Jiang, Y., Beerenwinkel, N., Beisel, C., Beira, J. V. and Paro, R.** (2018) "A switch in transcription and cell fate governs the onset of an epigenetically-deregulated tumor in drosophila", *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd, 7. doi:10.7554/eLife.32697.
- Uhlirva, M. and Bohmann, D.** (2006) "JNK- and Fos-regulated *Mmp1* expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in Drosophila", *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 25(22), pp. 5294–5304. doi:10.1038/sj.emboj.7601401.
- Vaccari, T. and Bilder, D.** (2005) "The Drosophila tumor suppressor *vps25* prevents nonautonomous overproliferation by regulating Notch trafficking", *Developmental Cell*. Cell Press, 9(5), pp. 687–698. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.019.
- Vincent, J. P., Kolahgar, G., Gagliardi, M. and Piddini, E.** (2011) "Steep Differences in Wingless Signaling Trigger Myc-Independent Competitive Cell Interactions", *Developmental Cell*. Elsevier, 21(2), pp. 366–374. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.021.
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J. M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., De Launoit, Y. and Fuks, F.** (2006) "The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation", *Nature*. Nature Publishing Group, 439(7078), pp. 871–874. doi:10.1038/nature04431.
- Wallace, S. S.** (1998) "Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA", *Radiation Research*. Radiation Research Society, 150(5 SUPPL.). doi:10.2307/3579809.
- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000) "Dual role for Drosophila epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development", *Genes and Development*. Genes Dev, 14(18), pp. 2271–2276. doi:10.1101/gad.827000.
- Wang, W., Qin, J.-J., Voruganti, S., Nag, S., Zhou, J. and Zhang, R.** (2015) "Polycomb Group (PcG) Proteins and Human Cancers: Multifaceted Functions and Therapeutic Implications HHS Public Access", *Med Res Rev*, 35(6), pp. 1220–1267. doi:10.1002/med.21358.
- Wernet, M. F., Labhart, T., Baumann, F., Mazzoni, E. O., Pichaud, F. and Desplan, C.** (2003) "Homothorax switches function of Drosophila photoreceptors from color to polarized light sensors", *Cell*. Elsevier B.V., 115(3), pp. 267–279. doi:10.1016/S0092-8674(03)00848-1.

- Whitcomb, S. J., Basu, A., Allis, C. D. and Bernstein, E.** (2007) "Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective", *Trends in Genetics*. Trends Genet, 23(10), pp. 494–502. doi:10.1016/j.tig.2007.08.006.
- White, A. E., Leslie, M. E., Calvi, B. R., Marzluff, W. F. and Duronio, R. J.** (2007) "Developmental and cell cycle regulation of the Drosophila histone locus body", *Molecular Biology of the Cell*. Mol Biol Cell, 18(7), pp. 2491–2502. doi:10.1091/mbc.E06-11-1033.
- White, R. A. H. and Akam, M. E.** (1985) "Contrabithorax mutations cause inappropriate expression of Ultrabithorax products in Drosophila", *Nature*, 318(6046), pp. 567–569. doi:10.1038/318567a0.
- White, R. A. H. and Wilcox, M.** (1984) "Protein products of the bithorax complex in Drosophila", *Cell*. Cell, 39(1), pp. 163–171. doi:10.1016/0092-8674(84)90202-2.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993) "Pattern formation in a secondary field: A hierarchy of regulatory genes subdivides the developing Drosophila wing disc into discrete subregions", *Development*. The Company of Biologists, 117(2), pp. 571–584. doi:10.1242/dev.117.2.571.
- Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D. A., Agapite, J., Steller, H. and Meier, P.** (2002) "The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis", *Nat Cell Biol*, 4(6), pp. 445–450. doi:10.1038/ncb799.
- Wolpert, L.** (1994) "Positional information and pattern formation in development", *Developmental Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 485–490. doi:10.1002/dvg.1020150607.
- Wolpert, L.** (2011) *Wolpert, L. (2011). Principles of development (4th ed.) - Google Académico, Principles of development (4th ed.). Oxford University Press.*
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T.** (2010) "Interaction between RasV12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion", *Nature*, 463(7280), pp. 545–548. doi:10.1038/nature08702.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993) *Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues*, *Development*. The Company of Biologists. doi:10.1242/DEV.117.4.1223.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R. H., Eshleman, J. R., Nowak, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Iacobuzio-Donahue, C. A.** (2010) "Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer", *Nature*. NIH Public Access, 467(7319), pp. 1114–1117. doi:10.1038/nature09515.
- Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Hirose, F. and Matsukage, A.** (1995) "Distribution of PCNA During Postblastoderm Cell Division Cycles in the Drosophila Melanogaster Embryo: Effect of a String- Mutation", *Cell Structure and Function*. Cell Struct Funct, 20(1), pp. 47–57. doi:10.1247/csf.20.47.
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H. and Inanami, O.** (2012) "Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint", *Free Radical Biology and Medicine*. Free Radic Biol Med, 53(2), pp. 260–270. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.

Bibliografía

Yamamoto, M., Ohsawa, S., Kunimasa, K. and Igaki, T. (2017) "The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition", *Nature*. Nature Publishing Group, 542(7640), pp. 246–250. doi:10.1038/nature21033.

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1996) "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient", *Cell*. Elsevier B.V., 87(5), pp. 833–844. doi:10.1016/S0092-8674(00)81991-1.

Zecca, M. and Struhl, G. (2002a) "Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling", *Development*. The Company of Biologists, 129(6), pp. 1369–1376. doi:10.1242/dev.129.6.1369.

Zecca, M. and Struhl, G. (2002b) "Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling", *Development*, 129(6), pp. 1357–1368. doi:10.1242/dev.129.6.1357.

Zhou, B. B. S. and Elledge, S. J. (2000) "The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective", *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 433–439. doi:10.1038/35044005.

Ziosi, M., Baena-López, L. A., Grifoni, D., Froidi, F., Pession, Andrea, Garoia, F., Trotta, V., Bellosta, P., Cavicchi, S. and Pession, Annalisa (2010) "dMyc functions downstream of yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant Cells", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 6(9), p. e1001140. doi:10.1371/journal.pgen.1001140.

Anexo: Publicaciones



A lo largo de mi Tesis Doctoral he sido autora de las siguientes publicaciones:

- Pinal, N., Martín, M., **Medina, I.** and Morata, G. (2018) "Short-term activation of the Jun N-terminal kinase pathway in apoptosis-deficient cells of *Drosophila* induces tumorigenesis", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-04000-6.
- **Medina, I.**, Calleja, M. and Morata, G. (2021) "Tumorigenesis and cell competition in *Drosophila* in the absence of polyhomeotic function", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 118(45), p. e2110062118. doi:10.1073/PNAS.2110062118.

A continuación, se anexa copia del artículo Medina *et al.*, 2021 por ser la publicación directamente relacionada con mi Tesis Doctoral.



Tumorigenesis and cell competition in *Drosophila* in the absence of *polyhomeotic* function

Izarne Medina^a, Manuel Calleja^a, and Ginés Morata^{a,1}

^aCentro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma Madrid, 28049 Madrid, Spain

This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Sciences elected in 2018.

Contributed by Ginés Morata, September 21, 2021 (sent for review May 31, 2021; reviewed by Yasuyuki Fujita and Eugenia Piddini)

Cell competition is a homeostatic process that eliminates by apoptosis unfit or undesirable cells from animal tissues, including tumor cells that appear during the life of the organism. In *Drosophila* there is evidence that many types of oncogenic cells are eliminated by cell competition. One exception is cells mutant for *polyhomeotic* (*ph*), a member of the Polycomb family of genes; most of the isolated mutant *ph* clones survive and develop tumorous overgrowths in imaginal discs. To characterize the tumorigenic effect of the lack of *ph*, we first studied the growth of different regions of the wing disc deficient in *ph* activity and found that the effect is restricted to the proximal appendage. Moreover, we found that *ph*-deficient tissue is partially refractory to apoptosis. Second, we analyzed the behavior of clones lacking *ph* function and found that many suffer cell competition but are not completely eliminated. Unexpectedly, we found that nonmutant cells also undergo cell competition when surrounded by *ph*-deficient cells, indicating that within the same tissue cell competition may operate in opposite directions. We suggest two reasons for the incompleteness of cell competition in *ph* mutant cells: 1) These cells are partially refractory to apoptosis, and 2) the loss of *ph* function alters the identity of imaginal cells and subsequently their cell affinities. It compromises the winner/loser interaction, a prerequisite for cell competition.

cell competition | polyhomeotic | JNK | tumors

The metazoan body contains many millions of cells organized in different organs and tissues with characteristic shape and size. There is a control mechanism that stops growth once the final size is reached; the genetic/cellular basis of this mechanism is not known but its malfunction may result in uncontrolled growth, often leading to cancer.

Cancer has a genetic basis; its onset is associated with cells acquiring somatic mutations that lead to uncontrolled cell proliferation. Because of its sophisticated genetic tools, *Drosophila* has become a useful model to explore the genetic basis of cancer. Most of the information about tumorigenesis in *Drosophila* comes from studies of a number of lethal mutations that cause cancer during the larval period. These are mutations in genes, collectively referred to as tumor-suppressing genes (TSG), controlling cell polarity, endocytosis, or cell identity (reviewed in refs. 1 and 2). It is of interest that many of these genes have human homologs whose mutations are also associated with various forms of cancer (3, 4; reviewed in ref. 2).

Relevant to tumorigenesis is the phenomenon of cell competition. This is a homeostatic process, originally discovered in *Drosophila* (5), responsible for the elimination from animal tissues of viable but undesirable cells that may compromise the fitness or the survival of the organism (6, 7). Cell competition is a conserved phenomenon; there is compelling evidence that it occurs not only in *Drosophila* but also in vertebrate tissues (8–11), thus indicating that it is a general feature of metazoans. In outline, cell competition describes a short-range interaction between two types of viable cells, winner and loser, which ends with the elimination of the loser cells. In *Drosophila*, the death of the loser

cells is mediated by the activity of the Jun N-terminal kinase pathway (JNK), which in turn induces the activity of proapoptotic genes (6). The surveillance role of cell competition includes not only the removal of unfit or poorly adapted cells, but also the elimination of oncogenic cells that may appear during the life of the organism. Thus, it functions as a tumor-suppressing process, both in *Drosophila* and in mammals (12–17).

In *Drosophila* the tumor-suppressing role of cell competition has been assayed in the imaginal discs. These are structures that contain the precursors of the adult cuticle and are named after the adult cuticular structure they build, wing disc, leg disc, eye-antenna disc, and so forth. The experiments consisted of generating within nonmutant tissue clones of marked cells carrying oncogenic mutations and then analyzing the fate of the clones. Those experiments mimic regular tumorigenic processes in which a group of tumor cells arises within a normal tissue, overproliferates, and eventually colonizes the entire tissue.

A number of TSG mutations—that is, *lethal giant larvae* (*lgl*), *scribble* (*scrib*), *disc large* (*dlg*), *rab5*, *mahjong* (12–14, 18, 19)—have been assayed with this method. The general conclusion is that while entire domains or compartments mutant for any of those genes are able to develop large tumorous overgrowths, isolated clones behave as losers and are eliminated by JNK-mediated apoptosis.

However, there are situations in which isolated oncogenic cells overcome cell competition and form a tumor (14, 19–21). Detailed studies of these situations are of interest as they may

Significance

Because of the large number of cells, it is inevitable that the body of animals contains aberrant cells that may compromise the viability of the organism. Cell competition is a conserved mechanism responsible for removing those undesirable cells. Work in *Drosophila* and vertebrates has shown that cell competition also exerts a strong tumor-suppressing function, eliminating oncogenic cells that appear during the lifetime of the organism. Sometimes, however, oncogenic cells may overcome cell competition and develop invasive tumors. Studies of these situations may provide insights into the mechanisms by which oncogenic cells generate tumors in humans. We present new observations in *Drosophila* about the tumorigenic mutation *polyhomeotic* and how the mutant cells may evade the control of cell competition.

Author contributions: G.M. designed research; I.M. and M.C. performed research; I.M., M.C., and G.M. analyzed data; and G.M. wrote the paper.

Reviewers: Y.F., Kyoto Daigaku; and E.P., University of Bristol.

The authors declare no competing interest.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: gmorata@cibm.csic.es.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2110062118/-DCSupplemental>.

Published October 26, 2021.

provide insights into the mechanisms by which oncogenic cells generate overgrowing tumors in other species. Previous work in our laboratory (14, 19) has shown that if oncogenic cells form a group that is sufficiently large, some cells can escape cell competition and continue proliferating. The basis of this “group protection” model is that cell competition is a short-range process and some oncogenic cells within the group are beyond its reach (reviewed in ref. 2).

Another example of oncogenic cells that appear to evade cell competition is provided by cells mutant for *polyhomeotic* (*ph*), a component of the Polycomb repressive complex (PRC1). This group of genes is in charge of the maintenance of cell identity during development (22). Mutations at members of the Polycomb family are also associated with tumor overgrowths in *Drosophila* (23) and their human orthologs with cancer (3, 4). Unlike the behavior of other TSGs (12, 14, 18, 19), clones of *ph* mutant cells surrounded by normal cells appear to survive and overgrow to form large tumors that alter the size and morphology of the discs (24–27).

Here we report experiments in which we first analyzed in the wing disc the tumorigenic effects of the suppression of *ph* function in various regions and compartments. We found that only the proximal wing region developed overgrowths in the absence of *ph* function. We also found that *ph* mutant tissues appear to be refractory to apoptosis. Second, we investigated the mechanisms by which *ph* mutant cells may evade cell competition. Our results indicate that just like in other TSG loss-of-function clones, *ph*-deficient clones are subject to cell competition, but they are unable to eliminate all *ph*-deficient cells, even though some suffer apoptosis. Surprisingly, we found that nonmutant cells can also undergo cell competition when surrounded by *ph*-deficient cells, indicating that the interactions between *ph*⁻ and *ph*⁺ cells may result in opposite outcomes, depending on the local context. We propose two possible reasons for the incompleteness of cell competition in *ph*-deficient cells: 1) They are partially refractory to apoptosis, thus facilitating their survival; and 2)

the loss of *ph* function causes a dramatic change in the identity of the cells, which is reflected in the acquisition of very different cell mixing properties. Such effects compromise in many clones the short-range winner/loser interaction, thus allowing their survival and growth.

Results

Elimination of *ph* Function in Different Regions of the Wing Disc: Effect on Growth. The *ph* locus consists of two tandem duplicated genes, *ph*-proximal and *ph*-distal, which are functionally redundant (28). Both loci can be inactivated by RNA interference using a single construct (24). To abolish *ph* activity in different regions of the wing disc, we used the Gal4/UAS system, utilizing an UAS (*UAS-ph^{KD}*) bearing the interfering RNAi (*Materials and Methods*). The Gal4 lines used may drive expression in the whole disc, in the anterior or the posterior compartment, or in various other regions, as described below (Figs. 1 and 2). Discs of genotype *esg > ph^{KD}*, in which *ph* function is suppressed in the whole disc, generate massive overgrowths and gross morphological alterations (Fig. 1 A and B), similar to those described for null mutants (23, 24).

Suppression of *ph* function in the anterior and posterior compartments. Using the Gal4 lines *ci-Gal4* and *hh-Gal4*, which drive expression in the anterior (A) and posterior (P) compartments, respectively, we suppressed *ph* function in those compartments. *Cubitus interruptus* (*ci*) > *ph^{KD}* discs present large overgrowths in the wing region of the anterior compartment, although the notum region does not overgrow (Fig. 1 D–D’). The overgrown anterior wing compartment shows increased incorporation of the division marker EdU in comparison with the P compartment, although we note that the zone of high EdU levels extends to regions of the P compartment close to the A/P border (Fig. 1D), indicating a noncell-autonomous effect on proliferation. In contrast with the wing appendage, EdU levels in the notum territory are low, which fits with the observation that it does not overgrow. The constraint of the overgrowth of *ph^{KD}* tissue to the appendage is also supported by the results

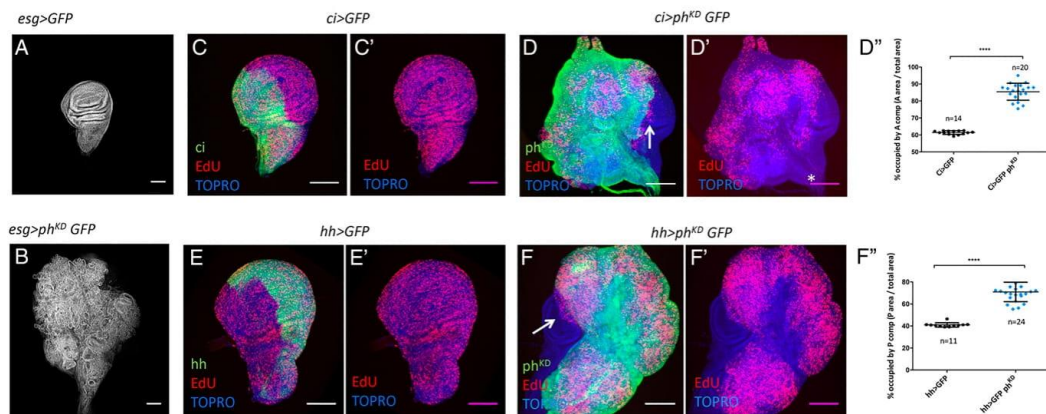


Fig. 1. Effect of the loss of *ph* function on cell proliferation and growth of the wing imaginal disc. (A) Normal-sized third-instar wing disc of *esg > GFP* genotype. (B) Wing disc of *esg > ph^{KD}* genotype in which all the wing disc cells are defective in *ph* function. The photograph was taken at the same magnification as in A to illustrate the large overgrowth of the disc. (C–C’) Disc of genotype *ci > GFP* stained for GFP and EdU (red). The GFP label is restricted to the A compartment. Notice in C’ that EdU incorporation is homogenous and similar in the A and P compartment. (D–D’) *ci > ph^{KD}* GFP disc showing overgrowth and high levels of EdU incorporation (D) and size increase of the A compartment (D’), but mostly restricted to the appendage area; the notum region, indicated by the asterisk in D’, does not appear to increase in size. Note in D a small region of the P compartment close to the A/P boundary (arrow) with high EdU levels. Note also (asterisk) that the notum region shows little EdU incorporation, although it belongs to the Ci domain. The four asterisks in D’ indicate a P value less than 0.0001. (E–E’) *hh > GFP* stained for GFP and EdU disc showing the *hh* expression domain, confined to the P compartment (F–F’) *hh > ph^{KD}* GFP disc stained for GFP and EdU. In this case the increase in cell proliferation (F) and in size (F’) is circumscribed to the P compartment, except in a small region of the A compartment close to the A/P boundary, where EdU is also increased (arrow). The four asterisks indicate a P value less than 0.0001. (Scale bars, 100 μ m).

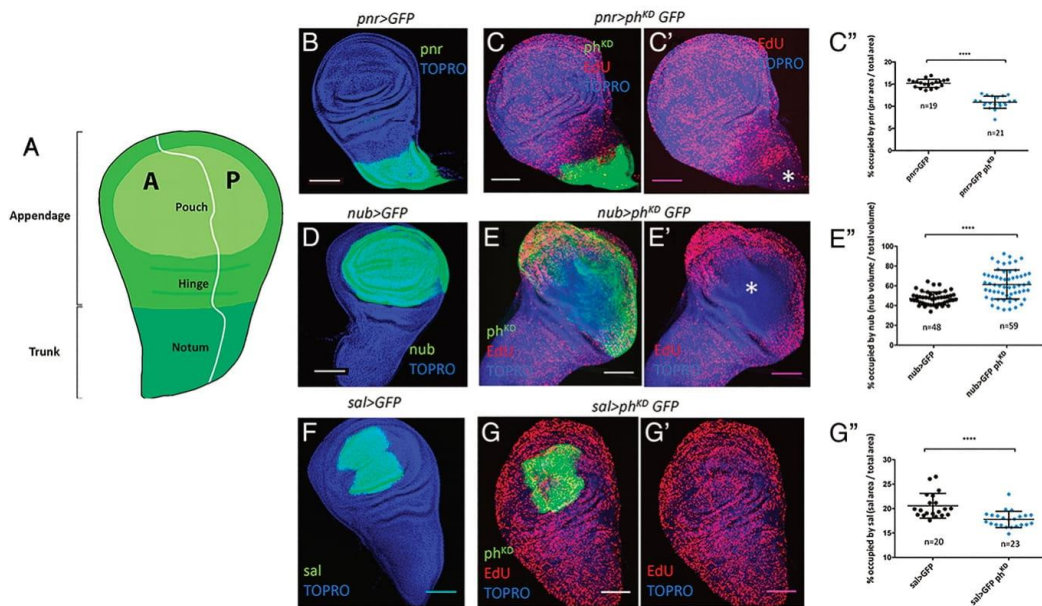


Fig. 2. Distinct effects of the loss of *ph* function on cell proliferation and growth of different parts of the wing imaginal disc. (A) Scheme of a wing disc illustrating the major regions and compartments. Apart from the subdivision into A and P compartments, there is a distinction between the appendage region that includes the hinge and the notum area, which is part of the trunk. (B) *pnr > GFP* disc to illustrate the Pnr domain, which covers the more proximal part of the notum. (C–C') *pnr > ph^{KD} GFP* disc showing a reduction in cell proliferation (C' asterisk) and in size (C'') in the Pnr domain. (D) *nub > GFP* disc to delineate the Nubbin domain, covering the wing pouch and part of the hinge. (E–E') *nub > ph^{KD} GFP* showing increase of size of the domain (E–E'), but the increase of EdU incorporation is restricted to the periphery (E'); there is very little cell division in the central region (asterisk). (F) *sal > GFP* disc to show the Sal domain in the center of the wing disc. (G–G') *sal > ph^{KD} GFP* showing that there is no detectable effect on cell proliferation (G'), although but a small decrease in size (G''). In C', E', and G' the four asterisks indicate a P value less than 0.0001. (Scale bars, 100 μm.)

obtained with the 41D11-Gal4 and the 248-Gal4 lines (*SI Appendix*, Fig. S1), which drive expression in the notum and also in part of the appendage, especially the hinge area. In neither case does the notum overgrow.

The suppression of *ph* function in the P compartment (*hedgehog [hh] > ph^{KD} discs*) also causes large overgrowths (Fig. 1 F–F'); EdU incorporation reveals high proliferation levels in P compartment cells. As in the preceding case, the high EdU levels are not strictly limited to the P *ph^{KD}* compartment but extends to regions of the A compartment close to the A/P border (Fig. 1F), confirming the nonautonomous effect observed in the *ci > ph^{KD}* discs.

We note that the high levels of EdU incorporation in the A *ph^{KD}* and the P *ph^{KD}* compartments in the experiments above appear to be associated with very low incorporation in the control compartments (Fig. 1 D' and F'), much lower than expected for discs at that age (Fig. 1D). It may suggest that the overgrowth of the *ph^{KD}* compartments has a negative effect on the growth of the sister compartments.

Suppression of *ph* function in thoracic and appendage regions. The results described above indicate a different response of the notum and wing territories to lack of *ph* function. To confirm this finding, we examined the consequences of compromising *ph* activity in exclusive trunk and appendage regions (Fig. 2A). The *pnr-Gal4* line is expressed only in the proximal notum (29), the *nub-Gal4* in the wing pouch and part of the hinge, and the *sal-Gal4* line in the central region of the wing pouch (30, 31).

The Pnr domain covers the more proximal part of the notum, an area ~20% of the disc (Fig. 2B). The suppression of

ph in the Pnr domain does not result in overgrowth. In contrast, we find a small but significant decrease in size (Fig. 2C''), likely the result of having lower division rate than the rest of the disc, as indicated by the levels of EdU incorporation (Fig. 2C'). We checked the possibility of the presence of apoptosis, but did not find significant levels of apoptotic markers like Dcp1.

In contrast, in *nub > ph^{KD}* discs the Nubbin domain (Fig. 2D) is overgrown and shows increased levels of EdU incorporation (Fig. 2 E–E'). The increase is restricted to the periphery of the domain, whereas in the most central region EdU incorporation is much lower and is also lower than in notum region (Fig. 2E'), where *ph* function is normal. This is an intriguing result that suggests that the overgrowth of the periphery may have a negative effect on the growth of the central region.

The observation that the overgrowth caused by the loss of *ph* function is restricted to the proximal region is reinforced by the results obtained with the *sal-Gal4* line, which is expressed in the central region of the wing (Fig. 2F): in *sal > ph^{KD}* discs the Sal domain does not overgrow but suffers a small size decrease (Fig. 2 G–G''). EdU incorporation in the domain is not detectably different from that in the rest of the disc (Fig. 2G').

JNK and JAK/STAT Activities, Growth, and Apoptosis in *ph*-Deficient Domains. The results in the previous section suggest that factors promoting growth are differentially affected by the lack of *ph* function. One candidate is the JNK pathway, which is not normally active in the wing disc (except in a very small proximal region in the thorax) (Fig. 3A), but becomes ectopically activated in *ph* mutant clones (26).

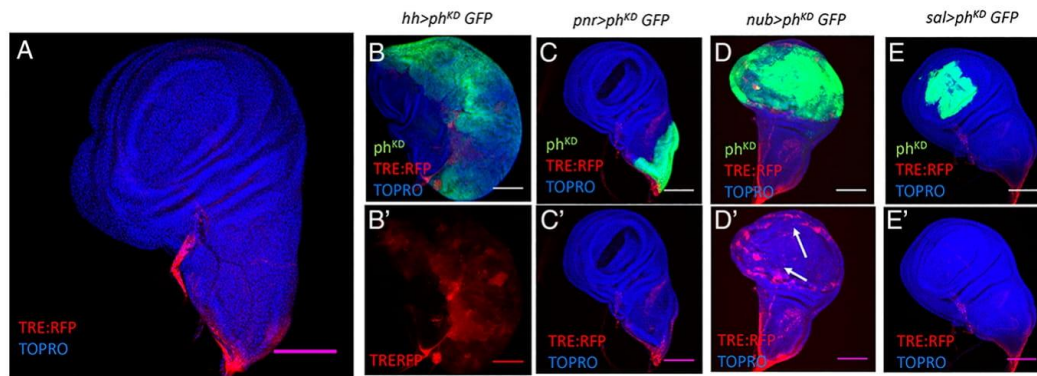


Fig. 3. JNK activity in the absence of *ph* function. The discs are labeled with GFP to define the domains of expression and with TRE:RFP to reveal JNK activity. (A) JNK activity in normal discs is restricted to a very proximal region of the disc. (B and B') *hh > ph^{KD}* disc showing an overgrown P compartment containing JNK activity. (C and C') *pnr > ph^{KD} GFP* disc. There is no JNK activity in the Pnr domain. (D and D') *nub > ph^{KD} GFP* disc. There is gain of JNK activity in the periphery of the wing domain (arrows) but no in the center. (E and E') *sal > ph^{KD} GFP* showing no up-regulation of JNK in the Sal domain. (Scale bars, 100 μ m.)

We have examined JNK activity in various regions of the wing disc lacking *ph* function. In *hh > ph^{KD}* discs, there is moderate up-regulation of JNK in the P compartment (Fig. 3 B and B'). In *nub > ph^{KD}* discs there also is gain of JNK but restricted to the outer region of the domain (Fig. 3 D and D'), and in *sal > ph^{KD}* and *pnr > ph^{KD}* discs there is no JNK activity in the corresponding Pnr or Sal domain (Fig. 3 C, C', E, and E'). We note that the regions of the disc in which JNK is up-regulated in the absence of *ph* function are those that overgrow, suggesting the JNK may be a contributing factor. Indeed, we find (SI Appendix, Fig. S2) that the suppression of JNK function in the posterior compartment of *hh > ph^{KD}* discs results in a significant, though not complete, reduction of the overgrowth and of EdU incorporation. This result suggests that other factors, in addition to JNK, stimulate the growth of *ph*-deficient tissue. Previous work (23, 25, 26) has shown that the JAK/STAT pathway acts independently of JNK and contributes to the overgrowth of *ph* mutant clones. We have examined JAK/STAT

activity in *nub > ph^{KD}* discs and also in clones of *ph^{KD}* cells in different regions of the disc. The expression of JAK/STAT in normal discs is restricted to the hinge area (32). In *nub > ph^{KD}* discs we found that there is ectopic JAK/STAT expression, which extends to part of the Nubbin domain, although it does not reach the central region of the disc (Fig. 4 B–B'). This result is confirmed by examination of the *ph^{KD}* clones, which show gain of JAK/STAT in the proximal wing region but not in the central wing region or the notum (Fig. 4 C–D'). These results strongly suggest that the overgrowth of *ph*-defective tissue is caused by the joint activities of JNK and JAK/STAT in the proximal wing.

Cells Lacking *ph* Function Are Refractory to Apoptosis. The gain of JNK activity in some disc regions when lacking *ph* function is of interest because JNK is known to induce apoptosis when activated in the wing disc (33, 34). However, we find that the amount of apoptosis in the corresponding compartment of *ci >*

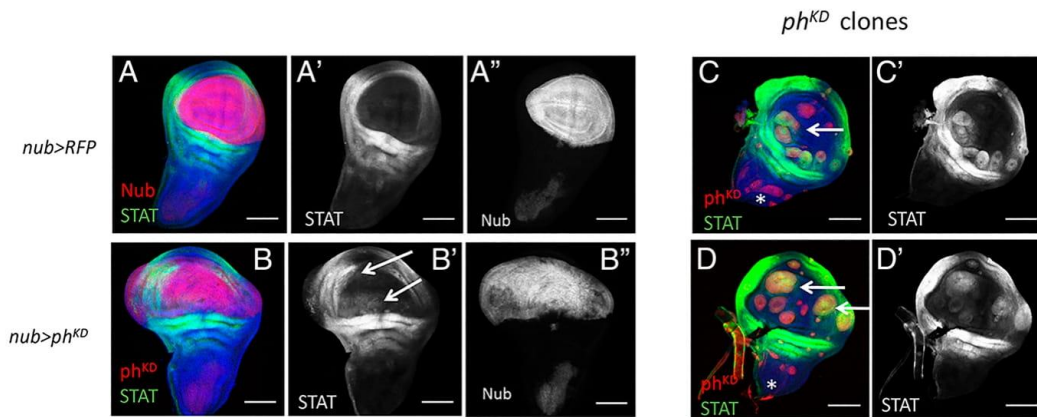


Fig. 4. Gain of JAK/STAT activity in *ph^{KD}* tissue. (A–A''). Control disc of *nub > RFP* phenotype delineating the Nubbin (red) and JAK/STAT (green, as monitored by the 10X STAT marker) domains. Note the JAK/STAT domain is restricted to the hinge region and shows little or no overlap with the Nubbin domain. (B–B'') Disc of genotype *nub > ph^{KD}* showing expansion of the JAK/STAT domain to the proximal part of the Nubbin domain, indicated by the white arrows. (C–D'') Two discs containing numerous *ph^{KD}* clones (red). Note that the clones in the proximity of the JAK/STAT wing domain are labeled with STAT but those located more centrally are not. The clones in the notum region (asterisk) are not labeled with STAT. (Scale bars, 100 μ m.)

ph^{KD} and *hh > ph^{KD}* discs is very low, just as in the wild-type (Fig. 5 A and A' and SI Appendix, Fig. S3 A and A'). These results raised the possibility that *ph^{KD}* cells could be resistant to apoptosis. There is also evidence from the vertebrate field that alterations in the expression of Bmi-1, a target of the PcG complex, may inhibit apoptosis (35).

We assayed the response of *ci > ph^{KD}* and *hh > ph^{KD}* discs to X-ray-induced apoptosis: they were irradiated (4,000 R) and stained for activity of the effector caspase Dcp1 24 h afterward. In *hh > ph^{KD}* discs, the control A compartment shows high level of apoptosis, whereas there is much less in the P *ph^{KD}* compartment (Fig. 5 B and B'). Conversely, in *ci > ph^{KD}* discs apoptosis is higher in the control P than in the A *ph^{KD}* compartment (SI Appendix, Fig. S3 B and B'). Measurements of Dcp1 levels in the preceding experiments indicate a 70% lower response of *ph⁻* compartments to X-rays (Fig. 5C and SI Appendix, Fig S3C).

We searched for factors that may be associated with the low apoptotic response of *ph* cells to X-rays. One of the early events involved in DNA damage response (DDR) to ionizing agents is the phosphorylation (pH2Av) of the histone H2Av (36). We compared pH2Av levels in the A and P compartments of irradiated *hh > ph^{KD}* discs 10 min after the irradiation. As shown in Fig. 5 D and D', while the control A compartment shows increased levels of pH2Av, there is no increase in the P *ph^{KD}* compartment, indicating that cells deficient in *ph* function have a reduced response to double-strand DNA damage.

The results obtained with H2Av are of interest in view of recent work (37) on the overexpression of the Ras pathway in imaginal discs: it causes DNA damage but impedes H2Av

phosphorylation. Furthermore, it prevents X-ray-induced apoptosis mediated by P53, raising the possibility that the lack of apoptosis observed in our *ph^{KD}* experiments could be due to interference with P53 function. We examined the levels of P53 in irradiated *ci > ph^{KD}* discs and found the amount of P53 protein in the A *ph^{KD}* compartment significantly lower than in the control P compartment (Fig. 5 F and F').

Another factor associated with apoptosis is oxidative stress, an imbalance between free radical activity and antioxidant activity that produces inappropriate high levels of reactive oxygen species (ROS). Using dihydroethidium (DHE) as marker (38), we measured ROS levels after irradiation of *hh > ph^{KD}* discs. In nonirradiated *ph^{KD}* mutant tissue the DHE label is like that in the wild-type, but in irradiated discs the control A compartment shows elevated levels of DHE (Fig. 5 E and E'), significantly higher than in the P *ph^{KD}* compartment. These results indicate that *ph^{KD}* cells are resilient to oxidative stress.

Finally, we examined if JNK activity is modified after irradiation. As shown above (Fig. 3 B and B'), nonirradiated *ph^{KD}* cells show moderate levels of JNK activity, whereas there is no JNK in the *ph⁺* compartment. However, the response of *ph^{KD}* and *ph⁺* compartments to X-rays is the opposite: the control A *ph⁺* compartment shows up-regulation of JNK, while in the P *ph^{KD}* compartment JNK expression is not detectably increased (Fig. 5 G and G'). Moreover, JNK activity in the A compartment is intense and punctate (Fig. 5G''), while in the P *ph^{KD}* compartment it remains lower and homogenous. The lack of response of JNK to irradiation of the P *ph^{KD}* compartment is likely a reflection of the low response to oxidative stress and to DDR.

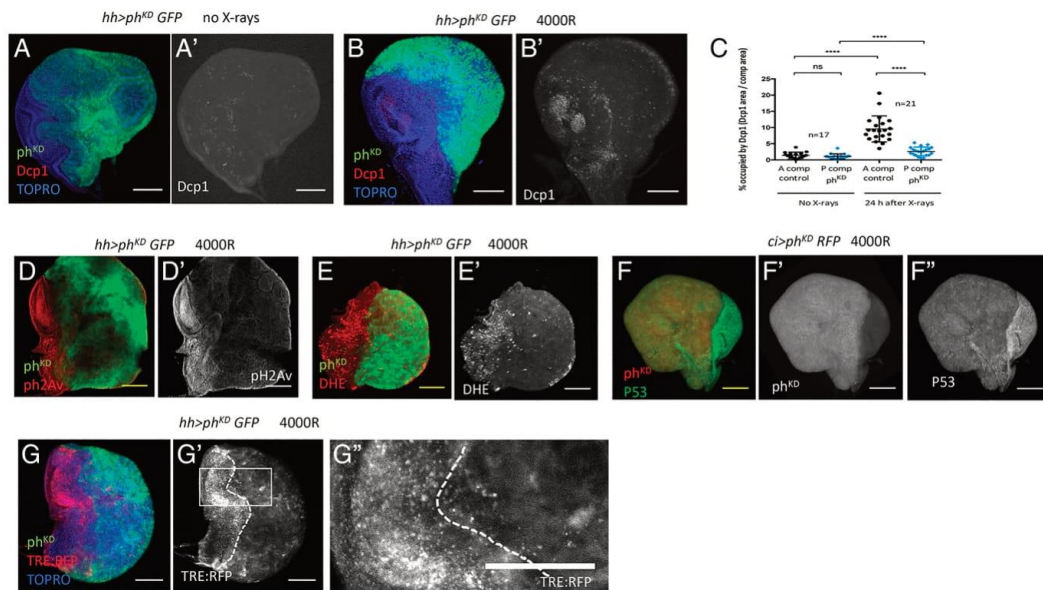


Fig. 5. Cells deficient for *ph* function are refractory to X-ray-induced apoptosis. (A–A') Nonirradiated *hh > ph^{KD} GFP* disc labeled with GFP and the effector caspase Dcp1 (red). Apoptosis levels are low in both the A and P compartments. (B–B') *hh > ph^{KD} GFP* disc irradiated with 4,000 R. Note that the amount of apoptosis is much higher in the control A than in the *ph*-deficient P compartment. (C) Comparison of Dcp1 expression in nonirradiated A and P compartments irradiation of *hh > ph^{KD} GFP* discs. Four asterisks indicate a *P* value less than 0.0001. (D–D') Irradiated *hh > ph^{KD} GFP* disc showing the low response of H2Av (red) phosphorylation in the P *ph^{KD}* compartment compared with the A compartment. (E–E') Comparison of the DHE levels (red) in A and P compartments after irradiation of an *hh > ph^{KD} GFP* disc. (F–F') Irradiated *ci > ph^{KD} RFP* disc containing the p53-GFP insert. The anterior compartment (F) is of *ph^{KD}* genotype and shows much lower expression of P53, than the control posterior compartment, as illustrated in F'. (G–G'') Irradiated *hh > ph^{KD} GFP* showing the distinct response of JNK expression, monitored by the TRE:RFP marker (red), of the A and P compartments. Higher magnification in G'' of a section of G' shows the high, punctuated JNK activity in the A compartment, different from the low homogenous JNK activity in the *ph*-deficient P compartment. The dotted line delineates the A/P compartment boundary. (Scale bars, 100 μm.)

Growth and Cell Competition in Discs with *ph*-Deficient Clones.

Having analyzed the consequences of compromising *ph* function in different regions of the wing disc, we characterized the behavior of *ph*-deficient cells surrounded by nonmutant tissue. We induced two types of marked clones lacking *ph* function: clones homozygous for the allele *ph*⁵⁰⁵ or clones in which *ph* function is blocked effectively by a *UAS-ph*^{KD} construct (*Materials and Methods*). The phenotype of the *ph*⁵⁰⁵ and *ph*^{KD} clones is indistinguishable and similar to that described for clones homozygous for strong *ph* alleles (24–27, 39–41). For most of the experiments, we used the flip-out method. *ph*^{KD} clones are generally round, present smooth borders, and often appear to sort out from the surrounding tissue. Many reach a large size and generate tissue overgrowths (Fig. 6 A, B, and D). The clones in the notum are significantly smaller than those in the wing: from a sample of 24 discs, the average size of notum clones is 0.42% (*n* = 71) of the total surface of the disc, whereas in the wing clones is 1.1% (*n* = 188). This is consistent with the observation above that the lack of *ph* function in the notum does not cause overgrowth. Nevertheless, *ph* function is required in the notum, because *ph*^{KD} clones in that region show a mutant phenotype: the ectopic expression of *engrailed* (*en*) (*SI Appendix, Fig. S4 C and C'*), which is not normally active there as it belongs to the anterior compartment. This result suggests that it is only the overgrowing phenotype of *ph*^{KD} that is not reflected in the notum.

Although the clones form coherent patches, we frequently observed that some cells detach from the main group and become surrounded by *ph*⁺ cells (Fig. 6 C and D). Of a sample of 155 clones in 24 discs, we found 38 (24%) showing *ph*^{KD} cells that had moved away from the main group. This behavior has not been reported before and may suggest *ph* mutant cells may acquire migratory properties.

The sorting out of the *ph*^{KD} clones is likely to be a consequence of cells having different cell adhesion and affinity properties due to the change of identity caused by the loss of *ph* function (41, 42). To confirm this, we examined the expression of several identity-determining genes—*en*, *ci*, *Ultrabithorax* (*Ubx*), and *Abdominal-B* (*Abd-B*)—and found that they are ectopically activated in *ph*^{KD} clones in the wing disc (*SI Appendix, Fig. S4*).

The overgrowth of the *ph*^{KD} clones can be explained by their cells having a higher proliferation rate than surrounding cells, as indeed has been suggested by previous work (27) and also by our experiments compromising *ph* activity in large domains (Fig. 1). However, it has also been suggested that the overgrowths caused in the eye by *ph* mutant clones are mostly due to a nonautonomous effect on surrounding cells (25).

We analyzed the growth rate of *ph*^{KD} clones by examining EdU incorporation. Surprisingly, we found that cell proliferation is not equal in all mutant patches: within the same disc, some clones show higher EdU incorporation, whereas in others it is as in the surrounding territory (Fig. 6 E and E'). This result indicates that per se the loss of *ph* does not cause an increase of cell proliferation. We found that the bigger clones are preferentially located in the periphery of the disc (Fig. 6F), in agreement with the observation above (Fig. 2 E–E') that the overgrowth of *ph*^{KD} occurs in the proximal wing region.

The bigger clones show higher EdU incorporation, and in many the high EdU label extends noncell-autonomously to regions outside the patch, suggesting that the *ph*^{KD} cells secrete proliferative signals. It has been shown that *ph*[−] cells secrete ligands of the JAK/STAT pathway (25) and up-regulate JNK (26), also illustrated in Figs. 3 and 4. Moreover, these two pathways are known to induce proliferative signaling (21, 43, 44). The observation that high proliferation levels and the nonautonomous effect are restricted to large patches suggests that the accumulation of cells generates sufficient proliferative signaling as to affect the growth of the clone and of the surrounding territory.

Cell Competition, JNK, and Oxidative Stress in *ph*-Deficient Clones.

Unlike clones mutant for TSGs (12–14, 18, 19), isolated clones lacking *ph* function may survive surrounded by nonmutant tissue, suggesting that they are resistant to cell competition. However, it has been observed (25) that *ph*[−] clones frequently contain cells in apoptosis, what may indicate cell competition is operating in those clones.

To determine if *ph*^{KD} clones are affected by cell competition, we looked for indications, such as localized apoptosis at the interface between mutant and nonmutant cells, up-regulation

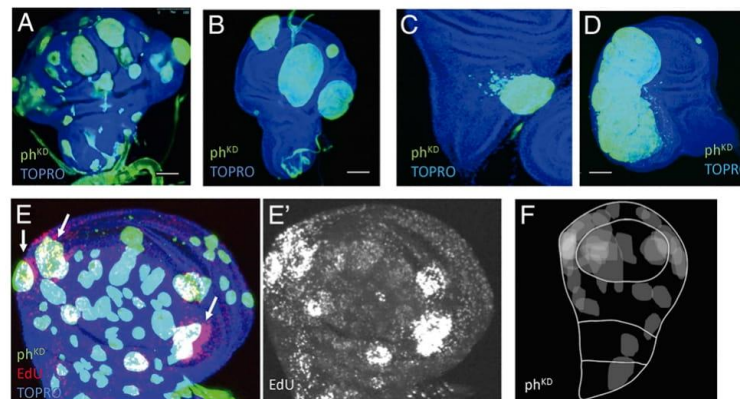


Fig. 6. Some features of *ph*^{KD} clones. (A–B) Wing discs with *ph*^{KD} clones, many of which tend to segregate from the surrounding territory, as suggested by their round shape and smooth borders. Note in the two cases the large variability in clone size, even though all the clones arose at the same time. (C–D) Two cases of isolated *ph*^{KD} cells in the proximity of a large clone. Those cells have moved away from the main group. (E–E') Disc with numerous *ph*^{KD} stained with EdU to reveal cell proliferation rate. Note that the larger clones show higher EdU incorporation than the smaller ones and the high EdU levels extend to the neighbor *ph*⁺ region (arrows), indicating a nonautonomous effect. The majority of the *ph*^{KD} clones grow at the same rate as the nonmutant territory, as illustrated in E'. (F) Recompilation of large *ph*^{KD} clones (>4% of the disc surface) in the disc, showing that they preferentially appear in the periphery of the disc. The white areas indicate the superposition of several clones.

of JNK, and activity of effector caspases, which are hallmarks of cell competition. Regarding apoptosis, 41 discs containing ph^{KD} clones were stained for the apoptotic marker Dcp1 96 h after clone initiation. Of a total of 256 clones, 125 (49%) had associated apoptosis. Moreover, the location of the ph^{KD} cells in apoptosis strongly suggests a cell competition scenario: they often appear at the border of the patch (Fig. 7 A and B), suggesting that their elimination is caused by interactions with neighbor nonmutant cells. Apoptosis generally occurs in clones with wiggly borders, in which ph^{KD} cells are in more contact with ph^+ cells; those with smooth borders (Fig. 7 A and B) show no apoptosis. Moreover, we found cases of isolated ph^{KD} cells that have moved away from the main group (Fig. 7C): the isolated cells are in apoptosis although those in the patch appear protected. Because JNK is a critical factor in the elimination of loser cells (6, 14), we checked the activity of JNK in ph^{KD} cells in apoptosis and found that Dcp1 and the JNK marker metalloprotease 1 (Mmp1) are coincident (Fig. 7 B and C), strongly suggesting a role of JNK in the elimination of ph^{KD} cells in the border.

Two Modes of JNK Expression in ph^{KD} Mutant Clones. In the experiments above using the JNK marker Mmp1, JNK activity appears restricted to the clone borders (Fig. 6B), but previous results (26) have shown that JNK is expressed in the whole of ph mutant clones. To resolve this, we tested JNK expression in ph^{KD} clones using the marker TRE:RFP, which reveals overall JNK

activity (45). We found that all ph^{KD} clones express the TRE label, indicating overall JNK expression (Fig. 8 A and A'). Moreover, close examination reveals that the clones show two modes of JNK expression: 1) All clones exhibit uniform moderate TRE label covering the entire surface (Fig. 8A), and 2) many clones show additional TRE label located in the periphery, which is different from the observed inside (Fig. 8 B and B'); it is not uniform but punctate and more intense than in the rest of the clone. Double-labeling for TRE and Dcp1 indicates that the cells with punctate JNK expression are in apoptosis (Fig. 8B''). While the moderate and uniform JNK expression is a general feature of ph -deficient clones, the high and punctate expression appears to be a manifestation of cell competition.

The gain-of-function of JNK in regions where it is not normally active requires a specific induction mechanism; thus, we searched for possible inducers. Recent work (46, 47) has shown that in a cell-competition scenario, loser cells suffer proteotoxic stress, a situation that can be monitored by the production of ROS. Normally there is no ROS in the wing disc, but mutant clones for *mahjong* or *scrib* (48, 49) generate ROS. Besides, ROS are known to induce JNK activity (50), thus providing a mechanism for the up-regulation of JNK in the clones.

We examined the presence of ROS in ph^{KD} clones using the DHE marker and found they are labeled with DHE (Fig. 8 C and C'). Since we did not find ROS in entire ph^{KD} compartments even after irradiation (Fig. 4E'), their presence in the clones suggests that they suffer oxidative stress as a

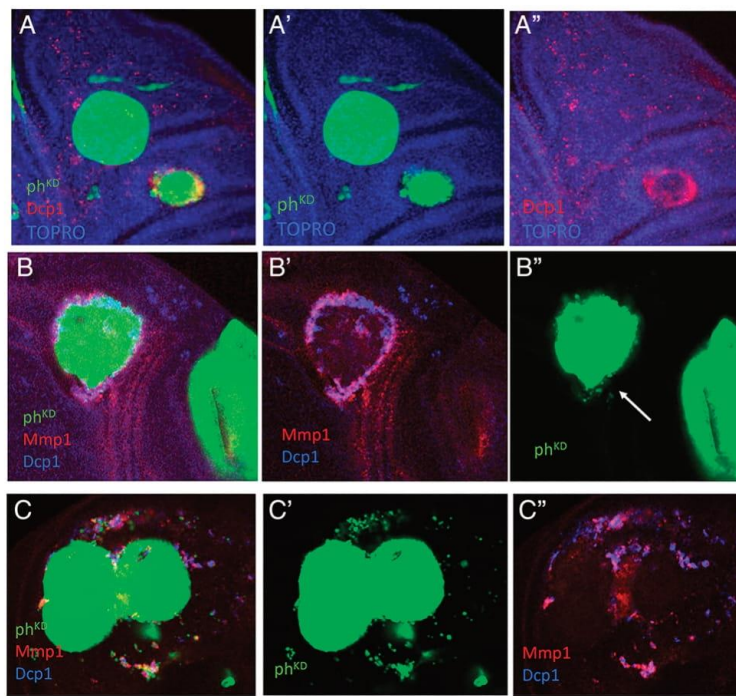


Fig. 7. Apoptosis in ph^{KD} mutant clones. (A–A'') Region of the disc containing two ph^{KD} clones labeled green with GFP and stained for the effector caspase Dcp1 (red). The bigger clone, with smooth border, shows no Dcp1, but the small one with wiggly border contains cells in the border that are in apoptosis, marked with Dcp1, a typical cell competition scenario. (B–B'') ph^{KD} clone labeled with the JNK marker Metalloprotease 1 (Mmp1, red) and Dcp1 (blue). In the periphery of the clone there is a ring of cells with Mmp1 and Dcp1 (B'), which in many cases retain the green fluorescence (B'' white arrow), indicating they are cells of the clone. The large clone to the right with smooth border shows no sign of apoptosis, (C–C'') ph^{KD} clone stained for Mmp1 and Dcp1. Note in C' that there are numerous ph^{KD} mutant cells outside the main patch. Many of these cells express both Mmp1 and Dcp1 (C''), indicating they are subject to cell competition. In contrast, the majority of the cells within the main patch appear free of apoptosis.

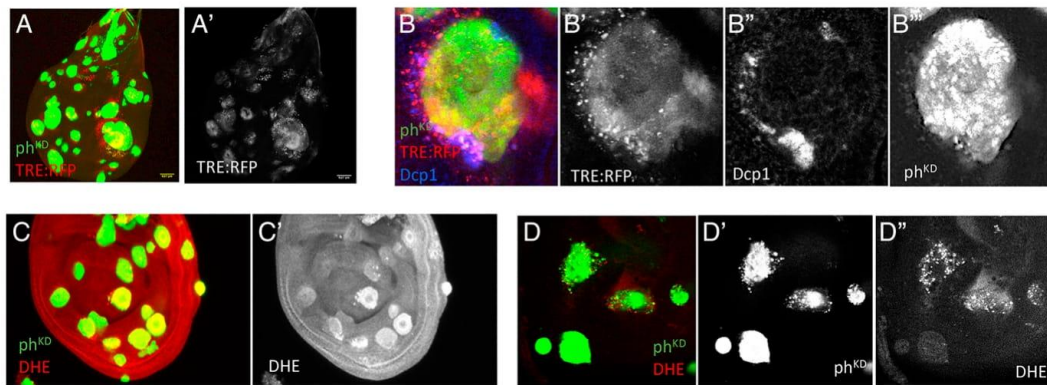


Fig. 8. JNK activity and oxidative stress in ph^{KD} clones. (A and A') disc containing numerous ph^{KD} clones stained for the JNK marker TRE:RFP, all of which contain JNK activity. (B–B''') ph^{KD} clone labeled for Dcp1, TRE:RFP, and GFP. Note in B' two tiers of TRE:RFP label: low, uniform expression in most of the clone, and high punctate expression in the border. As shown in B'', the areas of high TRE:RFP level correspond cells in apoptosis labeled with Dcp1. GFP staining in B''' extends to the entire clone but note the faint label in the border, probably pointing to dying ph^{KD} cells. (C and C') Fragment of a disc with numerous ph^{KD} GFP (green) clones stained with DHE, revealing oxidative stress in the clones. (D–D'') High magnification of a disc fragment with several ph^{KD} clones labeled with DHE and GFP. There is intense punctate DHE staining, preferentially in periphery of the clones on top. The two clones at the bottom left show low homogeneous nonpunctate DHE staining.

consequence of being in an unfit environment. In parallel to what we found for JNK, there are two modes of ROS distribution: a basal uniform label in most of the clones, and a mode where many clones contain dots with intense DHE, localized at the periphery (Fig. 8 D and D'). This latter result indicates that cells located in the border of the clones suffer especially intense oxidative stress.

Since ROS is able to activate JNK (50), the coincident expression of high DHE and TRE:RFP in the periphery of ph^{KD} clones strongly suggests that the cells at the border suffer oxidative stress, acquire high JNK activity, and become losers. Those cells follow the pathway established for loser cells elimination: 1) proteotoxic stress, 2) activation of JNK at apoptotic levels, and 3) death by effector caspases.

That JNK exerts a critical role in the elimination of ph^{KD} cells is clearly demonstrated in an experiment in which JNK is suppressed in those cells by forcing activity of a dominant-negative form of Basket, a serine/threonine-protein kinase that is a key

component of JNK pathway (51): $ph^{-} bsk^{DN}$ clones exhibit the typical ph mutant phenotype but apoptosis is prevented: of the total of 112 clones in 42 discs fixed 96 h after initiation, only 4 showed some individual ph^{KD} cells labeled with Dcp1.

In Discs Containing ph^{KD} Clones Cell Competition May Act in Opposite Directions. As shown above, ph^{KD} clones are subject to cell competition, although the amount of apoptosis is not generally sufficient to eliminate the entire clone. Surprisingly, we also found cases in which nonmutant ph^{+} cells in the proximity of ph^{KD} clones are in apoptosis (Fig. 9 A and A' and SI Appendix, Fig. S5): of a total of 270 clones, 55 (20%) had associated apoptosis in ph^{+} cells and contain ROS (Fig. 9 B–B''), indicating oxidative stress. It suggested that ph^{+} cells might also be subjected to cell competition.

To explore this possibility, we examined in detail the behavior of $ph^{KD} bsk^{DN}$ clones mentioned above. These clones cannot activate JNK (Materials and Methods), nor can they initiate

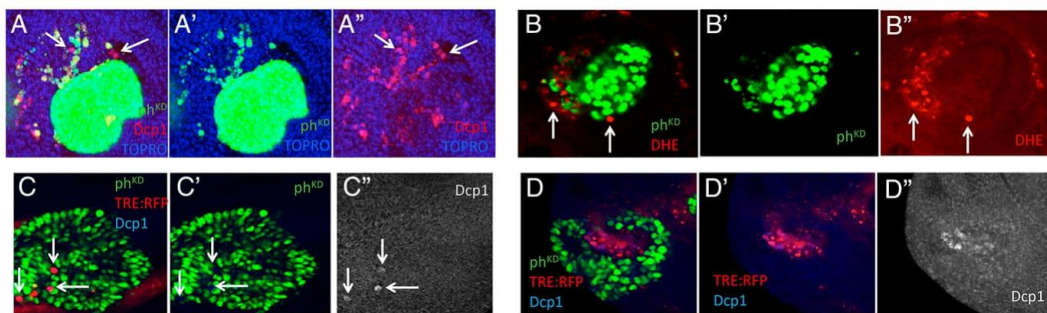


Fig. 9. In discs containing ph^{KD} clones cell competition may act in opposite ways. (A–A'') Clone of ph^{KD} cells in which some cells have moved away from the main patch. ph^{KD} cells are labeled with GFP and the disc has been stained in red for the effector caspase Dcp1. The majority of the cells with Dcp1 are ph^{KD} , indicating they are dying by apoptosis; but note that at least two nongreen (ph^{+}) cells (white arrows) are also in apoptosis. (B–B'') ph^{KD} clone (green) also stained with DHE (in red) to reveal ROS presence. Many ph^{KD} cells at the border show DHE; but note at least two ph^{+} cells (white arrows) that are also labeled with DHE. (C–C'') $ph^{KD} bsk^{DN}$ clone, deficient for JNK activity (see main text); the disc has been stained for GFP (green), TRE:RFP (red), and Dcp1 (blue). Several cells (white arrows) have been trapped inside the clone; they are not labeled with GFP but with TRE, indicating that they are ph^{+} . As shown in C'' those ph^{+} cells are in apoptosis. (D–D'') $ph^{KD} bsk^{DN}$ clone surrounding a group of ph^{+} cells, which gain JNK activity (D) and are in apoptosis (D'').

apoptosis. In a sample of 75 $ph^{KD} bsk^{DN}$ clones labeled with GFP, we found 35 cases in the proximity of which there were non-GFP cells that have gained JNK, indicating that they were ph^+ (Fig. 9 C–C' and D–D'). In 18 of these cases, the ph^+ cells were labeled with Dcp1. These ph^+ cells have become losers and undergo the standard cell competition pathway, just as the ph^{KD} cells.

These findings demonstrate that in a mixture of ph -deficient and ph^+ cells, cell competition may work in opposite directions, eliminating either mutant or nonmutant cells. This is an intriguing result, because it indicates that the outcome of the cell–cell interactions leading to cell competition does not depend strictly on the actual genotype of the cells but it is also influenced by local factors.

Discussion

We investigated the consequences of the lack of ph function in the *Drosophila* wing disc, either in large disc domains or in isolated clones. In what follows we discuss the more relevant observations.

The tumorigenic potential of ph mutant cells is restricted to the proximal wing region and is mediated by ectopic activation of the JNK and JAK/STAT pathways. We used the Gal4/UAS method to compromise ph function in specific regions of the disc. The principal conclusion is that the loss of ph activity has different effects in distinct parts of the wing disc. It causes large overgrowths in the proximal wing region (Fig. 2 E and E' and SI Appendix, Fig. S1 B–B' and D–D') but not in the notum and distal wing, which suffer a small decrease in size (Fig. 2 C' and G'). The localization of the overgrowths to the proximal wing region is a consequence of the differential response of JNK and JAK/STAT to the lack of ph function. In the case of JNK, the results obtained with $pnr > ph^{KD}$, $nub > ph^{KD}$, and $sal > ph^{KD}$ discs indicate that JNK is only up-regulated in the proximal wing region. Regarding JAK/STAT, the situation is different as it is normally expressed in the hinge region (Fig. 4 A–A') (32), but in absence of ph function its expression extends to cover a larger region of the proximal wing, including part of the Nubbin domain (Fig. 4 B–B' and C–D'). Neither JNK nor JAK/STAT become active in ph -defective tissue in the notum or the distal wing (Figs. 3 and 4). There is previous evidence (23, 25, 26) that both JNK and JAK/STAT contribute to the overgrowths of ph mutant tissue, which we have confirmed for JNK (SI Appendix, Fig. S2 C, E, and F). Their joint activity in ph -deficient tissue in the proximal wing explains the overgrowth of this region and also the preferential location of large ph^{KD} clones in that area (Fig. 7F).

In conclusion, our results indicate that the tumorigenic phenotype caused by the lack of ph function is not due to an increase of proliferation intrinsic to ph -deficient cells but is a consequence of the proliferative signaling generated by the JNK and JAK/STAT pathways in ph -deficient tissue.

It is of interest to note that although the tumorigenic phenotype of ph -deficient cells is restricted to the proximal wing, the normal function of ph appears to be required in the rest of the disc: in $sal > ph^{KD}$ discs there is ectopic activity of *Abd-B* in the center of the disc (SI Appendix, Fig. S4 A and A'), and ph^{KD} clones show ectopic *en* expression in the anterior notum (SI Appendix, Fig. S4 C and C'). It has been shown that a large number of genes become either up or down-regulated in ph mutant cells (42). Our results indicate that although there is a general requirement for ph function, there is a subset of ph targets—JNK, JAK/STAT, and their subsidiary genes—that are regulated positionally. As a consequence, the genetic reprogramming caused by the loss of ph , and by extension of the entire PRC1 complex, is influenced by positional factors.

Clones Deficient in ph Function Are Subject to Cell Competition but Can Form Tumors. Although many isolated ph -deficient clones survive, we find that they are targeted for cell competition, but the amount of apoptosis generated by cell competition is not sufficient to remove them. Of the ph^{KD} clones, 49% contain cells in apoptosis, generally located at the border of the clones, indicating interaction with ph^+ neighbors, a typical cell competition scenario. Moreover, the triggering of apoptosis follows the cell competition pathway: presence of ROS indicating oxidative stress, followed by JNK activation, and eventually cell death caused by effector caspases like Dcp1 (Fig. 7). In contrast, there is very little apoptosis in whole ph^{KD} compartments (Fig. 5 A and A' and SI Appendix, Fig. S3 A and A'), indicating that the apoptosis found in isolated ph^{KD} clones is caused by interactions with neighbor ph^+ cells.

We believe that there are at least two factors that allow ph^{KD} clones to survive cell competition. One factor derives from our finding that ph -deficient cells are refractory to X-ray-induced apoptosis (Fig. 5). Although X-ray-induced apoptosis could be different from that involved in cell competition, we note that irradiated ph -deficient cells fail to produce ROS (Fig. 5 E and E'), which is also associated with *mahjong* and *scrib* loser cells (48, 49), suggesting that the apoptosis program is the same. The resilience to apoptosis may contribute to the survival of isolated ph^{KD} clones.

A second factor derives from the fact that ph^{KD} cells acquire ectopic expression of developmental genes—like *en*, *ci*, *Ubx*, and *Abd-B* (SI Appendix, Fig. S4)—confirming previous reports (39–41). This causes a profound alteration of their original identity and as a consequence ph^{KD} clones tend to sort out (Fig. 6 A and B), a characteristic behavior of imaginal cells that have adhesion/affinity properties different from those of the surrounding tissue (52). The sorting out of ph^{KD} patches minimizes the contact with surrounding cells and is likely an impediment for cell competition, which requires that the interacting cells, winner and loser, must be very close or even in physical contact (53, 54). The proposal that distinct cell affinities prevent cell competition is also supported by the observation long time ago (53) that cell competition does not occur across compartment borders, even though anterior and posterior compartment cells abut along the A/P border.

Our results support the general role of cell competition as a tumor-suppressing process, but they also show that tumors can successfully confront cell competition if their cells possess features, such as resistance to apoptosis or inability to interact with surrounding nontumor tissue, that are able to counteract the cell death program dictated by cell competition.

In Discs Containing ph Clones Cell Competition May Act in Opposite Directions. One surprising finding of our experiments is that within the same disc the interactions between ph^{KD} and ph^+ cells may yield opposite results (Fig. 9 and SI Appendix, Fig. S5): ph^{KD} are more often the losers but ph^+ cells can also be eliminated by cell competition. These cells exhibit the features of loser cells: high levels of ROS, activation of JNK, and death by an effector caspase (Fig. 9). This result has implications on the understanding of cell competition as a context-dependent phenomenon. In the classic *Minute* or *myc*-induced cell competition (5, 6, 55, 56), viable cells with low *Minute* or *myc* activity become losers and are eliminated. It was understood that within a general environment of higher *Minute* or *myc* activity, all those cells would suffer the same fate.

Our findings with ph -deficient clones indicate that the outcome of cell competition is not solely dependent on the genotype of the interacting cells but is also affected by other factors, like the local microenvironment: distinct outcomes can be observed in ph^{KD} and ph^+ cells that are very close (Fig. 9 A and B), suggesting that becoming a winner or a loser might depend

on the particular physiological status of each interacting cell at that moment and its position. There also is the possibility that ph^+ cells might be reprogrammed to a ph^- state through induction from neighbor ph^{KD} cells, a kind of “community effect” (57), aiming to ensure a coherent developmental pattern. Cell interactions leading to genetic reprogramming have also been described in *Drosophila* during regeneration of the wing disc (58). In our experiments the reprogrammed ph^+ cells would subsequently be outcompeted by untransformed ph^+ neighbors. One might speculate that it could be a mechanism by which transforming ph^+ cells to losers, the ph^- tumors may be shielded from cell competition.

Materials and Methods

Drosophila Strains. In this study we made use of a number of *Drosophila* strains to analyze the effect of the loss of ph function in different regions of the wing disc, or in ph -deficient clones surrounded by ph^+ tissue. A list of the strains and descriptions of the methods to generate ph -deficient tissue are described in *SI Appendix*.

X-Ray Treatments. Larvae were administered a dose of 4,000 R, which corresponds to 100 kV/15 mA X-ray intensity during 8 min and 16 s at a distance of 18 cm in a Phillips-MG-102 device.

Immunostaining. Immunostaining methods were as previously described (33, 34) and are also detailed in *SI Appendix*.

EdU Incorporation Assay. EdU detection was performed according to the “Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit” (ThermoFisher Scientific). See details in *SI Appendix*.

DHE Staining. To detect ROS, we used the superoxide indicator DHE, which exhibits red nuclear fluorescence after being oxidized. The protocol was performed similar to that described in Beuchle et al. (39), with some modification.

Imaging and Quantitative Analysis. Third-instar larvae were imaged in a Leica MZ12 microscope connected to a Leica DFC490 digital camera. Wing imaginal discs were imaged using Leica DM5500 B and Zeiss LSM510 confocal microscopes. Images were processed using the ImageJ/Fiji software to generate Z-maximum intensity projections. See details in *SI Appendix*.

Data Availability. All study data are included in the article and *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Ernesto Sanchez-Herrero, Natalia Azpiazu, Noelia Pinal, and Gary Struhl for suggestions and comments. The experimental work has been supported by Grant PGC 2018-095151-B-I00 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, and Grant PIE 202020E255 from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

1. I. K. Hariharan, D. Bilder, Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 335–361 (2006).
2. G. Morata, M. Calleja, Cell competition and tumorigenesis in the imaginal discs of *Drosophila*. *Semin. Cancer Biol.* **63**, 19–26 (2020).
3. T. Vaccari, D. Bilder, At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: The use of *Drosophila* to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Mol. Oncol.* **3**, 354–365 (2009).
4. A. M. Deshpande et al., PHC3, a component of the hPRC-H complex, associates with E2F6 during G0 and is lost in osteosarcoma tumors. *Oncogene* **26**, 1714–1722 (2007).
5. G. Morata, P. Ripoll, Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211–221 (1975).
6. E. Moreno, K. Basler, G. Morata, Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* **416**, 755–759 (2002).
7. M. M. Merino et al., Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell* **160**, 461–476 (2015).
8. M. Oertel, A. Mentthena, M. D. Dabeva, D. A. Shafritz, Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **130**, 507–520, quiz 590 (2006).
9. C. Clavería, G. Giovinazzo, R. Sierra, M. Torres, Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* **500**, 39–44 (2013).
10. M. Sancho et al., Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Dev. Cell* **26**, 19–30 (2013).
11. S. J. Ellis et al., Distinct modes of cell competition shape mammalian tissue morphogenesis. *Nature* **569**, 497–502 (2019).
12. T. Igaki, J. C. Pastor-Pareja, H. Aonuma, M. Miura, T. Xu, Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* **16**, 458–465 (2009).
13. Y. Tamori et al., Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. *PLoS Biol.* **8**, e1000422 (2010).
14. J. Menéndez, A. Pérez-Garijo, M. Calleja, G. Morata, A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14651–14656 (2010).
15. M. Norman et al., Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **125**, 59–66 (2012).
16. V. C. Martins et al., Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature* **509**, 465–470 (2014).
17. S. Brown et al., Correction of aberrant growth preserves tissue homeostasis. *Nature* **548**, 334–337 (2017).
18. C. L. Chen, M. C. Schroeder, M. Kango-Singh, C. Tao, G. Halder, Tumor suppression by cell competition through regulation of the Hippo pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 484–489 (2012).
19. L. Ballesteros-Arias, V. Saavedra, G. Morata, Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in *Drosophila*. *Oncogene* **33**, 4377–4384 (2014).
20. A. M. Brumby, H. E. Richardson, scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* **22**, 5769–5779 (2003).
21. M. Wu, J. C. Pastor-Pareja, T. Xu, Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* **463**, 545–548 (2010).
22. M. Bienz, J. Müller, Transcriptional silencing of homeotic genes in *Drosophila*. *BioEssays* **17**, 775–784 (1995).
23. A.-K. Classen, B. D. Bunker, K. F. Harvey, T. Vaccari, D. Bilder, A tumor suppressor activity of *Drosophila* polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nat. Genet.* **41**, 1150–1155 (2009).
24. P. Gandille et al., Mutations in the polycomb group gene polyhomeotic lead to epithelial instability in both the ovary and wing imaginal disc in *Drosophila*. *PLoS One* **5**, e13946 (2010).
25. S. Feng, J. Huang, J. Wang, Loss of the Polycomb group gene polyhomeotic induces non-autonomous cell overproliferation. *EMBO Rep.* **12**, 157–163 (2011).
26. J. V. Beira, J. Torres, R. Paro, Signalling crosstalk during early tumorigenesis in the absence of Polycomb silencing. *PLoS Genet.* **14**, e1007187 (2018).
27. A.-M. Martínez et al., Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat. Genet.* **41**, 1076–1082 (2009).
28. J. Deatrick, M. Daly, N. B. Randsholt, H. W. Brock, The complex genetic locus polyhomeotic in *Drosophila melanogaster* potentially encodes two homologous zinc-finger proteins. *Gene* **105**, 185–195 (1991).
29. M. Calleja et al., Generation of medial and lateral dorsal body domains by the panier gene of *Drosophila*. *Development* **127**, 3971–3980 (2000).
30. M. Calleja, E. Moreno, S. Pelaz, G. Morata, Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252–255 (1996).
31. J. F. de Celis, R. Barrio, Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1385–1398 (2009).
32. A. Ayala-Camargo et al., JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc. *Dev. Biol.* **382**, 413–426 (2013).
33. E. Shlevkov, G. Morata, A dp53/JNK-dependent feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **19**, 451–460 (2012).
34. N. Pinal, M. Martín, I. Medina, G. Morata, Short-term activation of the Jun-N terminal kinase pathway in apoptosis-deficient cells of *Drosophila* induces tumorigenesis. *Nat. Comm.* **9**, 1541 (2018).
35. K. Lee et al., Expression of Bmi-1 in epidermis enhances cell survival by altering cell cycle regulatory protein expression and inhibiting apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 9–17 (2008).
36. J. P. Madigan, H. L. Chotkowski, R. L. Glaser, DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3698–3705 (2002).
37. L. Murcia et al., Selective killing of RAS-malignant tissues by exploiting oncogene-induced DNA damage. *Cell Rep.* **28**, 119–131.e4 (2019).
38. E. Owusu-Ansah, A. Yavari, U. Banerjee, A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. 10.1038/nprot.2008.23. Accessed 12 October 2021.
39. D. Beuchle, G. Struhl, J. Müller, Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* **128**, 993–1004 (2001).
40. K. Oktaba et al., Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in *Drosophila*. *Dev. Cell* **15**, 877–889 (2008).
41. N. B. Randsholt, F. Maschat, P. Santamaria, polyhomeotic controls engrailed expression and the hedgehog signaling pathway in imaginal discs. *Mech. Dev.* **95**, 89–99 (2000).
42. J. Torres et al., A switch in transcription and cell fate governs the onset of an epigenetically-deregulated tumor in *Drosophila*. *eLife* **7**, e32697 (2018).
43. H. D. Ryoo, T. Gorenc, H. Steller, Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev. Cell* **7**, 491–501 (2004).

44. A. Pérez-Garijo, F. A. Martín, G. Morata, Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591–5598 (2004).
45. N. Chatterjee, D. Bohmann, A versatile ψ C31 based reporter system for measuring AP-1 and NRF2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS One* **7**, e34063 (2012).
46. M. E. Baumgartner, M. P. Dinan, P. F. Langton, I. Kucinski, E. Piddini, Proteotoxic stress is a driver of the loser status and cell competition. *Nat. Cell Biol.* **23**, 136–146 (2021).
47. C. Recasens-Alvarez et al., Ribosomopathy-associated mutations cause proteotoxic stress that is alleviated by TOR inhibition. *Nat. Cell Biol.* **23**, 127–135 (2021).
48. I. Kucinski, M. Dinan, G. Kollahgar, E. Piddini, Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signalling causes the loser cell status. *Nat. Commun.* **8**, 136 (2017).
49. N. Pinal, M. Calleja, G. Morata, Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: Roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open Biol.* **9**, 180256.
50. P. Santabàrbara-Ruiz et al., ROS-Induced JNK and p38 signaling is required for unpaired cytokine activation during *Drosophila* regeneration. *PLoS Genet.* **11**, e1005595 (2015).
51. J. R. Riesgo-Escovar, E. Hafen, Common and distinct roles of Dfos and DJun during *Drosophila* development. *Science* **278**, 669–672 (1997).
52. A. Garcia-Bellido, Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **14**, 278–306 (1966).
53. P. Simpson, G. Morata, Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **85**, 299–308 (1981).
54. R. Levayer, B. Hauert, E. Moreno, Cell mixing induced by myc is required for competitive tissue invasion and destruction. *Nature* **524**, 476–480 (2015).
55. C. de la Cova, M. Abril, P. Bellosta, P. Gallant, L. A. Johnston, *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107–116 (2004).
56. E. Moreno, K. Basler, dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117–129 (2004).
57. J. B. Gurdon, A community effect in animal development. *Nature* **336**, 772–774 (1988).
58. S. Herrera, G. Morata., Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*. *eLife* **3**, e01831 (2014).

Supplementary Information Medina, Calleja and Morata MS 2021-10062R

Material and Methods

Drosophila strains.

The Gal4 lines used in this study were: *esg-Gal4* (1), *hh-Gal4* (a gift from T. Tabata, IMBC, Tokyo, Japan), *ci-Gal4* (3), *41D11-Gal4* (2), *nub-Gal4*, *248-Gal4* and *pnr-Gal4* (3), *sal^{EPV}-Gal4* (4).

UAS lines: UAS-phRNAi (Vienna Drosophila Resource Center, VDRC #50027, referred to in the text as *UAS-ph^{KD}*), *UAS-GFP* (Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC), *UAS-lacZ* (BDSC), *UAS-Bsk^{DN}* (BDSC). As reporter line for JNK we used *TRE:RFP* (5).

For clonal analysis we used *act>y⁺STOP>Gal4*, *UASGFP* (BDSC), *act>CD2,STOP>Gal4* *UASRFP* (BDSC), *ph⁵⁰⁵*, *FRT19A* and *hs-flp122*, *H2Av-GFP,FRT19A* (BDSC) lines.

Generating wing regions and clones deficient in ph function

The Gal4/UAS system was used to induce the expression of the *UAS-ph^{KD}* construct, which is very effective in suppressing *ph* function (6). The effect at 29°C is greater; therefore in many experiments embryos were collected at 25°C and then shifted to 29°C for the rest of larval development. Wing discs from wandering larvae were fixed. This system was used in the *pnr>ph^{KD}*, *nub>ph^{KD}*, *sal^{EPV}>ph^{KD}*, *41D11>ph^{KD}* and *248>ph^{KD}* experiments. For the *esg>ph^{KD}*, *hh>ph^{KD}* and *ci>ph^{KD}* experiments we controlled the expression of *ph^{KD}* with the thermo-sensitive Gal80 suppressor (*tubGal80^{TS}*, 7), which is active at 17°C but degraded at 29°C. Larvae of those genotypes were allowed to grow at 17°C until day 4 after egg laying and then shifted to 29°C to inactivate *ph* function. Those larvae become giant and fail to pupate but the imaginal discs develop very large overgrowths.

In most experiments we used the flip-out system (8) to induce clones deficient in *ph* function: larvae of genotype *ywhs-flp122; act>y⁺, STOP>Gal4,UASGFP; UAS-ph^{KD}* were reared at 25°C, except that they were given a heat shock at 37°C for 8 minutes 48-72 hours after egg laying. Larvae were fixed at least 3-4 days after clone induction. *ph^{KD}* were marked with GFP. In some experiments we induced homozygous *ph⁵⁰⁵* clones: *hs-flp122, ph⁵⁰⁵,FRT19A/H2Av-GFP,FRT19A* larvae were given a 30 min heat shock. *ph⁵⁰⁵* clones were marked by the loss of GFP and the twins by double GFP.

X-ray treatment

Larvae were administered a dose of 4000 Rads, which corresponds to 100kV/15mA X-ray intensity during 8 minutes and 16 seconds at a distance of 18cm in a Phillips-MG-102 device. This treatment was given to *hh>ph^{KD}* and *ci>ph^{KD}* larvae 3 days after the temperature shift from 17°C to 29°C and were fixed 24 hours after X-rays.

Immunostaining

Third instar larvae were dissected in ice-cold PBS 1X and fixed in a paraformaldehyde solution (4% in PBS 1X) with 0.1% Triton X-100 and 0.1% DOC for 1 hour at room temperature. Discs were then washed in washing buffer (PBS 1X, 0.3% Triton X-100 and 1% BSA) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Washes were then performed and discs were incubated for 2 hours at room temperature with the

adequate secondary antibodies. Following further washes discs were mounted in Vectashield (Vector Laboratories). The primary antibodies used in this protocol were: rabbit anti-GFP (1:300, Invitrogen), rabbit anti-Dcp1 (1:200, Cell Signaling Technology), rabbit anti-PH3 (1:100, Millipore), rat anti-Ci (1:50, Hybridoma Bank), mouse anti-pH2AV (1:50, Hybridoma Bank), mouse anti-AbdB (1:20, Hybridoma Bank), mouse anti-Ubx (1:20, (9), mouse anti-En (1:20, Hybridoma Bank) and mouse anti-Mmp1 (1:50, Hybridoma Bank).

Fluorescent labeled secondary antibodies (ThermoFisher Scientific) were used at 1:200 dilution. We also used an anti-rabbit biotinylated antibody (1:200, Amersham) and Alexa Fluor 647-conjugated Streptavidin (1:200, Jackson ImmunoResearch) to amplify the blue channel signal. phalloidin (1:200, Sigma Aldrich) was used to stain F-actin and to label nuclei we used TOPRO (1:500, ThermoFisher Scientific).

EdU incorporation assay

EdU detection was performed according to the “Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit” (ThermoFisher Scientific). Third instar larvae were dissected in ice-cold PBS 1X and cultured with 1ml of EdU labeling solution for 15 minutes at room temperature. They were washed once with PBS 1X and then fixed in a paraformaldehyde solution (4% in PBS 1X) with 0.1% Triton X-100 and 0.1% DOC for 1 hour at room temperature. Discs were then washed in washing buffer and incubated overnight at 4°C with rabbit anti-GFP antibody (1:300, Invitrogen) to protect GFP fluorescence. After further washing EdU detection was performed according to the manufacturer instructions. Antibody labelling of the samples was carried out following the immunostaining procedure described above.

DHE staining

To detect ROS we used the superoxide indicator dihydroethidium (DHE), which exhibits red nuclear fluorescence after oxidized. The protocol was performed similar as described in (39), with some modifications. Third instar larvae were dissected in ice-cold PBS 1X and cultured with 30µM DHE (D1168, ThermoFisher Scientific) for 5 minutes at room temperature and dark conditions. 3 washes (5 minutes each) were performed with PBS 1X and discs were mounted in Vectashield.

Imaging and quantitative analysis

Third instar larvae were imaged in a Leica MZ12 microscope connected to a Leica DFC490 digital camera. Wing imaginal discs were imaged using Leica DM5500 B and Zeiss LSM510 confocal microscopes.

Images were processed using the ImageJ/Fiji software to generate Z-maximum intensity projections. To quantify the percentage occupied by GFP-labelled regions, their areas and the total area of the discs (using the TOPRO channel) were measured. To calculate this percentage in the case of the nubbin domain, we used volumes instead of areas, by using a macro sequence that provided us with voxel values. We also measured the percentage occupied by Dcp1 signal in the anterior and posterior compartment, adjusting a “Threshold” to ignore noise.

The number of discs analyzed in each experiment is given in the figure legends. Histograms represent the corresponding mean value and error bars the standard deviation. To compare means between two experimental groups the statistical Mann-

Whitney U test was used. Significance level is indicated by the following code (*=significant at $P < 0.05$, **=significant at $P < 0.01$, ***=significant at $P < 0.001$, ****=significant at $P < 0.0001$, ns=non-significant at $P > 0.05$). The statistical analysis was done with the program Prism 6 (Graphpad).

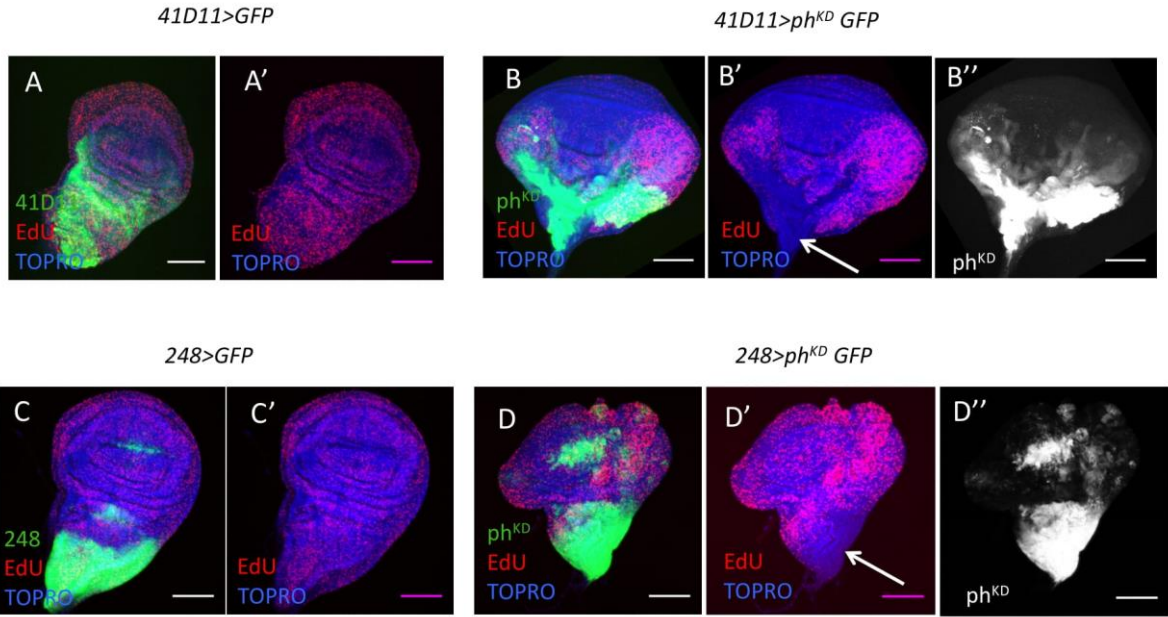
References to the Material and Methods in SI Appendix

- 1 S. Goto, S. Hayashi, Proximal to distal cell communication in the *Drosophila* leg provides a basis for an intercalary mechanism of limb patterning. *Development* **126**, 3407–3413 (1999).
- 2 S. Herrera, G. Morata., Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*. eLife 2014;3:e01831 doi: 10.7554/eLife. 01831 (2014)
- 3 J. A. Croker, S. L. Ziegenhorn, R. A. Holmgren, Regulation of the *Drosophila* transcription factor, *Cubitus interruptus*, by two conserved domains. *Developmental Biology* **291**, 368–381 (2006).
- 4 C. Cruz, A. Glavic, M. Casado, J. F. De Celis, A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* **183**, 1005–1026 (2009).
- 5 E. Owusu-Ansah, A. Yavari, U. Banerjee, A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange* (2008) <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.23>.
- 6 P. Gandille, *et al.*, Mutations in the polycomb group gene polyhomeotic lead to epithelial instability in both the ovary and wing imaginal disc in *Drosophila*. *PLoS One* **5**, e13946 (2010).
- 7 S. E. McGuire, P. T. Le, A. J. Osborn, K. Matsumoto, R. L. Davis, Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1765–8 (2003).
- 8 G. Struhl, K. Basler, Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527–540 (1993).
- 9 R. A. H. White, M. Wilcox, Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**, 163–171 (1984).

Supplementary Figures

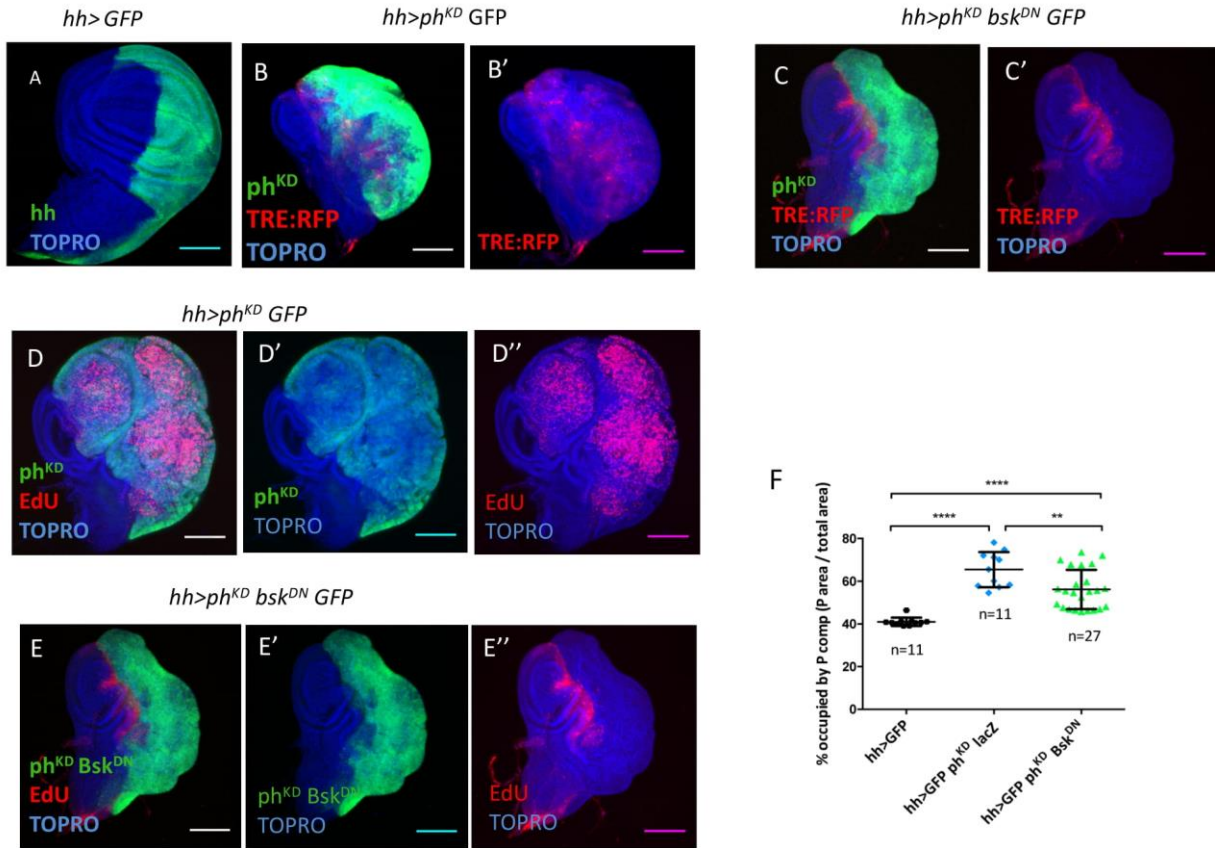
Supplementary Figures



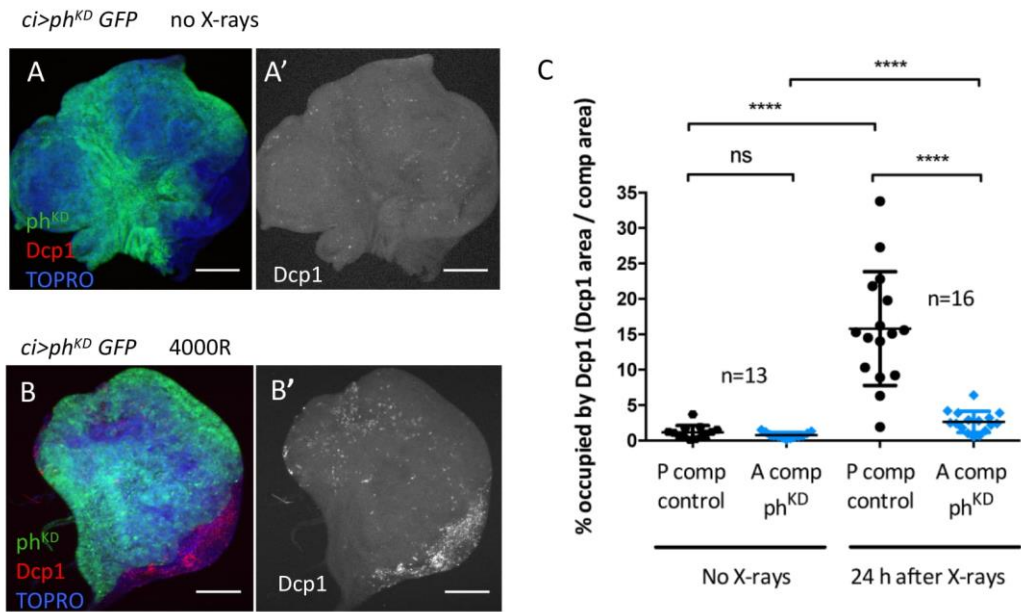


Suppl. Figure 1

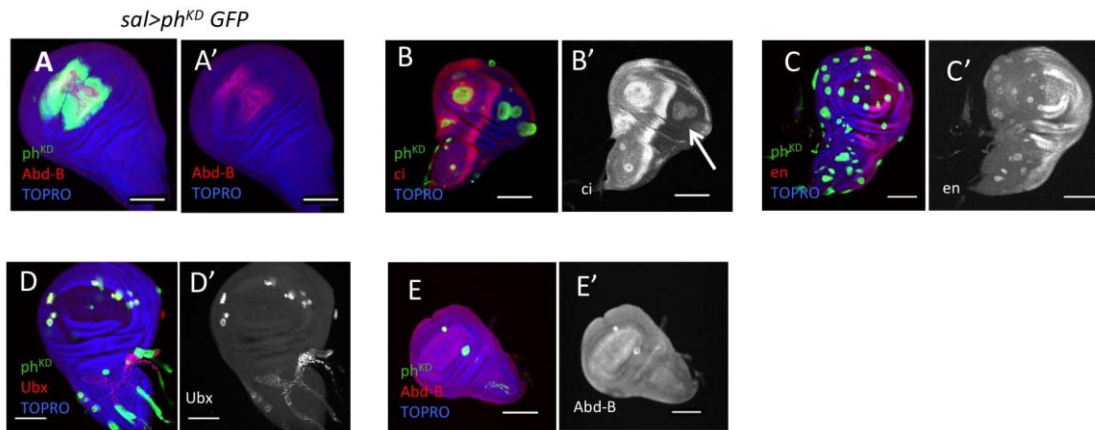
Anexo: Publicaciones



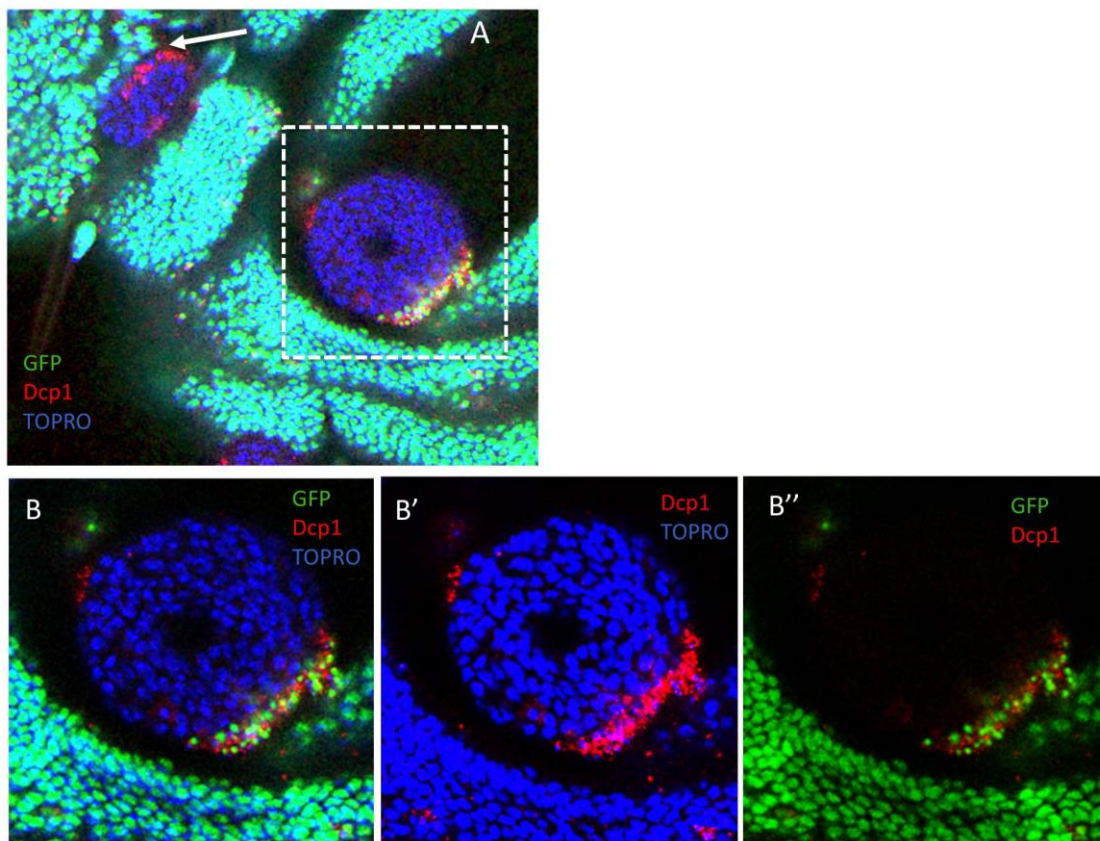
Suppl. Figure 2



Suppl. Figure 3



Suppl. Figure 4



Suppl. Figure 5

Legends to Supplemental Figures

Suppl. Figure 1

Distinct effects of the loss of *polyhomeotic* function on cell proliferation in the notum and wing.

A-A') The 41D11 Gal4 line drives expression in the notum and in the hinge area. In 41D11>GFP discs there is uniform EdU incorporation (A'), as in a normal disc. B-B') In 41D11>*ph^{KD}* GFP discs there is an increase of cell proliferation in the proximal wing area but little in the notum region (B' white arrow), even though there is strong expression of *ph^{KD}* in the notum (B''). C-C') Expression of the Gal4 line 248 in the wing disc. The main expression domain is in the notum but it is also expressed in the hinge area and in the wing pouch (C). It does not alter the normal uniform cell proliferation of the disc (C, EdU). D-D') in 248>*ph^{KD}* GFP there is increased proliferation in the wing but not in the notum (D' white arrow), in spite that the 248 line is strongly expressed in the notum (D''). Scale bars 100 μ m

Suppl. Figure 2.

Suppression of JNK in *ph^{KD}* compartments reduces the overgrowth caused by the suppression of *ph* function.

A) control *hh>GFP* disc in which the posterior compartment is labeled green with GFP, B-B') *hh>ph^{KD} GFP* disc illustrating the size increase of the posterior *ph^{KD}* compartment (B) and the expression of JNK, labeled red with the TRE:RFP construct. C-C') disc of genotype *hh>ph^{KD} bsk^{DN} GFP*, showing the suppression of JNK activity in the posterior compartment. The TRE label seen in the disc corresponds to ectopic activation in the anterior compartment. D-D') disc of genotype *hh>ph^{KD} GFP* showing the enlargement of the posterior *ph^{KD}* compartment (D') and the high levels of EdU incorporation, labelled red (D''). E-E') disc of genotype *hh>ph^{KD} bsk^{DN} GFP* disc in which the *ph*-labelled cells cannot activate the JNK pathway; there is a significant diminution of EdU incorporation (compare E'' with D'') and in the size of the posterior compartment. F) Comparison of the size between a normal posterior compartment (*hh>GFP*, black), a compartment in which *ph* is suppressed (*hh>ph^{KD} GFP*, blue) and a compartment lacking activity of both *ph* and JNK (*hh>ph^{KD} bsk^{DN} GFP*, green). Note that although there is a significant size reduction in *hh>ph^{KD} bsk^{DN} GFP* discs with respect to *hh>ph^{KD} GFP*, it is still larger than the control *hh>GFP*, indicating that JNK is not the only factor involved in the overgrowth of the posterior compartment of *hh>ph^{KD} GFP* discs. Scale bars 100 μ m

Suppl. Figure 3

Apoptotic response to irradiation (4000R) of a *ci>ph^{KD} GFP* disc.

A-A') a non-irradiated disc shows very little apoptosis, as indicated by the lack of effector caspase Dcp1 (white) either in the anterior (Green) or in the posterior compartment. B-B') Irradiated *ci>ph^{KD} GFP* disc showing intense apoptosis in the

posterior compartment (B'), which contains normal *ph* function, whereas there is no significant increase in the anterior *ph^{KD}* compartment where *ph* function is suppressed. C) Graph showing quantification of the results illustrated in the A and B panels. Scale bars 100 μ m

Suppl. Figure 4.

Several examples of ectopic expression of developmental genes in *ph*-deficient tissue.

A-A') *sal>ph^{KD} GFP* disc stained for *Abd-B*, which is not normally expressed in the wing disc, but in this genotype it is expressed in the Sal domain. B-B') *ph^{KD} GFP* clones in the A and P compartments. The clones in the P compartment gain *ci* activity (arrow), C-C') disc containing numerous *ph^{KD} GFP* clones stained with the anti-engrailed antibody. Those in the A compartment exhibit ectopic *en* expression, D-D') disc containing several *ph^{KD} GFP* clones showing ectopic *Ubx* expression. E-E') Two *ph^{KD} GFP* clones ectopically expressing *Abd-B*. Scale bars 100 μ m

Suppl. Figure 5. In a mixture of *ph⁻* and *ph⁺* cells, cell competition may eliminate *ph⁻* and *ph⁺* cells

A) Part of a disc of genotype *hs-flp122, ph⁵⁰⁵, FRT19A/H2Av-GFP, FRT19A*. Mitotic recombination in the first chromosome generates clones homozygous for *ph⁵⁰⁵* that are labeled by the loss of GFP. The presence of cells in apoptosis is monitored by the Dcp1 marker, in red, and the nuclei labeled blue with TOPRO. Note the presence to two *ph⁵⁰⁵* clones, one indicated by the white arrow and the second included in the white rectangle. The first one contains some *ph⁵⁰⁵* cells in apoptosis at the border, but in the second the apoptosis affects GFP cells, indicating that they are *ph⁺*. This clone is amplified in B-B'') to illustrate that apoptosis at the border of the clone (B'), and that it affects *ph⁺* cells located there (B''). Those cells show the typical nuclear fragmentation of cells dying by apoptosis.