

**Función del gen *shifted* en la vía de
señalización de Hedgehog en
Drosophila melanogaster.**

**Memoria presentada por Javier Sierra Istúriz para
optar al grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid.**

Marzo de 2007

Directora de la Tesis: Isabel Guerrero Vega

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	6
Organizadores y morfógenos	7
Organizadores y morfógenos en <i>Drosophila</i>	9
Modo de actuación del morfógeno	11
Movimiento del morfógeno	12
Difusión restringida	12
Transcitosis planar	13
Citonemas	14
Argosomas	15
Modulación del gradiente	15
Interpretación del gradiente	16
La vía de señalización de Hh	18
Hh como morfógeno	19
Hh y la especificación del patrón segmental embrionario de <i>Drosophila</i>	19
Hh y la especificación del patrón en el ala de <i>Drosophila</i>	20
Hh y la especificación del patrón D/V del tubo neural de vertebrados	21
Hh y la actividad polarizante de la ZPA	22
Mecanismos moleculares de la señalización por Hh	22
Producción y secreción	23
Transporte	25
Modulación del gradiente de Hh	26
Recepción y transducción de la señal	28
Los Heparán Sulfato Proteoglicanos (HSPGs) en la vía de Hh	32
OBJETIVOS	36
RESULTADOS	38
El locus <i>shifted</i> (<i>shf</i>) y la vía de Hh	39
Caracterización molecular del locus <i>shf</i>	40
Localización genómica del locus <i>shf</i>	40
<i>Shf</i> codifica una proteína ortóloga a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor-1) de vertebrados	41
Caracterización molecular de los alelos mutantes para <i>shf</i>	42
RNA de interferencia del gen <i>shf</i>	43
Patrón de expresión del gen <i>shf</i>	44
DmWIF es un factor difusible	45
Función de DmWIF en la vía de Hedgehog	46
<i>Patched</i> es epistático respecto a <i>shifted</i>	46
Interacción entre DmWIF y Hedgehog	47
DmWIF se requiere para la difusión de Hh	49
DmWIF sólo regula la difusión de Hh modificado por lípidos	51
DmWIF no interviene en la difusión de Hh en el embrión	52
Interacción entre DmWIF y los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs)	52
DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs	53
Los HSPGs modulan los niveles de DmWIF	53
DmWIF colocaliza con los glicanos	54
La sobreexpresión de Dly, pero no de Dally, rescata parcialmente la señalización de Hh en discos mutantes <i>shf</i>	54

Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala	55
Papel de DmWIF en la vía de Wg/Wnt	56
Análisis funcional de los dominios de DmWIF y de HWIF-1	57
DISCUSIÓN	59
Papel de DmWIF en la vía de señalización de Hh	60
DmWIF es un nuevo componente de la vía de Hh y se requiere para la difusión del morfógeno	60
DmWIF modula la difusión de Hh modificado por lípidos	62
DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs en la matriz extracelular	64
Divergencia evolutiva de las proteínas DmWIF y HWIF-1.	67
Asociación de las proteínas WIF a patologías humanas	70
CONCLUSIONES	72
MATERIALES Y MÉTODOS	74
Estirpes de moscas	75
Inserciones de elementos P	75
Inducción de clones de falta de función	75
Expresión ectópica de genes	77
Inducción de clones de expresión ectópica	78
Inmunohistoquímica de los discos imaginales	78
Microscopía	79
Hibridación “in situ”	79
RNA de interferencia	80
Ensayos de Inmunoprecipitación	81
RT-PCR cuantitativa	81
SOE-PCR	82
Programas informáticos y bases de datos	83
BIBLIOGRAFÍA	85
FIGURAS	101

SUMMARY

The Hedgehog (Hh) family of morphogenetic proteins has important instructional roles in metazoan development and human diseases. Lipid modified Hh is able to migrate to and program cells far away from its site of production, despite being associated with membranes. It has been described that the extracellular matrix molecules, heparan sulphate proteoglycans (HSPG) are required for the diffusion of lipid modified Hedgehog.

To investigate the Hh spreading mechanism, we characterized *shifted* (*shf*) as a new component in the *Drosophila* Hh pathway. We show that *shf* codifies the ortholog of the human Wnt inhibitory factor (WIF), a secreted antagonist of the Wg pathway; we called *shf* product, DmWIF. Lack of function *shf* mutants show reduced Hedgehog signalling and spreading, suggesting that DmWIF is required for Hh stability and for lipid-modified Hh diffusion. Hh reciprocally stabilizes DmWIF in the extracellular space. DmWIF co-localizes with Hh in the extracellular matrix and interacts with the HSPGs, leading us to suggest that DmWIF could provide HSPG specificity for Hh.

We also show that human WIF inhibits Wg signaling in *Drosophila* without affecting the Hh pathway, indicating that different WIF family members might have divergent functions in each pathway. In order to identify the structure responsible for these divergent roles in such conserved proteins, we made chimaeric proteins in which WIF and EGF domains were exchanged between HWIF-1 and DmWIF. Our results suggest that the conserved WIF domain is the functional structure responsible for ligand specificity.

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo es la disciplina que estudia cómo un óvulo fecundado da lugar a un individuo adulto. El desarrollo de un cigoto implica tres procesos: diferenciación celular, morfogénesis y crecimiento. Diferenciación, en tanto que a partir de una célula se genera un organismo con cientos de tipos celulares diferentes, pero con la misma dotación genética. Morfogénesis, puesto que las células diferenciadas no se distribuyen al azar sino que se organizan espacialmente para formar estructuras de tamaño y forma definidas. Crecimiento, ya que se necesita la proliferación celular, pero regulada y coordinada con el resto de estructuras del organismo.

Estos procesos están, en gran medida, determinados genéticamente y muchos de sus interrogantes se han descifrado gracias a los estudios realizados en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* es un organismo modelo conveniente para el estudio del desarrollo por varias razones: tiene un ciclo de vida corto en el que produce elevada descendencia, es fácil de mantener, el conocimiento de su genética está muy avanzado, incluida la secuenciación de su genoma y la mayoría de los genes claves para su morfogénesis están conservados evolutivamente.

La complejidad de los procesos indicados requiere una comunicación intercelular. Esta comunicación se realiza a través de moléculas señalizadoras y la familia de proteínas Hedgehog pertenece a este tipo de moléculas. Su importancia se pone de manifiesto al ser una vía de señalización conservada a lo largo de la evolución e intervenir en el desarrollo de diversos órganos y tejidos, así como en la generación y mantenimiento de nichos de células madre en el adulto.

La alteración de la vía de señalización de Hh está vinculada a varios tipos de cáncer. Consideramos, por tanto, que el avance y la profundización en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta vía, que es el objeto de esta Tesis Doctoral, no sólo contribuirá a completar el modelo vigente de desarrollo de un organismo, sino que servirá para identificar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de patologías humanas.

Organizadores y morfógenos

En el transcurso de la evolución, los seres vivos han adquirido niveles de

organización progresivamente más complejos, pasando de estar compuestos por una única célula a formar organismos constituidos por poblaciones de células diferenciadas, que se estructuran en tejidos, órganos y sistemas (Needham, 1937). En un organismo pluricelular, la distribución de las células se determina a lo largo del desarrollo embrionario para conseguir la funcionalidad de las estructuras que lo componen y la viabilidad del individuo.

Experimentos de trasplantes de tejidos en embriones de anfibios (Spemann, 1924) revelaron la existencia de grupos de células con capacidad para dirigir el desarrollo de células adyacentes: si se transplantaba el labio dorsal del blastoporo de un embrión a otro, en el embrión hospedador se formaba un segundo eje antero-posterior, constituido por el tubo neural y la notocorda subyacente, flanqueada por dos hileras de somitos. Spemann acuñó el término “organizador” para destacar la capacidad del labio dorsal del blastoporo de dirigir el desarrollo del tejido hospedador y proporcionar a estas células una estructura organizada (Spemann, 1924) (figura 1).

Posteriormente, se realizaron experimentos similares en el embrión de pollo (Saunders, 1968). El desarrollo del ala del pollo comienza por un primordio que sale del tronco del embrión y crece siguiendo un eje próximo-distal, perpendicular al eje principal del cuerpo. Cuando se transplanta un fragmento de la región posterior del primordio de ala de un individuo a la región anterior del primordio de ala de otro, se obtiene como resultado la duplicación de los dígitos en imagen especular con respecto al eje antero-posterior de la extremidad. A esa región “organizadora” del primordio se la denominó zona de actividad polarizante (ZPA) (Saunders, 1968) (figura 1).

El paradigma vigente que explica la generación del patrón morfogenético durante el desarrollo es el modelo de la información posicional (Wolpert, 1969). Según este modelo, las células adquieren un valor posicional respecto a bordes de afinidad celular: es decir, la célula interpreta su localización en el tejido, en los ejes antero-posterior, dorso-ventral y próximo-distal, respecto a un referente que es el límite de otra población de células y adopta un destino concreto en función de esa localización. En términos biológicos, el valor posicional se adquiere a través de la interpretación del gradiente de concentración de una molécula difusible, denominada morfógeno. Una vez establecido el valor posicional, la célula tomará un camino de diferenciación en función de su competencia para responder a la señal (Wolpert, 1989). En palabras del autor: *“Cells acquire a positional value with respect to boundaries and then interpret this in terms of a programme determined by their genetic constitution...cells can respond to*

quite small differences in the concentrations of molecules whose concentration could provide positional information” (Wolpert, 1996).

Un morfógeno es una molécula señalizadora, difusible, que forma un gradiente de concentración desde la fuente, al que las células diana responden diferencialmente en función del nivel de señal que reciben. Esta respuesta celular se traduce en la expresión diferencial de genes diana, en distintos grupos celulares, en función de su disposición en el gradiente. Así, se denominan dianas de altos niveles o de bajos niveles las que se expresan como respuesta a altos o bajos niveles del morfógeno, respectivamente (Wolpert, 1969). Los modelos teóricos postulan la necesidad de una fuente y un sumidero para el morfógeno. La fuente del morfógeno es una población celular concreta y restringida, a la que se define como organizador morfogenético. El sumidero son los mecanismos de degradación del morfógeno, necesarios para modular el gradiente (revisado en Tabata y Takei, 2004; Wolpert, 1969) (figura 2).

Organizadores y morfógenos en *Drosophila*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, cuyo ciclo vital se divide en cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto o imago. Durante la embriogénesis (0-24h después de la puesta) el cigoto pasa de ser una célula única y grande a una larva móvil. La larva pasa por tres estadios, separados por sus respectivas mudas y durante esta etapa crece en tamaño y acumula nutrientes. Aproximadamente 120h después de la puesta la larva deja de alimentarse y tiene lugar la pupación, formándose el pupario a partir de la expansión y endurecimiento de la cutícula larvaria. Durante el estadio de pupa ocurre la metamorfosis, que dura cuatro días, degenerando los tejidos larvarios y formándose el tejido adulto. Las estructuras cuticulares adultas – cabeza, torax, alas, patas, genitalia, analia – se forman a partir de grupos celulares precursores, determinados en la embriogénesis, denominados discos imaginales. En la larva hay nueve pares de discos imaginales más un disco genital, que crecen desde decenas a decenas de miles de células durante el periodo larvario. Diez días después de la puesta eclosiona del pupario un individuo adulto (Ashburner, 1989; Lawrence, 1992) (figura 3).

El disco imaginal de ala es la estructura que se utilizó para formular la teoría de los compartimentos (Garcia-Bellido et al., 1973): un compartimento es una población de células que comparten unas características de afinidad (adhesión celular), de tal manera que excluyen a células de poblaciones diferentes. Así, entre dos compartimentos adyacentes se genera un borde que no puede ser cruzado por células de una u otra población: este fenómeno se denomina restricción de linaje. La constitución de un compartimento está determinada genéticamente: un grupo de células fundadoras de una población adquiere la identidad específica de compartimento mediante la expresión de los denominados genes selectores. La expresión o la ausencia de expresión del gen selector resulta en la especificación de dos tipos celulares distintos y en la constitución de un borde de restricción de linaje (Garcia-Bellido, 1975; Lawrence y Morata, 1976; Morata y Lawrence, 1975). La importancia funcional del borde de compartimento radica en que las células que lo componen constituyen el organizador morfogenético. Las células de un compartimento mandan una señal de corto alcance, que sólo es recibida por las células más próximas del compartimento adyacente. Esta señal induce la secreción del morfógeno por parte de las células del borde, constituyendo el organizador morfogenético, el cual mantiene la integridad espacial gracias a la restricción de linaje (Dahmann and Basler, 1999)(Blair, 2003) (figura 4).

El disco imaginal de ala tiene una estructura a modo de saco, constituido por una capa de epitelio columnar y una capa de epitelio escamoso, denominada membrana peripodial, entre las que se encuentra la luz del saco o lumen. Las células del epitelio columnar constituyen el territorio prospectivo del tórax y del ala y están polarizadas, con su superficie apical orientada al lumen. Se distinguen dos subdivisiones del epitelio del disco imaginal: una división en un compartimento anterior (A) y en uno posterior (P) y otra en un compartimento dorsal (D) y uno ventral (V). Estos compartimentos están separados por sus respectivos bordes de restricción de linaje (Blair, 2003; Dahmann and Basler, 1999; Tabata, 2001; Tabata and Takei, 2004). Se especuló con una tercera división a lo largo del eje próximo-distal entre el territorio prospectivo de notum y el territorio de ala, pero el borde notum-ala no es un borde de compartimento ya que no se respeta la restricción de linaje (Zecca and Struhl, 2002a; Zecca and Struhl, 2002b) (figura 5).

La identidad de las células en el compartimento P está determinada por el gen selector *engrailed* (*en*), que codifica un factor de transcripción con un homeodominio (Guillen et al., 1995; Kornberg et al., 1985; Morata and Lawrence, 1975; Mullor et al.,

1997). Las células P secretan la proteína Hedgehog (Hh) que actúa como un morfógeno de corto alcance, señalizando a las células A para formar el patrón central del ala (Tabata et al., 1992; Zecca et al., 1995). Hh además induce la expresión de *decapentaplegic (dpp)*, en una estrecha banda de células adyacentes y anterior al borde A/P: este grupo de células que expresan Dpp constituye un centro organizador (Basler and Struhl, 1994; Capdevila and Guerrero, 1994; Tabata and Kornberg, 1994). Dpp difunde a ambos lados del borde A/P y actúa como un morfógeno de largo alcance (el rango de difusión abarca cuarenta diámetros celulares), induciendo la expresión de genes diana (*sal*, *omb*) y el crecimiento del ala en el eje antero-posterior, más allá del dominio central (Capdevila and Guerrero, 1994; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Tabata and Takei, 2004; Zecca et al., 1995) (figura 6).

El borde dorso ventral del disco separa las poblaciones celulares que formarán la superficie dorsal y ventral del ala y dará lugar al margen del ala adulta (García-Bellido et al., 1973). El gen selector *apterous (ap)* especifica las células del compartimento dorsal (Blair et al., 1994; Díaz-Benjumea and Cohen, 1993) e induce la expresión del gen *fringe* (Irvine and Wieschaus, 1994), que a su vez activa la vía de *notch* (Kim et al., 1995). La señalización de corto alcance mediada por *notch* establece otro centro organizador, constituido por células a ambos lados del borde de compartimento, las cuales secretan el morfógeno Wingless (Wg) (Doherty et al., 1996; Neumann and Cohen, 1996). Wg induce la expresión de genes diana como *achaete*, *distal-less* o *vestigial* y es el responsable del patrón morfogenético del ala a lo largo del eje dorso ventral (Neumann and Cohen, 1997; Tabata and Takei, 2004; Zecca et al., 1996) (figura 6).

Modo de actuación del morfógeno

En sentido estricto, para considerar a una molécula como morfógeno debe cumplir dos criterios: inducir directamente una respuesta en las células diana, a distancia de la fuente que la produce y que dicha respuesta sea diferenciada en función de su gradiente de concentración (Tabata and Takei, 2004). Bajo esos términos, las moléculas señalizadoras y difusibles que se han identificado como morfógenos en el desarrollo de invertebrados y vertebrados son las siguientes: miembros de la familia

Wnt (Wg en el desarrollo de los apéndices de *Drosophila* (Neumann and Cohen, 1997; Zecca et al., 1996), Wnts en la formación del patrón A/P de la placa neural (*neural plate*) (Wilson and Houart, 2004)), miembros de la familia TGF- β (Dpp en el desarrollo de los apéndices de *Drosophila* (Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996), BMPs en la formación del patrón D/V del tubo neural de vertebrados (Lupo et al., 2006), Squint en el desarrollo del mesodermo y endodermo en el embrión temprano del pez cebra (Chen and Schier, 2001), Activin en *Xenopus* (Gurdon and Bourillot, 2001)), miembros de la familia Hedgehog (Hh en el desarrollo de los apéndices de *Drosophila* (Mullor et al., 1997; Strigini and Cohen, 1997), Shh en la formación del patrón D/V del tubo neural de vertebrados (Lupo et al., 2006)) y miembros de la familia FGF (FGF-8 en el desarrollo del mesencéfalo y romboencéfalo anterior en el sistema nervioso central de vertebrados (Dubrulle and Pourquie, 2004; Irving and Mason, 2000; Martinez et al., 1999)). Para comprender el modo de actuación de estas proteínas se necesita responder a las siguientes cuestiones: cómo se propaga el morfógeno a través del tejido, cómo se mantiene el gradiente de concentración del morfógeno y cómo interpretan las células receptoras dicho gradiente.

Movimiento del morfógeno

La difusión simple a través del espacio extracelular es un mecanismo que no explica la distribución en gradiente de un morfógeno. Por ejemplo, una proteína quimera constituida por GFP y la secuencia del dominio de secreción de Dpp se secreta y difunde por todo el tejido, pero no se distribuye formando un gradiente (Entchev et al., 2000). Además, tanto Wg como Hh están modificadas por lípidos (Pepinsky et al., 1998; Porter et al., 1996; Willert et al., 2003; Zhai et al., 2004), lo que les confiere una elevada afinidad por la membrana plasmática y dificulta y hace improbable el movimiento libre de estas moléculas por el medio extracelular. Por tanto, se han de considerar mecanismos alternativos que conduzcan a la formación de un gradiente (Tabata and Takei, 2004; Zhu and Scott, 2004):

Difusión restringida

La difusión se define como el movimiento de un soluto a favor del gradiente de concentración. El término difusión restringida, a diferencia de la difusión simple,

implica una interacción entre las moléculas del morfógeno y las moléculas de la superficie celular (Tabata and Takei, 2004; Zhu and Scott, 2004). Modelos teóricos proponen que este tipo de difusión es el mecanismo más plausible para el transporte del morfógeno (Lander et al., 2002) (figura 7).

Distintas evidencias experimentales otorgan un papel a los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs) en este mecanismo de difusión de los morfógenos (Hacker et al., 2005; Lin, 2004; Tabata and Takei, 2004; Zhu and Scott, 2004). Los HSPGs se localizan en la superficie celular y están constituidos por un núcleo proteico, al que se unen cadenas de heparán sulfato glicosaminoglicanos. Éstos intervendrían proporcionando una superficie permisiva, descrita como una “autopista molecular” (*molecular highway*), para el movimiento de los morfógenos. Serán tratados con más detalle posteriormente, en esta tesis.

Para que la difusión restringida sea posible, los morfógenos modificados por lípidos –Wg y Hh- han de adquirir una conformación soluble en un medio hidrofílico, como es el espacio extracelular. Evidencias recientes sugieren que los vehículos de transporte de estos morfógenos en su difusión sean partículas lipoproteicas (Eaton, 2006; Panakova et al., 2005), tradicionalmente asociadas al transporte de lípidos por el medio interno de los organismos. Las lipoproteínas son complejos macromoleculares, constituidos por un núcleo de triglicéridos y ésteres de colesterol, recubierto por una monocapa de fosfolípidos polares, colesterol y apolipoproteínas (Jonas, 2002). Ensayos de coimmunoprecipitación y fraccionamiento asocian a Hh y Wg con la lipoproteína de *Drosophila*, Lipoforina y en ausencia de ésta se reduce el rango de señalización y difusión de los morfógenos (Panakova et al., 2005). Estos autores proponen que Hh y Wg se asociarían a la capa fosfolipídica de la lipoproteína, a través de sus residuos de ácido palmítico y colesterol (Eaton, 2006; Panakova et al., 2005).

Transcitosis planar

Este modelo explica el movimiento del morfógeno a través del tejido mediante ciclos repetidos de endocitosis y exocitosis: la molécula señalizadora se internaliza desde el medio extracelular, se transfiere entre distintos compartimentos endosómicos, pasa a la ruta de reciclaje y es finalmente secretada para que la célula vecina comience una nueva ronda endocítica (Entchev and Gonzalez-Gaitan, 2002; Gonzalez-Gaitan, 2003a; Gonzalez-Gaitan, 2003b; Tabata and Takei, 2004; Vincent and Dubois, 2002)

(figura 7). Este mecanismo se propuso para el movimiento de Dpp: en clones de células mutantes para el gen *shibire* (que codifica la Dinamina, proteína necesaria para la endocitosis mediada por vesículas de Clatrina), se detecta un menor número de vesículas de Dpp-GFP dentro del clon y una zona de “sombra” en el tejido inmediatamente posterior al clon (Entchev et al., 2000). Igualmente, al sobreexpresar un mutante dominante negativo de Rab5 (factor limitante de la vía endocítica) en el disco de ala, se restringe la expresión de las dianas de Dpp a las células adyacentes a la fuente del morfógeno (Entchev et al., 2000).

Por el contrario, otros autores presentan resultados diferentes utilizando los mismos mutantes de endocitosis: los niveles de Dpp-GFP extracelular no se reducen en las células silvestres, adyacentes a un clon mutante *shibire* (Belenkaya et al., 2004), lo que sugiere que este proceso no es necesario para el movimiento del morfógeno. Además, ensayos bioquímicos de digestión de las proteínas extracelulares del disco con Proteinasa K, indican que la fracción mayoritaria de Dpp con actividad señalizadora se localiza en el espacio extracelular (Teleman and Cohen, 2000) y la misma localización se propone para Dpp-GFP tras ensayos de inmunotinción extracelular (Belenkaya et al., 2004). Por último, los estudios teóricos citados anteriormente rebaten la transcitosis planar de Dpp, sugiriendo que un defecto en la endocitosis incrementaría la presencia del receptor en la superficie celular, atrapando éste al ligando, lo que impediría la difusión del morfógeno (Lander et al., 2002). En el caso de Wg y de Hh en el disco imaginal de ala, el marcaje extracelular en condiciones que impiden el tráfico vesicular (endocitosis y secreción) indican la localización extracelular del ligando y que la endocitosis no se requiere para su transporte (Strigini and Cohen, 2000).

Citonemas

Algunos autores han detectado extensiones celulares de actina, a modo de filopodios, que se proyectan hacia el organizador A/P y que se originan en las células de la periferia del disco imaginal de ala (Hsiung et al., 2005; Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). Se ha propuesto que estas estructuras, denominadas citonemas, serían un vehículo de transporte del morfógeno hacia las células alejadas de la fuente, generando una respuesta intracelular a la llegada del morfógeno al cuerpo de la célula (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). El principal inconveniente de esta propuesta es la dificultad de detectar estas estructuras (Tabata and Takei, 2004) (figura 7).

Argosomas

En células de *Drosophila*, las proteínas unidas a una molécula de GPI se localizan en dominios específicos de la membrana plasmática, denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Rietveld et al., 1999). En el disco imaginal del ala, se sobreexpresó una proteína quimera constituida por GFP, un péptido señal y una señal de modificación por GPI. La proteína se detectaba principalmente en la membrana basolateral de las células que la expresaban, pero también en vesículas endocíticas de células separadas hasta veinte diámetros celulares del dominio de expresión (Greco et al., 2001). Además la proteína no había viajado sola, sino que codistribuía con Rho-CFP, que también está asociada a la membrana plasmática (Greco et al., 2001). El modelo propuesto por estas autoras es que lo que se libera de las células productoras son fragmentos procedentes de dominios específicos de la membrana plasmática, que se desplazan a través del epitelio. Estas estructuras, denominadas argosomas, se detectan en el dominio de expresión de *wg* y colocalizan con la proteína Wg, sugiriendo que operan como vehículo de transporte del morfógeno (Greco et al., 2001; Tabata and Takei, 2004) (figura 7).

Modulación del gradiente

Para que el gradiente morfogenético se mantenga estable, es necesario eliminar el morfógeno del medio extracelular; de lo contrario, la producción continuada del morfógeno desde la fuente resultaría en su propagación incontrolada por toda la superficie del epitelio. El tráfico vesicular intracelular o los niveles del receptor contribuyen a modular el gradiente del morfógeno y son los principales parámetros cuya alteración modifica la forma de dicho gradiente (Entchev and Gonzalez-Gaitan, 2002; Gonzalez-Gaitan, 2003a; Gonzalez-Gaitan, 2003b; Tabata and Takei, 2004; Torroja et al., 2004; Vincent and Dubois, 2002).

La vía endocítica comienza con la internalización del ligando en vesículas de endocitosis rodeadas de Clatrina. Ya en el interior celular, el endosoma primario dirigirá la carga hacia su reciclaje y salida de la célula o hacia su degradación en el lisosoma (Mukherjee et al., 1997). Cada etapa de la vía endocítica es controlada por proteínas de bajo peso molecular pertenecientes a la familia de las Rab GTPasas: así, Rab5 regula el

paso desde la membrana plasmática al endosoma temprano y se acumula en este último y Rab7 y Rab11 regulan la orientación hacia la vía degradativa o de reciclaje, respectivamente y se acumulan en el endosoma tardío o en el endosoma de reciclaje (Zerial and McBride, 2001) (figura 8).

En el caso de Dpp, el aumento de los niveles de receptor Tkv reduce el rango de señalización (Lecuit and Cohen, 1998). El mismo efecto se produce tras el bloqueo de la actividad de Rab5 en las células receptoras o tras la activación de la degradación de Dpp mediante un mutante constitutivamente activo de Rab7 (Entchev et al., 2000). Estos resultados indican que el gradiente de Dpp está modulado por el tráfico vesicular intracelular. En el caso de Wg ocurre un proceso similar: en el disco de ala, la endocitosis mediada por Dinamina es responsable de eliminar a Wg del medio extracelular (Strigini and Cohen, 2000) y en embriones mutantes para la proteína Dor (que es un componente de la vía degradativa), se expande el rango de señalización de Wg (Dubois et al., 2001). Hh será tratado en detalle en el siguiente apartado de esta Introducción.

Los modelos teóricos de modulación de gradientes morfogenéticos, introducen el parámetro de robustez del gradiente (*gradient robustness*): la capacidad del gradiente de tamponar fluctuaciones ambientales o en la expresividad de la dosis génica del morfógeno (Eldar et al., 2004). Según estos autores, para mantener la robustez del gradiente resulta decisivo que el morfógeno se degrade rápidamente en la zona de mayor actividad señalizadora (próximo a la fuente) y a una menor velocidad en el resto del tejido. Esto se consigue si es el morfógeno quién activa su propia degradación, pudiéndose llevar a cabo de dos maneras posibles: que el morfógeno active la expresión de su receptor y se degrade mediante endocitosis mediada por receptor (lo que parece que ocurre en el caso de Hh (Han et al., 2004b; Torroja et al., 2004)), o que el morfógeno active la expresión de proteasas que lo degraden en el medio extracelular (Eldar et al., 2003).

Interpretación del gradiente

Por interpretación del gradiente se entiende el proceso por el que las células reconocen diferentes concentraciones del morfógeno a través de sus receptores y transducen esta información al núcleo, resultando en una expresión diferencial de genes.

La complejidad del proceso dificulta la propuesta de modelos que respondan de manera satisfactoria a esta cuestión.

En primer lugar, el gradiente de concentración del morfógeno, que es una variable continua, ha de interpretarse en el interior celular como una variable discreta para que la respuesta en la expresión de los genes sea del tipo “todo o nada” (Ashe and Briscoe, 2006; Gurdon and Bourillot, 2001). La evidencia empírica muestra que una población celular detecta hasta siete rangos o umbrales de concentración de una molécula que forme un gradiente: por ejemplo, el gradiente de Sonic hedgehog (Shh) especifica cinco subtipos neuronales a lo largo del eje dorsoventral del tubo neural de vertebrados (Ericson et al., 1997). Además, las células han de ser capaces de detectar y responder de manera diferenciada ante mínimas variaciones de la concentración del morfógeno: en el caso de Shh, variaciones de dos órdenes de magnitud son suficientes para producir esta respuesta diferencial (Ericson et al., 1997).

Un mecanismo sencillo que explicaría la interpretación del gradiente sería la presencia de receptores de diferente afinidad por el morfógeno: cada célula captaría o no la señal en función de la proporción de receptores de uno u otro tipo presentes en su superficie (Ashe and Briscoe, 2006; Gurdon and Bourillot, 2001). Sin embargo, los datos experimentales indican que las células sólo utilizan un tipo de receptor para interpretar el gradiente del morfógeno (Chen and Struhl, 1999; Nguyen et al., 1998; Rulifson et al., 2000). Otra posibilidad sería la utilización de distintas vías de transducción de señales en función de la concentración del ligando (Ashe and Briscoe, 2006; Gurdon and Bourillot, 2001), pero tampoco es ese el caso: así, por ejemplo, la activación de los genes diana que se expresan como respuesta a altos o bajos niveles de Wg siempre se produce a través de Armadillo (Zecca et al., 1996).

Sin embargo, en algunos casos se ha descrito una relación directa entre la concentración del morfógeno y el grado de actividad del efector transcripcional: por ejemplo, el incremento de dos órdenes de magnitud en la concentración de Shh se corresponde con una variación equivalente en el nivel de actividad de Gli (Stamatakis et al., 2005). Así, algunos de los modelos propuestos de interpretación del gradiente se centran en la modulación de la actividad del efector transcripcional. Uno de estos modelos es el denominado de “afinidad por el sitio de unión” (*binding site affinity*), que se basa en la diferente afinidad del efector transcripcional por diferentes secuencias activadoras (*enhancers*). Este mecanismo se ha observado en la señalización de Dpp, en el embrión de *Drosophila*: a altos niveles de Dpp se expresa el gen diana *race* en una

estrecha banda de células, como resultado de la unión del factor de transcripción Mad a secuencias *enhancers* de baja afinidad. Si se modifican estas secuencias aumentando su afinidad por Mad, se aumenta el rango de expresión del gen *race* (Wharton et al., 2004).

La vía de señalización de Hh

Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, la vía de señalización de Hh es esencial para el desarrollo del organismo, variando su función dependiendo del contexto. Así, regula la proliferación, la supervivencia celular o la especificación de determinados tipos celulares. Igualmente, la señalización puede ser de corto o de largo alcance, directa o indirecta (a través de un mecanismo de relé) o como morfógeno *sensu stricto* (Ingham and McMahon, 2001; Ingham and Placzek, 2006; McMahon et al., 2003).

En mamíferos se han identificado tres miembros de esta familia de proteínas: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh), de los que Dhh es el que está más próximo filogenéticamente a la proteína Hh de *Drosophila*, mientras que Shh e Ihh están más próximos entre sí, como resultado de una duplicación génica más reciente (Ingham and McMahon, 2001) (figura 9).

Shh tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados. La función que se le atribuye por excelencia es la de especificar los tipos celulares de la región ventral del tubo neural del embrión, resultando en la formación del patrón D/V del tubo neural (Jessell, 2000; Marti and Bovolenta, 2002). Pero en el tubo neural no sólo controla la especificación, sino que regula la proliferación y supervivencia celular a través de la regulación del ciclo celular y de la expresión de genes antiapoptóticos (Cayuso et al., 2006). Además, el crecimiento del neocortex, cerebelo y tectum dependen de la actividad mitogénica de Shh (Ahn and Joyner, 2005; Dahmane et al., 2001). Recientemente se le ha atribuido un papel en la guía axonal (Bourikas et al., 2005; Charron et al., 2003) y en el mantenimiento de nichos de células madre en el adulto (Lai et al., 2003)(Palma et al., 2005).

Fuera del SNC, interviene en la actividad polarizante de la ZPA en el desarrollo de los dígitos de las extremidades (Dudley et al., 2002)(Riddle et al., 1993) (Yang et al., 1997) y es el responsable de la asimetría lateral del plan corporal (Levin et al.,

1995)(Zhang et al., 2001). Además se le reconoce una actividad en el desarrollo de los siguientes órganos de los vertebrados: corazón, vasos sanguíneos, gónadas, intestino, riñón, pulmones, páncreas, hueso, cartílago, pelo, ojo, músculo y dientes (McMahon et al., 2003).

En *Drosophila*, Hh es una señal morfogenética en la segmentación del embrión (Lee et al., 1992; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Tabata et al., 1992) y en el disco de ala (Basler and Struhl, 1994; Mullor et al., 1997; Strigini and Cohen, 1997; Tabata and Kornberg, 1994), pata (Diaz-Benjumea et al., 1994), ojo (Dominguez, 1999) y disco genital (Gorfinkiel et al., 2003). También interviene en la migración de las células germinales (Deshpande et al., 2001), regula la proliferación de neuroblastos (Park et al., 2003) y modula la afinidad celular en los bordes de compartimento (Blair and Ralston, 1997; Rodriguez and Basler, 1997).

La relevancia de la vía de Hh en el hombre se pone de manifiesto al asociarse alteraciones en esta vía de señalización a patologías como holoprosencefalia, polidactilia, síndrome de Gorlin, carcinomas de las células basales o meduloblastomas (McMahon et al., 2003).

Hh como morfógeno

Hh y la especificación del patrón segmental embrionario de Drosophila

En *Drosophila melanogaster*, cada segmento embrionario está definido por un territorio de cutícula desnuda y otro territorio de cutícula con dentículos, que a su vez se subdivide en seis hileras de dentículos, cada uno de los cuales tiene un tamaño, forma y polaridad definidos (Lawrence, 1992)(Hatini and DiNardo, 2001). El gen selector *en* regula la expresión de Hh en dos filas de células que definen el compartimento posterior de cada segmento. Hh señala en el tejido adyacente e induce la activación de genes diana (*wg*, *patched (ptc)*), en una línea de células del compartimento A del mismo segmento; la señal de Wg dirige la especificación de la cutícula desnuda. Asimismo, Hh induce la expresión de *rhomboid (rho)* y *ptc* en 1-2 líneas de células del compartimento A del segmento posterior. La activación de *rho* induce la señalización a través de EGF, permitiendo la diferenciación de los dentículos 1-4. Hh y Wg, además, reprimen la expresión de *serrate (ser)* (codifica un ligando de Notch), restringiéndola a tres filas de células posteriores a las que expresan *rho*. Ser induce la expresión de *rho* en las células

adyacentes (Forbes A.J., 1993; Gallet et al., 2003; Hatini and DiNardo, 2001) (figura 10).

El gen *hh* se identificó en un mapeo genético (*screening*) para encontrar mutaciones que alteraran el patrón segmental larvario (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). La cutícula de los mutantes *hh* no presenta un patrón segmental y está cubierta totalmente de dentículos, todos con la misma morfología, lo que sugería que todos habían adquirido la misma información posicional (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980) (figura 10). A estos genes que regulan el patrón dentro de cada segmento se les denominó genes de polaridad segmental (Mohler and Vani, 1992; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). *Hh* se clonó en 1992 y se describió como una molécula secretable, que se expresa en las células del compartimento posterior de cada segmento, lo que encajaba con una propuesta de Hh como morfógeno: secretado desde una fuente localizada (las células del compartimento posterior), difundía hacia el tejido adyacente para generar diversidad morfológica, de una forma dependiente de concentración (Lee et al., 1992; Tabata et al., 1992). Sin embargo, el patrón de expresión de las dianas *Wg* y *Ptc* indica que el efecto de Hh se restringe únicamente a las células próximas a la fuente, lo que invalida la hipótesis de Hh como morfógeno de largo alcance. Por lo tanto, el papel de Hh en la adquisición de la identidad posicional de las células de la epidermis embrionaria, es el de una señal mediadora de interacciones de carácter inductivo, que ocurren entre grupos de células adyacentes.

Hh y la especificación del patrón en el ala de Drosophila

En el disco imaginal de ala, Hh tiene un doble papel: induce la expresión del morfógeno Dpp, pero también actúa como morfógeno *per se*.

Hh se produce en las células del compartimento posterior del disco y difunde al compartimento anterior, donde induce la expresión de distintos genes en respuesta a los distintos niveles de concentración del morfógeno. Así, los genes *en*, *ptc*, *collier (col)*, *dpp* y el complejo *iroquois (iro)* responden directamente a la señalización por Hh: desde los máximos niveles de Hh, en las dos primeras células próximas al borde A/P en las que se activa *en*, hasta los menores niveles de Hh, a diez células de distancia donde se mantiene la expresión de *iro*. Además, Hh induce la estabilización de la forma transcripcionalmente activa de *Cubitus interruptus (Ci)*, *Ci¹⁵⁵* y ésta se detecta en un rango de 10-15 diámetros celulares (Ingham and McMahon, 2001) (figura 11). Esta

actividad señalizadora de corto alcance es la responsable de la formación del patrón en la región central del ala: la activación del gen *col* promueve la especificación del tejido comprendido entre las venas L3 y L4 y mediante la activación del gen *vein*, de la vena posterior L4 (Croizatier et al., 2002)(Mohler et al., 2000; Mullor et al., 1997; Simcox et al., 1996; Strigini and Cohen, 1997; Vervoort et al., 1999). Las células que expresen *iro*, pero no *col*, definirán el territorio prospectivo de la vena L3 (Croizatier et al., 2004) (figura 11).

Por otro lado, Dpp activado por Hh difunde a ambos lados del borde A/P y actúa como un morfógeno de largo alcance, dirigiendo el crecimiento del ala en el eje antero-posterior, más allá del dominio central (Capdevila and Guerrero, 1994; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Tabata and Takei, 2004; Zecca et al., 1995).

Hh y la especificación del patrón D/V del tubo neural de vertebrados

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, las células del tubo neural adquieren identidades distintas en base a su disposición respecto a centros señalizadores, que se localizan en ambos extremos del eje dorsoventral. Ventralmente, Shh es producido por la notocorda e induce la formación de la placa del suelo (*floor plate*), que es una población celular especializada que se localiza en la línea media ventral del tubo neural. Shh se expresa también en la *floor plate* y genera un gradiente de actividad, a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural, que promueve la especificación de una serie de tipos celulares ventrales (Jessell, 2000)(Fuccillo et al., 2006; Marti and Bovolenta, 2002) (figura 12).

Distintas evidencias indican que Hh actúa como morfógeno de largo alcance en el desarrollo del tubo neural. En primer lugar, Shh es necesario y suficiente para especificar las diferentes identidades celulares ventrales del tubo neural (Marti et al., 1995). Por otro lado, el receptor de Shh, Ptc-1, tiene un patrón de expresión en gradiente que es inducido por el propio Shh, con su mayor nivel de expresión en el territorio más próximo a la fuente (Marigo and Tabin, 1996). Además, la expresión ectópica de un mutante nulo para Ptc, que antagoniza la señalización, causa un cambio de identidad ventral a dorsal en los precursores neuronales del tubo neural, lo que indica que Shh induce directamente una respuesta en las células diana (Briscoe et al., 2001).

El efecto de Shh se produce a través de la combinación de la actividad represora o activadora de los tres factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3 (Lei et al., 2004),

resultando en la represión de los factores de transcripción con homeodominio de Clase I (*Pax6*, *Pax7*, *Irx3* y *Dbx1/2*) y la activación de los factores de transcripción con homeodominio de Clase II (*Nkx2.2*, *Nkx6.1*). La expresión de estos genes en distintas combinaciones resulta en la especificación de los distintos tipos celulares (Briscoe et al., 2000).

Hh y la actividad polarizante de la ZPA

La polaridad anteroposterior de las extremidades de los vertebrados está dirigida por el organizador morfogenético denominado ZPA, que es una fuente de Shh (Riddle et al., 1993). Shh reproduce las propiedades de la ZPA: la expresión ectópica de Shh induce duplicaciones de dígitos a modo de imagen especular, de tal manera que a mayor concentración de Shh, más posterior es el dígito que se induce (Yang et al., 1997). Además, utilizando mutantes condicionales, se observa que la reducción de Shh en la ZPA resulta en la carencia de los dígitos posteriores (Lewis et al., 2001).

Sin embargo, no existe una evidencia de que sea Shh la molécula que produzca estos efectos de manera directa. Es más, se ha demostrado que Shh induce la expresión de BMP2 y que la falta de BMP2 induce la formación ectópica del dígito más anterior (Duprez et al., 1996) (Bumcrot et al., 1995; Drossopoulou et al., 2000), lo que invalida el papel de Shh como morfógeno en sentido estricto.

Por otro lado, estudios de mapas de destino en el primordio embrionario de la extremidad de vertebrados, proponen otra interpretación de la actividad de Shh: la especificación de las células que forman los dígitos anteriores depende de las diferentes concentraciones de Shh a las que están expuestas, pero en el caso de los dígitos posteriores, dicha especificación depende del tiempo de exposición a la señal (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004). Es decir, la respuesta celular diferencial a Shh no sólo se puede producir en función de un gradiente de concentración espacial de la molécula, sino también en función de la permanencia de la señal en el tiempo.

Mecanismos moleculares de la señalización por Hh

Los componentes principales de los procesos de producción, secreción, difusión, recepción y transducción de la señal de Hh están conservados en *Drosophila* y los vertebrados (Hooper and Scott, 2005; Huangfu and Anderson, 2006; Ingham and

McMahon, 2001; Torroja et al., 2005) (figura 13). A continuación analizaremos cada uno de estos procesos, señalando las diferencias entre los distintos grupos animales.

Producción y secreción

En *Drosophila*, Hh se transcribe en las células del compartimento posterior de los segmentos embrionarios y de los discos imaginales, bajo el control del gen homeótico *en* (Lee et al., 1992; Tabata et al., 1992). La proteína es sintetizada como un precursor de 45kD, que sufre una hidrólisis intramolecular catalizada por la porción C-terminal del precursor: el resultado es un fragmento C-terminal de 25kD, sin función conocida y un fragmento N-terminal de 19kD, que es el responsable de la actividad señalizadora de la molécula (denominado HhN) (Lee et al., 1994; Porter et al., 1995). La autocatálisis de Hh ocurre a través de un intermediario tioéster, que sufre un ataque nucleofílico por una molécula de colesterol, produciéndose la unión covalente del lípido al C-terminal de HhN; la molécula modificada resultante se denomina HhNp (“p” de procesado) (Porter et al., 1996). Además, Hh sufre una segunda modificación lipídica que consiste en la unión covalente de una molécula de ácido palmítico a la Cys amino terminal. Esta reacción está catalizada por una enzima que pertenece a la familia de las O-aciltransferasas unidas a membrana (MBOAT) y está codificada por el gen denominado *sightless*, *skinny hedgehog*, *central missing* o *raspberry* (Amanai and Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Lee and Treisman, 2001; Micchelli et al., 2002) (figura 14).

El papel que juegan las modificaciones lipídicas en la actividad de Hh es controvertido (Guerrero and Chiang, 2006; Wendler et al., 2006). En *Drosophila*, la modificación por colesterol supone el anclaje estable de HhNp a la superficie celular (Peters et al., 2004), lo que explica que la forma mutante sin colesterol – HhN - tenga un mayor rango de difusión que HhNp en el disco imaginal (Burke et al., 1999; Callejo et al., 2006; Dawber et al., 2005). En cuanto a la capacidad de señalización de HhN, se ve disminuido el efecto no autónomo en las dianas activadas por altos niveles de morfógeno (Callejo et al., 2006; Dawber et al., 2005). Así, la función del colesterol sería posibilitar una difusión restringida de HhNp, evitando su dilución en el espacio extracelular (Guerrero and Chiang, 2006). Otros autores, sin embargo, muestran evidencias de que el rango de difusión y señalización de HhN es menor que el de la molécula modificada por colesterol (Gallet et al., 2006). Estas diferencias se pueden

atribuir al método experimental utilizado para inducir la expresión ectópica de las distintas formas de Hh (Guerrero and Chiang, 2006). Además, también existe una diferencia en la epidermis del embrión, donde se produce una respuesta asimétrica a la señal de Hh: la modificación por colesterol se requiere para la activación de las dianas en las células anteriores (Wg y Ptc), pero es dispensable para la activación de las dianas en las células posteriores (Rho y Ptc) (Gallet et al., 2003).

En vertebrados, la idea predominante era que el colesterol se necesitaba para la difusión y señalización a larga distancia de Shh, producido en la ZPA del primordio de las extremidades (Lewis et al., 2001). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el rango de difusión y señalización de ShhN es mayor que el de la molécula modificada por colesterol (Li et al., 2006), lo que coincide con el efecto observado en *Drosophila*.

Por otro lado, también existen diferentes interpretaciones en cuanto a la localización subcelular de Hh. Gallet et al. sugieren que Hh se localiza en la superficie apical del epitelio del disco, siendo liberado y recibido en esa zona. La ausencia de colesterol deslocaliza al morfógeno, acumulándose en la superficie basolateral de la célula (Gallet et al., 2006). Callejo et al. proponen que Hh es secretado apicalmente, pero que es recibido desde la superficie basolateral. La ausencia de colesterol deslocaliza al morfógeno, internalizándose por la superficie apical de la célula receptora (Callejo et al., 2006).

En cuanto a la forma mutante no modificada por ácido palmítico – HhC85S –, tiene un mayor rango de difusión que HhNp en el disco imaginal, pero la capacidad de señalización está muy reducida (Callejo et al., 2006; Chamoun et al., 2001; Dawber et al., 2005; Gallet et al., 2003). En vertebrados, tanto la capacidad de difusión como la señalización mediada por ShhC25S están restringidas a las células próximas a la fuente del morfógeno (Chen et al., 2004a; Pepinsky et al., 1998).

Por último, estudios bioquímicos muestran que ShhNp forma complejos multiméricos que poseen mayor actividad señalizadora que ShhNp en forma monomérica (Chen et al., 2004a; Feng et al., 2004; Goetz et al., 2006; Zeng et al., 2001). Para la formación de estos complejos se requiere que Shh esté modificado, tanto por colesterol como por palmítico (Chen et al., 2004a; Feng et al., 2004; Goetz et al., 2006). En *Drosophila*, tanto en células S2 como en tejidos, HhN no forma estructuras multiméricas (Callejo et al., 2006; Gallet et al., 2006, Chen et al., 2004). Sin embargo, los resultados vuelven a ser contradictorios con respecto a la modificación por ácido palmítico: en células S2 se han aislado multímeros de HhC85S (Chen et al., 2004),

mientras que en el tejido de la mosca sí se requiere la doble modificación lipídica para la formación de estas estructuras multiméricas (Callejo et al., 2006). El papel que se le atribuye a estos complejos es el de facilitar la difusión del morfógeno por un medio extracelular acuoso, localizándose los residuos hidrofóbicos en el interior del complejo, a modo de micela (Chen et al., 2004).

Independientemente de su función en la señalización, las modificaciones lipídicas anclan a Hh a la membrana plasmática. Por tanto, es necesario un mecanismo que libere al morfógeno de la membrana y que permita su difusión. En *Drosophila*, se ha caracterizado la proteína Dispatched (Disp) en las células productoras de Hh (Burke et al., 1999). En células mutantes *disp* HhNp no se libera, acumulándose en su superficie (Burke et al., 1999; Gallet et al., 2003). Sin embargo, la forma mutante no modificada por colesterol es independiente de *disp*, al igual que sucede con Hh no modificado por palmítico (Burke et al., 1999; Gallet et al., 2003) (Amanai and Jiang, 2001) (Gorfinkiel, Callejo, Torroja y Guerrero, datos no publicados), lo que sugiere que esta proteína se requiere de manera específica para la movilización de HhNp anclado a la membrana. En vertebrados se han caracterizado dos homólogos de Disp, de los que Disp A (también denominado Disp1) se requiere para la salida de ShhNp de la célula (Kawakami et al., 2002; Ma et al., 2002; Tian et al., 2005; Tian et al., 2004).

Disp es una proteína integral de membrana, con doce dominios transmembrana, de los cuales cinco constituyen un dominio sensible a esterol (SSD). Este dominio también se encuentra en Ptc y en proteínas que regulan la homeostasis del colesterol o que señalizan a través de él, como la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasa, la proteína de Niemann-Pick C1 (NPC1) o la proteína activadora de la rotura de SREBP (SCAP) (Kuwabara and Labouesse, 2002). Se ha sugerido que, a través de este dominio, Disp regula el tráfico vesicular de Hh a la superficie celular (Kuwabara and Labouesse, 2002). Por otro lado, Disp (al igual que Ptc) tiene homología de secuencia con una familia de transportadores de membrana bacterianos, conocidos como proteínas RND (*resistance, nodulation, division*) (McKeegan et al., 2003), pudiendo funcionar como tal en la salida de Hh al espacio extracelular.

Transporte

En el caso de Hh, la cuestión a resolver es cómo movilizar a una proteína modificada por lípidos que, en principio, debería estar anclada a la membrana (Peters et

al., 2004). De los mecanismos tratados anteriormente para el transporte de morfógenos - difusión pasiva, citonemas, argosomas, transcitosis planar y difusión restringida - no existen evidencias experimentales que impliquen a ninguno de los tres primeros en el transporte de Hh. En cuanto a la transcitosis planar, la localización de Hh en el tejido receptor es extracelular (Torroja et al., 2004) y el bloqueo de la endocitosis no impide la difusión del morfógeno (Gallet and Therond, 2005; Han et al., 2004b; Torroja et al., 2004), datos que no concuerdan con este modelo.

Por tanto, se considera que Hh difunde por la matriz extracelular, bien formando estructuras multiméricas (ver apartado anterior, (Chen et al., 2004 {Callejo, 2006 #81}) y/o como componente de partículas lipoproteicas (ver apartado de Difusión del Morfógeno, (Eaton, 2006; Panakova et al., 2005)). En cualquier caso, distintas evidencias experimentales muestran que Hh interacciona con los HSPGs de la matriz extracelular para su difusión (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Takei et al., 2004; The et al., 1999). Dada su especial relevancia, dedicamos a estas moléculas el último apartado de esta Introducción.

En pez cebra se han descrito mutantes de falta de función del gen *you* que presentan fenotipos característicos de una reducción en la señalización de Hh, así como una expresión reducida del gen diana *ptc1* (Hollway et al., 2006; Woods and Talbot, 2005). *you* actúa de manera no autónoma y las células mutantes para *you* son capaces de producir y de responder a la señal de Hh (Woods and Talbot, 2005). *you* codifica la proteína ortóloga a Scube2 de mamíferos (Hollway et al., 2006; Woods and Talbot, 2005)(Kawakami et al., 2005) y es una glicoproteína extracelular asociada a membrana, que estructuralmente se compone de un péptido señal, un dominio EGF (nueve repeticiones EGF), una secuencia espaciadora y un dominio CUB (*Complement Urchin EGF Bmp1*). Se sugieren dos alternativas para su función: 1) experimentos de epistasias y trasplantes evidencian que *You* interviene en la matriz extracelular, en el dominio de las células receptoras, posiblemente en el transporte o estabilización de Hh y que podría interactuar con componentes de la matriz extracelular (Woods and Talbot, 2005) o 2) su homología estructural con el receptor endocítico Cubilin sugiere que pudiera regular la función de Megalin, requerido para la endocitosis de Hh, interviniendo en la transducción de la señal (Hollway et al., 2006).

Modulación del gradiente de Hh

Para que un gradiente morfogenético se mantenga estable, es necesario eliminar el morfógeno del medio extracelular. En el caso de la vía de señalización de Hh esto se realiza a través del receptor de membrana Ptc, que une e internaliza a Hh (Incardona et al., 2000; Marigo and Tabin, 1996; Torroja et al., 2004).

En *Drosophila* existe un sólo gen *ptc*, mientras que en vertebrados se han caracterizado dos componentes de la misma familia: *ptc1* y *ptc2* (Carpenter et al., 1998; Motoyama et al., 1998). Ptc es una proteína integral de membrana, estructuralmente dividida en dos módulos, cada uno constituido por un lazo extracelular y seis dominios transmembrana; Hh se une físicamente a Ptc a través de los dos bucles extracelulares (Marigo and Tabin, 1996). Los dominios transmembrana del 2 al 6 del primer módulo forman un dominio SSD (Kuwabara and Labouesse, 2002; Torroja et al., 2005). El análisis de mutantes *ptc* muestra que la unión de Hh tiene dos efectos: activación de la señalización y secuestro del morfógeno. Estas dos funciones se pueden separar genéticamente: por ejemplo, el mutante *ptc^{S2}* internaliza a Hh pero no transduce la señal (Martin et al., 2001; Strutt et al., 2001), mientras que el mutante *ptc¹⁴* no secuestra a Hh pero sí señala (Torroja et al., 2004) (figura 15). La internalización de Hh por Ptc es dependiente de Dinamina y en el interior celular el complejo se dirige a la vía degradativa (Incardona et al., 2002; Torroja et al., 2004).

En vertebrados, otra proteína que interviene como un modulador negativo de la vía de Hh es la proteína Hhip (*Hedgehog interacting protein*). Esta es una glicoproteína de membrana que se une y secuestra al morfógeno (Chuang and McMahon, 1999; Coulombe et al., 2004)(Jeong and McMahon, 2005; Ochi et al., 2006). A diferencia de Ptc1, Hhip no internaliza a Hh sino que lo inmoviliza en la superficie celular e impide su interacción con el complejo de recepción y transducción de la señal (Jeong and McMahon, 2005).

Una función similar tendría GAS1 (*Growth arrest specific*), una proteína extracelular unida a la membrana por un residuo GPI (Mullor and Ruiz i Altaba, 2002). Se identificó como un regulador negativo del ciclo celular, que inhibía la proliferación de células en cultivo (Del Sal et al., 1992) y cuya falta de función en ratón producía un fenotipo propio de un antagonista de la vía de Hh (Lee et al., 2001). Ensayos de inmunoprecipitación indican una unión física, directa, entre Shh y Gas1, pero con una menor afinidad que la interacción entre Shh y Ptc o Hhip (Lee et al., 2001). GAS1 se considera otro modulador negativo de la vía de Hh, que retira al morfógeno del medio extracelular (Mullor and Ruiz i Altaba, 2002).

Megalin se caracterizó en vertebrados como una proteína que se expresa en células epiteliales polarizadas (Fisher and Howie, 2006). Es una proteína transmembrana, que pertenece a la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y se ha descrito que endocita esteroides de la dieta (Fisher and Howie, 2006). También se ha sugerido que une a Shh y lo endocita, pudiendo modular así el nivel de Shh extracelular (Fisher and Howie, 2006; McCarthy et al., 2002). Recientemente se ha identificado un homólogo en *Drosophila*, pero éste no parece intervenir en la internalización de Hh y los mutantes no muestran fenotipos de falta de Hh (Culí, Callejo y Guerrero, resultados no publicados).

Es importante señalar que, tanto la expresión de Ptc como la de Hhip son activadas por Hh (Chuang and McMahon, 1999), lo que significa que es el propio morfógeno quien modula su presencia en el medio. Como vimos anteriormente, esto es un mecanismo de mantener la robustez del gradiente: el morfógeno se degrada rápidamente en la zona de mayor actividad señalizadora (próximo a la fuente) y a una menor velocidad en el resto del tejido (Eldar et al., 2004).

Recepción y transducción de la señal

El sistema de recepción de la señal de Hh está constituido por las proteínas Ptc - ya descrita - Dally like (Dlp) - que será discutida en el apartado dedicado a los HSPG - y Ihog. En la membrana de la célula receptora también se localiza la proteína Smoothened (Smo), que es el transductor de la señal.

Los genes *ihog* (*interference hedgehog*) y *boi* (*brother of ihog*) de *Drosophila* se identificaron en un mapeo de genes (*screening*) mediante RNAi (Lum et al., 2003a). Codifican una glicoproteína de membrana que se caracteriza por tener dos dominios extracelulares del tipo Fibronectina III, a través de los que interacciona con Hh (Yao et al., 2006). Ihog actúa de manera sinérgica con Ptc en la unión de Hh, pero no interviene en la represión de Smo (Yao et al., 2006). En vertebrados se han identificado ortólogos de *ihog* y *boi*, denominados *cdo* y *boc*, con la misma función que las proteínas de *Drosophila* (Tenzen et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Smo es una proteína con siete dominios transmembrana, perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y emparentada con la familia de los receptores de Wnt, Frizzled, a través de su dominio rico en cisteínas (CRD) (Alcedo et al., 1996; Nusse, 2003; van den Heuvel and Ingham, 1996). En ausencia de Hh, Ptc

reprime la actividad de Smo; la consecuencia es que el factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci) (Gli en vertebrados) es escindido, generando la forma represora Ci⁷⁵, la cual entra en el núcleo e inhibe la expresión de los genes diana de la vía. La unión de Hh a Ptc inhibe la represión de Smo, Ci no se escinde y la forma activadora Ci¹⁵⁵ entra en el núcleo activando la expresión de los genes diana. (Ingham and McMahon, 2001) (figura 13).

Un proceso no aclarado es cómo Ptc reprime a Smo y cómo la unión de Hh a Ptc elimina esa represión. El modelo inicialmente propuesto – modelo estequiométrico – establecía que existe una unión física entre Ptc y Smo en la membrana plasmática. La unión de Hh a Ptc provocaría un cambio conformacional del complejo Ptc-Smo resultando en la activación de Smo (Stone et al., 1996). Sin embargo, hay una serie de evidencias que invalidan este modelo: no se consiguen complejos de coimmunoprecipitación Ptc-Smo (Incardona et al., 2002; Taipale et al., 2002), Ptc y Smo no colocalizan en inmunotinciones en el disco de ala de *Drosophila* (Denef et al., 2000). Además, niveles subestekiométricos de Ptc son suficientes para la regulación de Smo, lo que sugiere que Ptc actúa de manera catalítica para inhibir a Smo (Taipale et al., 2002).

Existe una relación entre la fosforilación de Smo, su acumulación en la superficie celular y su estado activado. La señal de Hh hace que Smo fosforilado se acumule en la superficie celular (Alcedo et al., 2000; Denef et al., 2000; Zhu et al., 2003) lo que se correlaciona con la transcripción de los genes diana de la vía. Mutantes de Smo oncogénicos se acumulan en la superficie celular (Zhu et al., 2003), mientras que mutantes que carecen de sitios de fosforilación, no se acumulan en la superficie celular en respuesta a Hh. La proteína quinasa A (PKA), junto con la caseína quinasa I (CKI) fosforilan la región C-terminal, intracelular, de Smo, activándolo y permitiendo la transducción de la señal. Esta fosforilación parece ser una condición suficiente para la activación de Smo (Apionishev et al., 2005; Jia et al., 2004; Zhang et al., 2004).

Se produce, por tanto, un tráfico intracelular de Smo dependiente de la señalización por Hh. Además se ha mostrado que Ptc promueve la endocitosis de Smo y que el bloqueo de este proceso, mediante un dominante negativo de Rab5, promueve la acumulación de Smo en la superficie de la célula (Zhu et al., 2003). Una evidencia aparentemente contradictoria es que, en células de mamífero en cultivo, Ptc y Smo se internalizan tras la activación de la vía, colocalizando en vesículas endocíticas; posteriormente se produce la segregación de Ptc y Smo, yendo los complejos Hh-Ptc a

degradación lisosomal y Smo a la superficie celular (Incardona et al., 2002). Por otro lado, la proteína Smo de mamíferos es fosforilada por GRK2, lo que promueve la asociación con β -arrestina y su internalización en vesículas recubiertas de clatrina (Chen et al., 2004b).

La ciclopatina es un alcaloide inhibidor del transporte vesicular de colesterol (regulado por NPC-1), que inhibe la vía de Hh mediante su unión directa a Smo (Chen et al., 2002; Taipale et al., 2000). Dado que Ptc tiene homología estructural con la familia RND de permeasas bacterianas (Taipale et al., 2002), se ha propuesto que Ptc actuaría como un transportador de pequeñas moléculas, siendo éstas agonistas o antagonistas de la actividad de Smo; así, la unión de Hh a Ptc abriría o cerraría la vía de paso de estas moléculas reguladoras (Taipale et al., 2002). En esta línea de argumentación, evidencias recientes indican que la secreción de la (pro-)vitamina D3 es mediada por Ptc y que ésta reprime a Smo a través de una interacción directa (Bijlsma et al., 2006). Así mismo, se ha propuesto a los oxisteroles como activadores de la señalización de Shh a través de su interacción con Smo (Corcoran and Scott, 2006), pero datos aún más recientes indican que los oxisteroles activarían la vía regulando la función de Smo pero no de forma directa, sino interfiriendo con la función de Ptc (Dwyer et al., 2007).

La transducción de la señal de Hh culmina en la activación del factor de transcripción Ci. En ausencia de Hh, la forma Ci¹⁵⁵ sufre una proteólisis para generar la forma represora Ci⁷⁵, que bloquea la expresión de las dianas de Hh. Para que ocurra el procesamiento, se requiere la previa hiperfosforilación de Ci por PKA, GSK3 β y CKI (Jia et al., 2002; Price and Kalderon, 1999; Price and Kalderon, 2002). Ci fosforilado une al factor Slimb, que induce la ubiquitinación y la consiguiente proteólisis mediada por el proteosoma (Ingham and McMahon, 2001; Jia et al., 2005; Smelkinson and Kalderon, 2006). Ci¹⁵⁵ se encuentra, en el citoplasma de la célula, formando parte de un complejo proteico que incluye a la kinesina Costal2 (Cos2) y a la Ser/Thr quinasa Fused (Fu) (Robbins et al., 1997). El complejo facilita la unión de las quinasas a su sustrato, actuando Cos2 a modo de armazón (Zhang et al., 2005). Independientemente, Ci¹⁵⁵ también se encuentra unido a la proteína Supresor of Fused Su(Fu), lo que impide la translocación de Ci¹⁵⁵ al núcleo (Methot and Basler, 2000; Wang et al., 2000). En presencia de Hh, se disocia el complejo Cos2-Ci¹⁵⁵-quinasas, inhibiéndose la fosforilación y el procesamiento de Ci¹⁵⁵ (Zhang et al., 2005). Además, a altos niveles

de Hh, Fu antagoniza la actividad de Su(Fu), lo que permite la translocación de Ci¹⁵⁵ al núcleo (figura 16).

¿Cómo se relaciona la activación de Smo con la activación de Ci? Smo transduce la señal de Hh mediante una interacción física con el complejo Cos2-Fu-Ci, a través de su dominio intracelular C-terminal (Jia et al., 2003; Lum et al., 2003b; Ogden et al., 2003; Ruel et al., 2003). La acumulación de Smo en la membrana arrastra al complejo de señalización intracelular, provocando su disociación (Zhang et al., 2005) (figura 16).

Un modelo simple de interpretación del gradiente de Hh estaría basado en la doble naturaleza del factor de transcripción Ci (Hooper and Scott, 2005). En ausencia de Hh, Smo está inactivado, Ci¹⁵⁵ es fosforilado y procesado y Ci⁷⁵ entra en el núcleo y reprime a los genes diana. A bajos niveles de Hh, Smo recluta el complejo de señalización intracelular en la membrana y éste se disocia, evitándose el procesamiento de Ci¹⁵⁵; la ausencia de represor activa la expresión de los genes de “bajos niveles” – *dpp* - pero Su(Fu) impide que Ci¹⁵⁵ entre en el núcleo. A altos niveles de Hh, se evita el procesamiento de Ci¹⁵⁵ y se activa Fu, que reprime a Su(Fu), posibilitando la entrada de Ci¹⁵⁵ en el núcleo y activando la expresión de *ptc* y *en*.

En vertebrados, los mediadores transcripcionales de la señalización son las proteínas Gli: Gli1, Gli2 y Gli3. Las dos primeras actúan como activadores y Gli3 como activador o represor en función del contexto celular (Bai et al., 2004; Motoyama et al., 2003), pero el mecanismo molecular de su procesamiento es similar al de Ci en *Drosophila*. A diferencia de *Drosophila*, parece que la proteína Smo de vertebrados no interacciona con los homólogos de Cos2, Kif7 y Kif27 (Katoh and Katoh, 2004) (Tay et al., 2005), desconociéndose por el momento de qué manera se conecta la activación de Smo con los componentes intracelulares de la vía.

En la transducción de la señal, destacan dos componentes ausentes en *Drosophila*: la proteína Iguana, que interviene en la translocación de Gli al núcleo (Sekimizu et al., 2004; Wolff et al., 2004) y la proteína de transporte vesicular Rab 23 (Eggenchwiler et al., 2001). Rab23 es el producto del gen *open brain (opb)* y es un regulador negativo de la vía de Hh: ratones homocigotos mutantes son letales embrionarios y presentan fenotipos característicos de una sobreactivación parcial de la vía de Hh, similares a una pérdida parcial de la función de Ptc (Eggenchwiler et al., 2001). Estudios de epistasia con dobles mutantes lo sitúan por debajo (*downstream*) de Smo y sugieren que es un regulador negativo de la actividad de Gli2 (Eggenchwiler et

al., 2006). Nosotros hemos abordado la función de Rab23 en *Drosophila* obteniendo mutantes nulos en el ortólogo de *Drosophila* de Rab23. Estos individuos mutantes son viables y fértiles, sin ninguna alteración en el fenotipo de la mosca (J.Sierra e I.Guerrero, datos no publicados).

Una característica específica de la señalización de Hh en mamíferos es el papel de los cilios en este proceso. Se ha descrito que Smo, Su(Fu) y las tres proteínas Gli se acumulan en estas estructuras y que Hh induce la translocación de Smo al cilio (Corbit et al., 2005; Haycraft et al., 2005). Además, un mutante oncogénico de Smo se localiza constitutivamente en el cilio, mientras que un mutante de Smo que carece de una secuencia que permite esta localización, no es capaz de activar la vía de Hh (Corbit et al., 2005). Es más, las proteínas de transporte intraflagelar (IFT), esenciales para el ensamblaje y mantenimiento de cilios y flagelos, se requieren para la señalización por Hh, en un paso entre Smo y los Gli (Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005). El modelo sugerido por estos datos es que las IFT juegan un papel permisivo en la vía de Hh, bien concentrando los componentes de la vía en una localización celular específica, de tal manera que el cilio sea la estructura celular donde se produzca la transducción de la señal y/o bien siendo éstas el eslabón que falta entre Smo y los Gli en vertebrados (Huangfu and Anderson, 2006).

Los Heparán Sulfato Proteoglicanos (HSPGs) en la vía de Hh

Los HSPGs son glicoproteínas de la matriz extracelular que modulan la actividad de los distintos morfógenos – Wnt/Wg, Hh, TGF β , FGF - (revisado en: Hacker et al., 2005; Lin, 2004; Tabata and Takei, 2004). Están constituidos por un núcleo proteico, al que se unen cadenas de heparán sulfato glicosaminoglicanos (HSGAGs) (Esko and Selleck, 2002; Haltiwanger and Lowe, 2004).

Las cadenas de HSGAG son polímeros de una unidad disacáridica, constituida por una molécula de N-acetil glucosamina y otra de ácido glucurónico; estas unidades se añaden secuencialmente a un tetrasacárido cebador, que está unido a un residuo de Ser del núcleo proteico (Esko and Selleck, 2002; Haltiwanger and Lowe, 2004). La biosíntesis de estas cadenas es llevada a cabo por glicosiltransferasas específicas, en un proceso que implica la iniciación, polimerización y modificación de la cadena (Hacker et al., 2005) (Lin, 2004; Spring et al., 1994) (figura 17).

Se han descrito tres clases de HSPGs, en función de la estructura de su núcleo protéico: 1) Los sindecanos, son proteínas transmembrana en las que las cadenas glucídicas se disponen en el extremo distal N-terminal y pueden tener alguna cadena de condroitínsulfato. 2) Los glipicanos, son proteínas globulares, estabilizadas por puentes disulfuro, que se unen a la membrana a través de un puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI); las cadenas glucídicas se localizan próximas a la membrana plasmática. 3) Los perlecanos, que son moléculas difusibles de la matriz extracelular (Hacker et al., 2005; Lin, 2004). Las tres clases de HSPGs están conservadas de vertebrados a nemátodos y en *Drosophila* se han descrito un sindecano (Sdc) (Johnson et al., 2006), dos glipicanos (Division abnormally delayed (Dally) y Dally-like (Dlp)) (Baeg et al., 2001; Khare and Baumgartner, 2000; Nakato et al., 1995) y un perlecano (Terribly reduced optic lobes (Trol)) (Datta, 1995; Voigt et al., 2002) (figura 18).

A partir de *screening* genéticos, se han identificado varios componentes de la síntesis de HSPGs, cuyas mutaciones afectan a las vías de señalización. Los genes *tout-velu* (*ttv*), *sister of tout-velu* (*sotv*) y *brother of tout-velu* (*botv*) codifican glicosiltransferasas específicas y son los homólogos en *Drosophila* de los genes de las Exostosinas (EXT) en vertebrados. Alteraciones en estos genes producen la patología hereditaria exostosis múltiple, que es un tipo de tumor benigno del cartílago del hueso (Zak et al., 2002). En *Drosophila*, mutantes nulos para el gen *ttv* son letales y tienen un fenotipo cuticular embrionario característico de los genes de polaridad segmental (The et al., 1999). Este y otros fenotipos observados, les atribuyen un papel en la señalización de Hh: así, clones de falta de función en el ala producen acercamiento de las venas L3-L4 y en clones en el borde A/P del disco de ala, la expresión de las dianas de Hh está restringida a la primera línea de células del clon adyacente al borde (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a). Además, HhNp no difunde a través de estos clones (Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Takei et al., 2004), mientras que la difusión de las formas mutantes de Hh, no modificadas por colesterol o palmítico, es independiente de *ttv* (Callejo et al., 2006; The et al., 1999). Por último, en clones de falta de función de *ttv* o *sotv* o *ttv-botv* en el compartimento P se detecta una bajada de los niveles de Hh, pero no se aprecia una disminución del nivel del transcrito en las células mutantes (Bornemann et al., 2004; Takei et al., 2004). Estos datos sugieren que los HSPG estabilizan a Hh en la matriz extracelular, de tal manera que son esenciales para la difusión restringida del morfógeno a través de ésta (Lin, 2004; Torroja et al., 2005).

En el caso de *dally* y *dlp*, la falta del segundo produce un fenotipo cuticular embrionario de polaridad segmental, que se ha asociado a una alteración en la recepción de Hh (Desbordes and Sanson, 2003)(Lum et al., 2003a). Esta función de *dlp* en la recepción, posiblemente formando un complejo con Ptc, o presentando Hh a Ptc, también se ha propuesto en el disco imaginal de ala al observarse que en clones dobles que a su vez expresan Hh, no se produce la activación de las dianas de altos valores *en* y *ptc* dentro del clon (Callejo et al. 2006). Sin embargo, los fenotipos observados en el ala en clones dobles mutantes *dally* y *dlp*, aunque similares, son menos penetrantes que los de los genes EXT (Han et al. 2004).

Otros genes relacionados con los HSPGs son: *slalom* (*sll*) y *fringe-connection* (*frc*), que codifican para proteínas transportadoras de moléculas necesarias para la biosíntesis (Luders et al., 2003; Selva et al., 2001); *sulfateless* (*sfl*), que codifica para una sulfotransferasa que modifica las cadenas de HSGAGs; y *sugarless* (*sgl*), que codifica para la enzima que cataliza la conversión de UDP-glucosa en UDP-ácido glucurónico (Lin, 2004). Los clones de falta de función de *sfl* en el disco de ala tienen fenotipos similares a los de los genes EXT (Han et al., 2004) (figura 19).

En resumen, las evidencias experimentales sugieren que los HSPGs son necesarios para la difusión y recepción del morfógeno: ambos procesos requieren la estabilidad de Hh en el espacio extracelular, proporcionada por la interacción con los HSPGs.

Por último, también se ha sugerido que los perlecanos serían moduladores de la vía de Hh. Perlecan, es un proteoglicano de la membrana basal, codificado por el gen *trol* en *Drosophila* (Voigt et al., 2002). Mutaciones en este gen se han asociado a fenotipos de alteración de la polaridad celular en las células epiteliales foliculares (Schneider et al., 2006) y de reducción de la proliferación de neuroblastos en el cerebro de la larva (Datta, 1995; Park et al., 2003). Se ha propuesto que *trol* regularía la proliferación de los neuroblastos modulando la señalización de las vías de Hh y FGF y se sugiere que podría afectar a la difusión o recepción de Hh (Park et al., 2003). En vertebrados, se le atribuye un papel en el cáncer de próstata, como modulador de Shh (Datta et al., 2006). Además, se encontró una interacción física entre Ptc y Perlecan en ensayos de doble híbrido (comunicación personal de la Dra. Anne Plessis (Hybrigenics)).

Los HSPGs no sólo modulan la actividad de Hh, sino también de otras moléculas difusibles— Wnt/Wg, TGFβ/Dpp, FGF - (revisado en: Hacker et al., 2005;

Lin, 2004; Tabata and Takei, 2004): la difusión restringida dependiente de HSPGs es un mecanismo común para generar un gradiente en los tres morfógenos. Se desconoce cómo se establece la especificidad de los HSPGs por los distintos ligandos.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la caracterización funcional y molecular del locus *shifted* (*shf*) de *Drosophila melanogaster*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Relacionar a *shf* con la vía de señalización de Hedgehog, a partir del análisis fenotípico de los alelos existentes.
- 2) Situar a *shf* dentro de la vía de señalización de Hedgehog, mediante análisis de epistasias y de interacciones génicas con otros componentes de esta vía.
- 3) Generar alelos mutantes para la localización genómica del locus, identificar la unidad de transcripción en la secuencia del genoma de *Drosophila* e identificar la proteína codificada por *shf*.
- 4) Analizar el patrón de expresión de *shf* durante el desarrollo.
- 5) Analizar el papel de la proteína codificada por *shf* en la vía de señalización de Hedgehog y su interacción con otros componentes de la vía, mediante ensayos de pérdida y ganancia de función.
- 6) Analizar las relaciones evolutivas y divergencias funcionales con otras proteínas homólogas.
- 7) Elaborar un modelo sobre la función de *shifted* a partir de la integración de los datos obtenidos.

RESULTADOS

El locus *shifted* (*shf*) y la vía de Hh

El locus *shifted* (*shf*) se describió por primera vez en 1916 (Morgan and Bridges, 1916). Por análisis de recombinación se mapeó en el cromosoma X (1-17.9) (Bateman, 1950) y por análisis citogenético en la región 6D1-E5 (Craymer and Roy, 1980; Demerec et al., 1942). Cuando se inició este trabajo existían tres alelos: el silvestre, *shf*² (Lindsley and Zimm, 1992) y *shf*⁹¹⁹ (Canal, 1988; Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990).

Los individuos *shf*² son viables homocigóticos y presentan el siguiente fenotipo adulto: alas de menor tamaño, acercamiento de venas L3 y L4, vena transversal anterior reducida o ausente, disminución del número de quetas escutelares, escutelum reducido, una única pinza en el último tarso y disposición alterada de algunos omatidios en el ojo compuesto (figura 20). El alelo *shf*⁹¹⁹ fue descrito como letal embrionario (Canal, 1988; Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990) aunque en nuestras manos se comporta como semiletal pupal. Algunos individuos hemocigotos consiguen llegar hasta adulto y su fenotipo es semejante al de las moscas *shf*². Ninguno de los alelos presenta fenotipo en el embrión.

El fenotipo de los alelos *shf* recuerda al de los alelos de genes que intervienen en la activación de la vía de Hh, como *smoothened* (*smo*), *fused* (*fu*) o *cubitus interruptus* (*ci*) (Ingham and McMahon, 2001). Para evaluar de manera directa la señalización de Hh en los alelos *shf*, examinamos la expresión de las dianas de Hh en el borde A/P del disco de ala, en el estadio de larva 3. Las dianas examinadas fueron *Ptc*, *Ci*, *Col* y *En* mediante detección de la proteína con su respectivo anticuerpo; y *dpp* mediante detección de la expresión del gen a través de un indicador lacZ (*dpp-lacZ*). En los discos silvestres, los genes *en*, *ptc*, *col* y *dpp* se expresan en una banda de 3, 5, 7 y 10 diámetros celulares respectivamente, a lo largo del borde A/P. Además, Hh induce la estabilización de la forma transcripcionalmente activa de *Ci* (*Ci*¹⁵⁵) y ésta se detecta en un rango de 10-15 diámetros celulares. En los discos de ala *shf*² se observa una disminución de los dominios de expresión de estos genes diana, lo que indica que la

señalización de Hh está alterada (figura 21). De aquí concluimos que *shf* es otro componente de la vía de Hh.

Caracterización molecular del locus *shf*

Localización genómica del locus *shf*

En el laboratorio se generaron escisiones imprecisas del elemento P EP1613 (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu>), que se localiza próximo a la región 6D1-E5 del cromosoma X. Como resultado se obtuvieron varias líneas con deleciones cromosómicas que tenían fenotipo *shf* al ponerse en heterocigosis sobre *shf*². La más pequeña de esas deficiencias, *Df(1)2.5*, cubría tres unidades de transcripción: el gen *COQ7*, que codifica una proteína requerida para el metabolismo de la ubiquinona (Tricoire, 1999); el gen *C3G* que codifica por un intercambiador de nucleótidos de guanina, que actúa sobre la familia de proteínas Ras (Ishimaru et al., 1999); y el gen *CG3135*, que codifica por una proteína ortóloga a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor-1) de vertebrados (Hsieh et al., 1999) (figura 22A).

Los individuos homocigotos para la deficiencia *Df(1)2.5* eran letales larvarios: los discos imaginales de ala de larva 3 eran más pequeños que los discos de individuos silvestres y la expresión de las dianas de Hh, Ptc y Ci, en el borde A/P del disco estaba reducida (figura 23A-B”). Mediante la expresión de cada uno de estos tres genes en individuos homocigotos para la deficiencia *Df(1)2.5* se procedió a discriminar cual de ellos rescataba el fenotipo que afectaba a la señalización de la vía de Hh.

El gen *COQ7* puede considerarse como un gen de la maquinaria celular (“housekeeping gene”) (Tricoire, 1999) cuya ausencia sería responsable de la letalidad, independientemente de los fenotipos observados. Del gen *C3G* estaba descrita una forma constitutivamente activa, que causaba sobreproliferación celular en el disco imaginal de ala (Ishimaru et al., 1999). Del gen *CG3135* no se tenía ninguna información funcional, por lo que generamos moscas transgénicas *UAS-CG3135* para sobreexpresar este gen.

Cuando sobreexpresamos el gen *CG3135* con una línea *GAL4* de expresión generalizada (*69B-GAL4*), en moscas con la deficiencia *Df(1)2.5*, obteníamos el rescate

de la expresión de Ptc y Ci en el borde A/P de compartimento, pero no se rescataba el tamaño de estos discos (figura 23C-C’'). Por el contrario, cuando sobreexpresábamos *C3G* con la misma línea *GAL4* en moscas *Df(1)2.5*, se recuperaba en un 80% el tamaño del disco, pero la expresión de Ptc y Ci en el borde A/P de compartimento estaba reducida (figura 23C-C’'). La expresión simultánea de *CG3135* y de *C3G* en las moscas *Df(1)2.5* rescataba casi por completo el tamaño del disco, así como la expresión de las dianas de Hh en el borde A/P de compartimento (figura 23E-E’'). Además, la sobreexpresión de *CG3135* en moscas *shf*² rescataba el fenotipo *shf* de acercamiento de venas L3 y L4 en el ala adulta (figura 24).

Concluimos que en la deficiencia *Df(1)2.5*, el gen afectado responsable de la disminución del tamaño del disco es *C3G*; y que el gen afectado responsable de la reducción de la señalización de la vía de Hh es *CG3135*. Así, el locus *shf* corresponde al gen *CG3135* del genoma de *Drosophila melanogaster*.

***Shf* codifica una proteína ortóloga a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor-1) de vertebrados**

La secuencia del cDNA (GH27042) del gen *CG3135* codifica una proteína de 456 aminoácidos que es ortóloga a la proteína WIF-1 de vertebrados (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu>). Esta es la única proteína con una homología de secuencia significativa en el genoma de *Drosophila*, tras realizar un análisis de comparación de secuencias por BLAST (FlyBase BLAST <http://flybase.bio.indiana.edu>). A partir de ahora nos referiremos a esta proteína como DmWIF.

DmWIF está constituida, desde su extremo N-terminal, por: un péptido señal, un dominio WIF, cinco dominios EGF en tandem, y una cola C-terminal hidrofílica (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q9W3W5>) (figura 22B).

El péptido señal permite la localización de la proteína desde el retículo endoplásmico a la membrana o al espacio extracelular.

El dominio WIF en *Drosophila* se ha descrito en las proteínas Derailed, (Bolwig et al., 1995) y Doughnut (Oates et al., 1998). Estos son receptores de membrana de la familia RYK (receptores tirosín-kinasa atípicos), constituidos por un dominio extracelular (el dominio WIF) y un dominio intracelular (un dominio kinasa y un dominio PDZ) (Halford and Stacker, 2001). Se ha demostrado que Derailed juega un

papel importante en la guía axonal, actuando como receptor de Wnt-5, independiente de Frizzled. La unión entre el ligando y el receptor se realiza a través del dominio WIF de este último (Yoshikawa et al., 2003).

En vertebrados, el dominio WIF se ha descrito en los receptores RYK y en las proteínas WIF-1 (Patthy, 2000). RYK interviene en procesos de guía axonal en ratón: une a Wnt1 y a Wnt3A a través del dominio WIF, y se forma un complejo ternario entre RYK, Wnt1 y Frizzled (Lu et al., 2004). La proteína humana WIF-1 es una proteína secretable que actúa como inhibidor de la vía de Wnt (Hsieh et al., 1999). Al inyectar su ARN en embriones de *Xenopus* se genera un eje secundario y una somitogénesis aberrante, fenotipos que revelan una alteración en la vía de Wnt. Al igual que su homólogo en *Drosophila*, está constituida por un péptido señal, un dominio WIF, cinco dominios EGF, y una cola C-terminal hidrofílica (Hsieh et al., 1999). “In vitro” se une a miembros de la familia Wnt, habiéndose probado su unión a Wg de *Drosophila* y a Wnt8 de *Xenopus*, lo que impide la unión de estos ligandos a Frizzled (Hsieh et al., 1999; Hunter et al., 2004). Así mismo, el dominio WIF por sí solo puede realizar la función de la proteína completa (Hsieh et al., 1999).

El dominio EGF es una secuencia de 30-40 aa que aparece en el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es característico del dominio extracelular de proteínas de membrana o secretables. Cada dominio EGF incluye 6 cisteínas que forman puentes disulfuro (Campbell et al., 1990).

Realizamos un análisis de homología de secuencias de aminoácidos entre las proteínas WIF-1 de vertebrados (humana, ratón, *Xenopus laevis* y pez cebra-*Brachydanio rerio*-) y DmWIF de *Drosophila melanogaster*. Utilizamos la base de datos de secuencias de proteínas UNIPROT (<http://www.ebi.uniprot.org>) y generamos el alineamiento de las secuencias con el programa CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>). Las proteínas de vertebrados resultaron tener una homología de secuencia (*score*) entre ellas de un 76%; entre DmWIF y HWIF-1, la homología de secuencia (*score*) es del 30%, lo que supone una homología elevada dada la distancia evolutiva entre ambos grupos animales (figura 25).

Caracterización molecular de los alelos mutantes para *shf*

Tras secuenciar la región codificante del gen, se detectó que el alelo *shf*² tiene una sustitución de la Cys 374 por una Ser (*TGC*→*TCC*) en el tercer dominio EGF (figura 22B), causa probable del fenotipo observado. También se encontró una delección de 13 nucleótidos (*GTGATCAGGATGG*) en el séptimo intrón.

El alelo *shf*¹⁹ tiene una sustitución de la Cys 363 por una Ser (*TGC*→*AGC*) en el tercer dominio EGF (figura 22B). También se detectó una sustitución en el codón 291 (*TGC*→*TCC*) que conserva el aminoácido original.

Posteriormente, dispusimos de una línea de moscas con una inserción P (*P{EY03173}*) (Bellen et al., 2004) que se localiza 20 nucleótidos antes del comienzo del tercer exón del *CG3135* (figura 22A). Esta línea es semiletal y los individuos hemicingotos que llegan hasta adulto tienen fenotipo *shf*. La escisión de este elemento P revierte por completo (13 de 14 líneas) el fenotipo mutante (Glise et al., 2005).

RNA de interferencia del gen *shf*

La interferencia de RNAm por RNA de doble cadena es un método utilizado con frecuencia para suprimir la expresión de un gen. (Fire et al., 1998; Mello and Conte, 2004) Consiste en introducir en el organismo una secuencia de RNA de doble cadena, homóloga a la del gen cuya expresión queremos suprimir. Mediante un mecanismo enzimático conservado en el reino animal (Sharp, 2001)(Kennerdell and Carthew, 1998), se generan fragmentos cortos de cadena sencilla de RNA (siRNA: “short interference RNA”) que aparearán con la secuencia complementaria del RNAm, resultando en la degradación de este último.

En nuestro caso, elegimos un fragmento de 220 nucleótidos del transcrito de *CG3135* (más detalles en Material y Métodos). El fragmento lo clonamos en el vector pUAS, según el protocolo de (Nagel et al., 2002). De esta manera podíamos suprimir la expresión de *shifted* en el lugar y momento que nosotros precisáramos, mediante el sistema UAS-GAL4 (Brand and Perrimon, 1993).

La sobreexpresión de UAS-DmWIF^{RNAi} con la línea de expresión generalizada en el el primordio del ala MD638-GAL4 reduce la distancia entre las venas 3 y 4 del ala del adulto, tal como ocurre en los mutantes *shf* (figura 26). Este dato confirma que el gen *shifted* codifica la proteína DmWIF.

Patrón de expresión del gen *shf*

El patrón de expresión de *shf* se analizó mediante hibridación “in situ” con una sonda de RNA específica, complementaria a la secuencia del RNAm del gen y marcada con digoxigenina (Tautz and Pfeifle, 1989).

En el disco imaginal de ala de larva 3, se detecta un alto nivel de expresión en la parte más anterior y posterior del disco, y una casi ausencia de expresión coincidiendo con el borde A/P de compartimento; lo mismo sucede en los discos de pata. En el disco de ojo, el nivel de expresión de *shifted* disminuye en la zona correspondiente al surco morfogenético (figura 27B).

En el embrión, *shf* se expresa de manera generalizada en el estadio de blastodermo, lo que indica el origen materno de ese transcrito. A medida que avanza la embriogénesis, se detecta en la epidermis y en el sistema nervioso central con un patrón segmentado, así como en el intestino anterior y posterior (figura 27A).

La distribución de la proteína endógena la pudimos estudiar gracias al anticuerpo suministrado por el grupo del Dr. Seth Blair (Glise et al., 2005). En el disco imaginal de ala de larva 3, el patrón de la proteína es similar al del transcrito, detectándose en la parte más anterior y posterior del disco, con un vano en la parte central. Además, se observa una modulación positiva de la proteína en el compartimento posterior que no se detecta en la “in situ”. Esto se explicaría por una mayor estabilización de la proteína en dicho compartimento, más que por una expresión diferencial del gen (figura 28A).

La expresión del transcrito en los alelos *shf²* y *shf⁹¹⁹* es igual que en el alelo silvestre (Glise et al., 2005), pero la proteína se distribuye de una manera difusa por la zona central del disco y carece de la modulación positiva en el compartimento posterior (figura 28B). Estos alelos pueden considerarse hipomorfos.

En el alelo *shf^{EY03173}*, no se detecta la expresión del transcrito (figura 27B) ni de la proteína en el disco de ala (figura 28C). Esto sugería que era un alelo nulo. Para verificarlo, comparamos la expresión del gen en el alelo afectado por la inserción y en el alelo silvestre, mediante RT-PCR. Para ello, aislamos el RNAm de moscas silvestres y mutantes, generamos el cDNA por retrotranscripción, y amplificamos por PCR los fragmentos de interés; como control interno analizamos la expresión de la histona H4 en

los dos alelos. El resultado fue la casi nula presencia del transcrito en el extracto celular del alelo mutante, lo que le confirmaba como alelo nulo (figura 29).

DmWIF es un factor difusible

El rescate del fenotipo *shf* tras sobreexpresar UAS-DmWIF, se produce no sólo con líneas GAL4 de expresión generalizada, sino también con líneas de expresión restringida al compartimento posterior del disco de ala (*hh-GAL4*) o al compartimento dorsal (*ap-GAL4*) (figura 24C). Al generar clones de falta de función con el alelo *shf*² en el disco de ala, la activación de las dianas de Hh no se ve afectada, independientemente de la localización y del tamaño del clon (figura 30A, A'). Parecía que las células silvestres próximas al clon mutante rescataban de manera no autónoma el fenotipo del clon *shf*. El efecto no autónomo de Dm-WIF sugería la posibilidad de que fuera un factor difusible, al igual que sucede con su homólogo en vertebrados.

Para comprobar esta hipótesis, generamos la proteína quimera “Yellow Fluorescent Protein (YFP)-DmWIF” (figura 30C). La YFP se fusionó entre el péptido señal y el dominio WIF, manteniendo el marco de lectura: de esta manera se garantizaba la funcionalidad del péptido señal y el transporte de la proteína a la membrana. YFP-DmWIF se clonó en el vector UAS y se generaron moscas transgénicas *UAS-YFP-DmWIF*. La sobreexpresión de la proteína quimera con distintas líneas *GAL4* rescataba el fenotipo *shf*, comportándose del mismo modo que la proteína silvestre.

Al sobreexpresar YFP-DmWIF en el compartimento dorsal del disco, con la línea *ap-GAL4*, la proteína también se detectaba en el compartimento ventral. Esto indicaba que era un factor secretable y difusible (figura 30B, B').

Decidimos comprobar si la localización de YFP-DmWIF era extracelular, ya que ello nos proporcionaría información acerca de una posible interacción con Hh u otras proteínas extracelulares. Para esto realizamos una incubación con anticuerpo anti-GFP sin detergente, previa a la fijación del tejido, y en frío para evitar la posible endocitosis de la proteína (Torroja et al., 2004). Bajo estas condiciones, el anticuerpo no puede atravesar la membrana plasmática y se une exclusivamente a los epítomos extracelulares. El resultado fue la colocalización del marcaje del anticuerpo con la fluorescencia de la YFP, lo que indica la localización extracelular de DmWIF (figura 30B).

Función de DmWIF en la vía de Hedgehog

Patched* es epistático respecto a *shifted

En una vía de señalización, se hace necesaria la organización jerárquica de los diversos componentes para interpretar su función dentro de la célula. En genética, esta jerarquización la realizamos a través del análisis de dobles mutantes que afecten a un mismo proceso.

En primer lugar, analizamos la interacción genética entre los alelos *shf*² y *ptc*¹⁶, que es un alelo nulo para el receptor de Hh. Se han descrito dos funciones para Ptc: bloquear la vía de señalización en ausencia del morfógeno, y secuestrar a Hh, regulando así su difusión (Torroja et al., 2004). Si generamos clones homocigotos para *ptc*¹⁶ en el borde A/P del disco de ala, no sólo se activan las dianas de Hh dentro del clon (*col*, en nuestro experimento), sino que también se observa señalización en las células silvestres anteriores al clon (figura 31A, A'). El primer efecto se explica porque en las células mutantes Ptc no puede bloquear la vía de Hh, estando constitutivamente abierta, independientemente de la presencia del morfógeno. Además, dado que la proteína Ptc mutante tampoco secuestra a Hh, éste difunde libremente a través del clon, señalizando en las células silvestres anteriores al mismo (Chen and Struhl, 1996).

Al realizar el mismo experimento en fondo *shf*², también se detecta la señalización dentro del clon *ptc*¹⁶ (figura 31B, B'), lo que indica que *ptc* es epistático respecto a *shf*; es decir, que DmWIF actúa por encima (“upstream”) de Ptc en la vía de señalización. Sin embargo, no se observa la activación de las dianas de Hh en las células silvestres anteriores al clon (figura 31B').

Un análisis similar lo realizamos con el alelo de *ptc*, *ptc*¹⁴, que no es capaz de secuestrar a Hh, pero que no tiene alterada su función de señalización (Torroja et al., 2004). En los clones *ptc*¹⁴ que se localizan en el borde A/P del disco de ala, no se activan constitutivamente las dianas de Hh, pero sí se extiende el gradiente del morfógeno, lo que produce una expansión del rango de activación de las dianas (en nuestro caso, el propio *ptc*) (figura 31C, C'). Sin embargo, en fondo *shf*², el rango de activación de las dianas (*ptc*) en los clones *ptc*¹⁴ es el mismo que en las células silvestres

(figura 31D, D'), lo que se interpreta como que en el doble mutante no se extiende el gradiente de Hh. De estos experimentos de clones de distintos alelos mutantes de *ptc* en fondo *shf*, se podría interpretar que *shf* intervendría en la producción o movimiento del morfógeno.

Para analizar si *shf* tiene alguna función en la recepción de Hh, generamos clones de expresión ectópica de Hh en discos mutantes *shf^{Df(1)2.5}* y analizamos la señalización mediante tinción inmunohistoquímica de la diana Engrailed, en los clones situados en el compartimento anterior. En un fondo silvestre, En se expresa dentro del clon y de manera no autónoma en las células silvestres adyacentes al clon, debido a la difusión de Hh (figura 31E, E'). En los discos *shf^{Df(1)2.5}*, la expresión de En se localiza en el interior del clon, pero no se detecta la señalización no autónoma (figura 31F, F'). Este dato confirma que en los mutantes *shf* la recepción no está afectada, pero sí la síntesis, secreción o difusión de Hh.

Por último, analizamos el patrón de Hh en clones de falta de función de Dispatched, en fondo *shf²*. Como ya dijimos en la introducción, Dispatched es una proteína de membrana, necesaria para la salida de Hh de la célula productora del morfógeno (Burke et al., 1999). En un fondo silvestre, Hh se acumula en la superficie de las células del clon (figura 31G, G'). En los discos *shf²* el resultado es el mismo, sin que se aprecie ninguna diferencia en los niveles de acumulación de Hh respecto a los de los clones *disp⁻* en fondo silvestre (figura 31H, H'). Este resultado sugiere que la secreción de Hh desde las células productoras no se ve afectada en los mutantes *shf*.

Interacción entre DmWIF y Hedgehog

Para estudiar si DmWIF afecta a la expresión endógena de *hh*, utilizamos moscas transgénicas que llevan la construcción *hh-lacZ* (Lee et al., 1992), es decir, el gen *lacZ* bajo el control de un elemento regulador ("enhancer") específico de *hh*. En estos individuos, la tinción con un anticuerpo anti-β-galactosidasa refleja la expresión del ARNm de *hedgehog*. En discos de ala de larva 3, no se observa ninguna diferencia en la tinción con anti-β-galactosidasa entre discos silvestres y discos mutantes *shf^{EY03173}* (figura 32A, A' y 32B, B'), lo que sugiere que DmWIF no afecta a la expresión endógena de *hh*. Para confirmar este dato, comparamos los niveles de transcripción de *hh* entre individuos silvestres y mutantes *shf^{EY03173}* mediante RT-PCR semicuantitativa.

Para ello, aislamos el RNAm de moscas silvestres y mutantes, generamos el cDNA por retrotranscripción, y amplificamos por PCR un fragmento correspondiente al transcrito de *hh*; como control interno analizamos la expresión de la histona H4 en los dos alelos. En ambos casos, la banda correspondiente al transcrito de *hh* tenía la misma intensidad (figura 32E), lo que confirmaba que DmWIF no afecta a la expresión de *hh*.

El que la transcripción del morfógeno no esté afectada, no implica la ausencia de una interacción entre ambas proteínas. Así, teñimos discos de ala de individuos silvestres y discos mutantes *shf*^{EY03173} con un anticuerpo contra la proteína Hh. En el disco imaginal de ala de un individuo silvestre, Hh se detecta en la superficie de las células del compartimento posterior, a lo largo del eje dorso-ventral del disco (Burke et al., 1999); en el caso del mutante *shf*^{EY03173}, la tinción con anti-Hh muestra una disminución generalizada de los niveles de proteína (figura 32A, A'' y 32B, B''). Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia con dos programas de tratamiento de imágenes, de manera independiente (Metamorph e ImageJ), y en ambos casos se detectó una reducción del 40% en los niveles de la proteína entre los discos silvestres y mutantes. Tras realizar secciones ópticas ortogonales del disco con el programa Metamorph, se observa que la disminución de la señal se produce de manera uniforme, tanto en la superficie apical como basolateral de las células de los discos mutantes (figura 32). En conclusión, DmWIF estabiliza a Hh en las células productoras del morfógeno.

Como ya señalamos anteriormente, en el compartimento posterior del disco de ala se observa una modulación positiva de la proteína DmWIF, que no se detecta en la "in situ" (figura 28A). Se aprecia el mismo efecto al sobreexpresar YFP-DmWIF en el compartimento dorsal con la línea ap-GAL4: la distribución de DmWIF-YFP que difunde al compartimento ventral no es uniforme, sino que la señal es más intensa en las células del compartimento posterior (figura. 30B'). Parecía, pues, que DmWIF se estabiliza en respuesta a algún factor exclusivo del compartimento posterior. Esto llevó a preguntarnos si la proteína Hh estabilizaría a DmWIF. Para comprobar esta hipótesis, teñimos discos homocigotos para el alelo *hh*^{ts2} (Ma et al., 1993) con anticuerpo anti-DmWIF. *hh*^{ts2} es un alelo termosensible, con una mutación puntual en la región N-terminal, que impide el correcto plegamiento de la proteína a la temperatura restrictiva: la proteína sintetizada no es funcional. Tras someter a estas moscas durante 24h a la temperatura restrictiva de 30°C, los discos presentaban una distribución de DmWIF similar a la observada en el alelo *shf*²: la proteína carece de la modulación positiva en el

compartimento posterior y desaparece el borde definido de expresión entre el compartimento anterior y posterior (figura 33). Por tanto, la acumulación de DmWIF en el compartimento posterior se debe a una estabilización de la proteína mediada por Hh.

La estabilización mutua entre ambas proteínas sugería que podía existir una interacción física entre ellas. La manera de comprobar esta idea en el tejido consiste en realizar una tinción extracelular con anticuerpo anti-Hh, en discos que expresen YFP-DmWIF y buscar una colocalización entre ambas proteínas. El resultado del experimento muestra una colocalización extracelular entre DmWIF y Hh en el compartimento posterior (figura 34A-A’’).

Para confirmar este dato, realizamos un ensayo bioquímico de inmunoprecipitación entre DmWIF y Hh. Para ello, obtuvimos un extracto proteico de glándulas salivares tras sobreexpresar YFP-DmWIF y Hh (*ABI-Gal4/UAS-Hh*, *UAS-YFPDmWIF*), incubamos este extracto con anticuerpo anti-GFP y se analizó mediante “Western blot”. Como control negativo, se corrió un extracto de proteínas de glándulas salivares de moscas *yw*, inmunoprecipitado con anti-GFP. Como control positivo, se corrió un extracto de proteínas de glándulas salivares que sobreexpresaban Hh (*ABI-Gal4/UAS-Hh*). Los tres “Western blot” se revelaron con anticuerpo anti-Hh. Tanto en el control positivo como en el ensayo experimental de inmunoprecipitación se obtuvieron dos bandas específicas, de 43kDa y de 19,5kDa, que correspondían a la forma completa y procesada, respectivamente, de Hh. Por el contrario, en el control negativo no aparecían estas dos bandas específicas. Las bandas inespecíficas corresponden a las inmunoglobulinas (figura 34B). Así, se concluye que Hh y DmWIF interaccionan físicamente.

DmWIF se requiere para la difusión de Hh

El papel de DmWIF en facilitar una correcta difusión del morfógeno, fue confirmado utilizando la proteína de fusión Hh-GFP, generada en el laboratorio y descrita en (Torroja et al., 2004). Esta quimera se comporta de manera equivalente a la proteína silvestre, difundiendo y señalizando del mismo modo que Hh endógeno.

Si sobreexpresamos Hh-GFP en el compartimento dorsal del disco de ala (*ap-GAL4/UAS-hhGFP*), la proteína también se detecta en el compartimento ventral como

resultado de su difusión (figura 35A, A'). En el compartimento anterior se observa un menor rango de Hh-GFP respecto al compartimento posterior (figura 35A'); esto se debe a la función de Ptc en anterior como regulador de la difusión de Hh. Así, las estructuras punteadas de Hh-GFP en el compartimento anterior corresponden a vesículas endocíticas de Hh internalizado por Ptc (figura 35A') (Torroja et al., 2004). Además, la tinción con anticuerpo anti-Ptc muestra la activación de las dianas en el territorio donde señala el morfógeno: Ptc se induce en la zona dorsal-anterior, que corresponde a las células que producen Hh-GFP; en un rango de ocho células ventrales del borde dorso ventral del compartimento anterior, que corresponde a la zona de difusión de Hh-GFP; y en las células del borde A/P, que corresponde a la zona de difusión de Hh endógeno (figura 35A'').

Sin embargo, si sobreexpresamos Hh-GFP en un fondo *shf²* (*shf²;ap-GAL4/UAS-hhGFP*), Hh-GFP no difunde al compartimento ventral (figura 35B, B'). La señalización mediada por Hh-GFP en las células del borde A/P y D/V se limita a la primera línea de células del borde de cada compartimento; mientras que la señalización correspondiente a las células que producen el morfógeno no se ve afectada (figura 35B'').

A partir de estos resultados, realizamos el experimento recíproco: la sobreexpresión de DmWIF en un individuo mutante para *shf* debería rescatar la difusión de Hh y, como consecuencia, la señalización del morfógeno en el borde A/P. Para este ensayo utilizamos como alelos nulos de *shifted* la deficiencia *Df(1)2.5* y la inserción *P shf^{EY03173}*, descritos en esta tesis.

En el primer caso, analizamos discos de larvas hemicigotas para la deficiencia en los que sobreexpresamos Hh-GFP ó Hh-GFP y DmWIF en el compartimento posterior (*Df(1)2.5;hhGAL4, hhGFP* ó *Df(1)2.5;hhGAL4, hhGFP/UAS-CG3135*). En los discos portadores de la deficiencia, no se detecta difusión de Hh-GFP desde las células productoras del compartimento posterior hacia el compartimento anterior, y el rango de la señalización (detectada con tinción con anticuerpo anti-Ptc) está restringido a la primera línea de células del compartimento anterior (figura 36D). En los discos que a su vez sobreexpresan DmWIF en el compartimento posterior, se detecta Hh-GFP en el compartimento anterior como resultado del rescate de su difusión; además se rescata la expresión de Ptc en el borde A/P de compartimento (figura 36E).

Con el alelo *shf*^{EY03173}, el resultado es equivalente: la sobreexpresión de DmWIF rescata la difusión de Hh-GFP en el compartimento anterior y, consecuentemente, la señalización (expresión de *ptc*) en el borde A/P de compartimento (figura 36A-C’’).

El conjunto de estos experimentos confirma tanto que DmWIF corresponde al locus *shf*, como que DmWIF se requiere para la difusión de Hh.

DmWIF sólo regula la difusión de Hh modificado por lípidos

Las modificaciones lipídicas de Hh son necesarias para la localización, difusión y señalización del morfógeno en el disco imaginal. Así, la difusión y señalización de Hh dependen de la interacción de la forma modificada por lípidos con los HSPG de la matriz extracelular (Callejo et al., 2006). A la vista de estos datos, nos preguntamos cuál sería la interacción de DmWIF con las formas de Hh no modificadas por lípidos. Para realizar los siguientes experimentos utilizamos las proteínas de fusión HhN-GFP y HhC85S-GFP generadas en el laboratorio y descritas en (Callejo et al., 2006): HhN carece de la modificación por colesterol, y HhC85S carece de la molécula de ácido palmítico en el extremo N-terminal (Porter et al., 1995) (Porter et al., 1996) (Pepinsky et al., 1998)

Sobreexpresamos HhN-GFP o HhC85S-GFP en el compartimento dorsal del disco de ala, con la línea *ap-GAL4*. La proteína se detecta por todo el compartimento ventral, sin restricción antero-posterior, como resultado de una difusión no controlada por los HSPG de la matriz extracelular y con una menor eficiencia por el receptor Ptc (figura 37A, A’ y C, C’) (Callejo et al., 2006). Así, las estructuras punteadas GFP corresponden a vesículas endocíticas de Hh internalizado, pero independientemente de Ptc en el caso de HhC85S y con una menor dependencia de Ptc en el caso de HhN (Callejo et al., 2006). La tinción con anticuerpo anti-Ptc muestra la activación de esta diana en el territorio donde señala el morfógeno: en el caso de HhN-GFP, Ptc se induce en la zona dorsal-anterior, que corresponde a las células que producen HhN-GFP y en todo el compartimento anterior, que corresponde a la zona de difusión de la proteína (figura 37A’’); sin embargo, HhC85S-GFP sólo señala debilmente, de manera autónoma, en las células que producen el morfógeno (figura 37C’’).

A diferencia de lo observado con Hh-GFP, en un fondo *shf*² obtenemos el mismo resultado que en un fondo silvestre; es decir, la ausencia de DmWIF no provoca

ningún efecto en la difusión ni en la señalización de un Hh que carece de una u otra modificación lipídica (figura 37B-B'' y D-D'').

Por tanto, concluimos que la función de DmWIF como regulador de la difusión de Hh sólo se produce sobre la proteína modificada por lípidos.

DmWIF no interviene en la difusión de Hh en el embrión

Los resultados obtenidos demuestran el papel de DmWIF en la difusión de Hh en el disco de ala larvario, pero nos quedaba resolver si DmWIF tenía la misma función en el embrión. Como ya se explicó en la introducción de esta tesis, Hh interviene en la generación del patrón segmental de la cutícula (Lee et al., 1992) (Tabata et al., 1992), de tal manera que la cutícula de los mutantes *hh* presenta un patrón segmental aberrante y en la que cada segmento está cubierto totalmente de dentículos (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980).

En el caso de DmWIF, ninguno de los mutantes *shifted* descritos presentaba fenotipo embrionario. Esto podría explicarse por el elevado componente materno del transcrito en el huevo, que rescataría la carencia del producto en el cigoto. En el embrión, el mRNA de *shf* se detecta de manera generalizada en el estadio de blastodermo, lo que indica el origen materno de ese transcrito (figura 27A).

Para resolver este problema recurrimos a la técnica de generación de clones en la línea germinal. Mediante esta técnica se generan oocitos homocigotos mutantes para el gen de interés, de tal manera que el cigoto resultante carece del aporte materno de ese producto (más detalles en el apartado Material y Métodos de esta tesis). En nuestro caso, generamos clones del alelo mutante *shf*^{EY03173} en la línea germinal. Los embriones obtenidos no presentaban alteraciones en la cutícula, lo que sugiere que ni el DmWIF cigótico ni el materno se necesitan durante el desarrollo embrionario.

Interacción entre DmWIF y los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs)

Como ya se comentó en la introducción, los HSPGs son glicoproteínas de la matriz extracelular que modulan la actividad de los distintos morfógenos – Wnt/Wg,

Hh, TGF β , FGF - (revisado en: (Hacker et al., 2005; Lin, 2004; Tabata and Takei, 2004)). De las tres familias que componen los HSPGs – sindecanos, glipicanos y perlecanos-, se han descrito interacciones específicas con la vía de Hh para los glipicanos y perlecanos (revisado en: (Hacker et al., 2005; Lin, 2004)). Los fenotipos observados en mutaciones en los enzimas responsables de las modificaciones sulfoglucídicas (*ttv*, *botv*, *sotv*, *sgl*, *sfl*), así como en el componente proteico de los glipicanos (*dally* y *dally-like*) son similares a los observados en los mutantes *shf* (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Takei et al., 2004; The et al., 1999) y dada la localización de DmWIF en la matriz extracelular, decidimos estudiar una posible interacción entre DmWIF y los heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs).

DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs

Puesto que ambos tipos de proteínas eran necesarias para la estabilización de Hh en la matriz extracelular, nos preguntamos si actúan de manera independiente o interaccionan entre sí para realizar esta función.

En discos de ala de larva 3, generamos clones de falta de función de *ttv* en un fondo silvestre o en un fondo mutante para *shf* y analizamos los niveles de Hh mediante inmunofluorescencia. En los clones *ttv*⁰⁰⁶⁸¹ en un fondo silvestre se detecta una bajada de los niveles de Hh dentro del clon, como ya se había descrito (Bornemann et al., 2004; Takei et al., 2004) (figura 38A-A''). Si los fenotipos *ttv* y *shf* fueran aditivos, en los clones *ttv* en fondo *shf* esperaríamos una bajada de los niveles de Hh en las células dobles mutantes de dentro del clon, respecto a los niveles de por sí reducidos de las células *shf* del resto del disco. Sin embargo, esto no ocurre y los niveles de Hh tanto dentro como fuera del clon son similares (figura 38B-B''). Este resultado sugiere que se requiere la interacción entre DmWIF y los HSPGs para la estabilización de Hh en la matriz extracelular.

Los HSPGs modulan los niveles de DmWIF

Analizamos si la ausencia de HSPGs afecta a los niveles de DmWIF. Para ello, generamos clones de falta de función de *ttv* en el disco de ala y teñimos con el

anticuerpo anti DmWIF. El resultado es una disminución de la señal de DmWIF dentro del clon, tanto en clones en el compartimento anterior como en el compartimento posterior del disco (figura 39A-A’’). Es importante destacar que la bajada de DmWIF se produce en ambos compartimentos, ya que se podría argüir que dicho descenso se debe al efecto indirecto que tiene la falta de *ttv* sobre Hh, dado que clones *ttv* en posterior inducen la bajada de niveles de Hh ((Bornemann et al., 2004; Takei et al., 2004) y figura 38), y que Hh modula positivamente a DmWIF (figura 32). Por tanto, la reducción de los niveles de DmWIF en clones *ttv* se debe a un efecto directo de los glipicanos sobre la estabilidad de DmWIF.

Por el contrario, la falta de DmWIF no tiene ningún efecto sobre los niveles de la proteína Dally-like. Esto lo comprobamos mediante una tinción con el anticuerpo anti Dally-like en discos hemicingotos *shf*^{EY03173} (figura 39B-C’’).

DmWIF colocaliza con los glipicanos

A la vista de estos resultados nos planteamos la posibilidad de una interacción física entre DmWIF y los glipicanos. Así, realizamos un ensayo de colocalización entre DmWIF y la proteína Dally-like: teñimos discos de ala con anticuerpos frente a ambas proteínas, marcados con diferentes fluoróforos. El resultado del experimento muestra una colocalización entre DmWIF y Dally-like en el compartimento posterior (figura 40).

Para confirmar este dato, intentamos un ensayo bioquímico de inmunoprecipitación entre DmWIF y Dally-like. Sin embargo, no pudimos llevar a cabo este experimento de manera concluyente, debido a que el anticuerpo anti Dally-like no marcaba la proteína en el control positivo de extracto de proteínas de glándulas salivares que sobreexpresaban Dally-like (*AB1-Gal4/UAS-dally-like*). Este hecho no es del todo inusual, ya que hay anticuerpos que detectan la proteína en inmunohistoquímica pero no en “Western blot”, o viceversa.

La sobreexpresión de Dly, pero no de Dally, rescata parcialmente la señalización de Hh en discos mutantes *shf*

La similitud de fenotipos en mutantes *shf* y en clones *ttv*, sugería realizar un experimento de rescate del fenotipo *shf* sobreexpresando HSPGs. Al sobreexpresar Dly en un fondo mutante *shf* (*shf^{EY03173};ap-GAL4;UAS-dly*), no se obtienen adultos. Analizamos el rango de distribución de Ptc y Ci por inmunofluorescencia, en discos de larva 3, y se aprecia un rescate parcial de la señalización en las células del borde A/P que sobreexpresan Dly (figura 41B-B’). Realizamos el mismo experimento con Dally y tampoco salieron adultos mutantes *shf* y que sobreexpresaran Dally. Sin embargo, no se rescata la señalización en las células *shf* del borde A/P que sobreexpresan Dally (figura 41C-C’). Este dato se suma a los ya publicados de que es Dly y no Dally el glicano que modula la vía de Hh (Fujise et al., 2001) (Han et al., 2004) (Nybakken et al., 2005) (Lum et al., 2003a) (Desbordes and Sanson, 2003).

Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala

Perlecan es un glicano de la membrana basal, codificado por el gen *trol* (*terribly reduced optic lobes*) en *Drosophila* (Voigt et al., 2002) (figura 42). Decidimos comprobar si Perlecan es necesario para la señalización de Hh en el disco de ala y su posible interacción con DmWIF.

El alelo *trol^{null}* (Voigt et al., 2002) es una delección de toda la zona codificante, causada por la escisión y recombinación de dos elementos P flanqueantes a ambos lados de la unidad de transcripción; es letal en larva 1 y no presenta fenotipo cuticular. Generamos clones de falta de función en discos imaginales de ala y analizamos el rango de distribución de Ptc por inmunofluorescencia: no se aprecia alteración de esta diana en las células del clon (figura 43A, A’).

Puesto que Perlecan es un factor secretable, quizás se producía un rescate no autónomo de las células mutantes *trol*. Analizamos discos imaginales del alelo *trol^{(1)G0271}* (Voigt et al., 2002), que es una inserción P en un intervalo de 500nt “upstream” del inicio de transcripción; este mutante es letal en larva 3 y tiene un fenotipo de reducción de lóbulos ópticos y discos imaginales muy pequeños. En estos discos tampoco se ven afectados el rango de distribución de Ptc y Ci (figura 43B, B’).

Paralelamente al análisis inmunohistoquímico, estudiamos las posibles interacciones genéticas entre *trol* y distintos componentes de la vía de Hh. Así, generamos los siguientes individuos transheterocigóticos: *trol^{null}/FM6*; *ptc^{G20}/+*,

trol^{null}/*FM6*; *smo*³/+, *trol*^{null}/*FM6*; *kn*/+, *trol*^{null}/*FM6*; *ttv*⁰⁰⁶⁸¹/+ y *trol*^{null}/*shf*^{EY037173}. Todos los fenotipos obtenidos fueron silvestres.

El patrón de expresión embrionario muestra un elevado componente materno del transcrito (Friedrich et al., 2000; Voigt et al., 2002), lo que podía rescatar la función del gen en los mutantes analizados. Para eliminar esta aportación decidimos generar un RNAi frente a *trol*. Elegimos un fragmento de 505 nucleótidos del *CG7981* (6201-6705) y lo clonamos en el vector pUAS, según el protocolo de (Nagel et al., 2002) (más detalles en Material y Métodos). Inactivamos la expresión del gen con la línea de expresión generalizada en el ala *MD638-GAL4* y no obtuvimos ningún fenotipo relativo a la vía de Hh, ni en adultos ni en tinciones de disco imaginal con Ci (figura 43C, C’).

Por último, analizamos el posible efecto de la sobreexpresión de Perlecan. Utilizamos el alelo *trol*^{EP(1)1160} (Voigt et al., 2002), que es una inserción P, en el mismo intervalo que l(1)G0271, con secuencia UAS, viable homocigoto y fértil y sin fenotipo aparente. La sobreexpresión con las líneas *Act5C-GAL4*, *Ap-GAL4*, *MD638-GAL4* o *hh-GAL4* no generó ningún individuo con fenotipo (figura 43D, D’).

De este conjunto de experimentos, concluimos que Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala.

Papel de DmWIF en la vía de Wg/Wnt

Todas las proteínas descritas hasta el momento que poseían un dominio WIF, modulaban la vía de Wg/Wnt (Bolwig et al., 1995; Hsieh et al., 1999; Yoshikawa et al., 2003) (Lu et al., 2004). Por tanto, resultaba procedente estudiar una posible interacción entre DmWIF y la vía de Wnt/Wg.

En los adultos supervivientes (“escapers”), hemocigotos para el alelo nulo *shf*^{EY03173}, no encontramos ningún fenotipo relacionado con la vía de Wnt/Wg, como, por ejemplo, hendiduras o alteración del patrón de quetas en el margen del ala (Chen and Struhl, 1999). Analizamos el patrón de expresión de Wg y de las dianas Dll y Cut en discos de ala de individuos *shf*^{EY03173} y *shf*^{Df(1)2.5} y no observamos ninguna alteración en la distribución de las proteínas, tras la inmunotinción con los respectivos anticuerpos (figura 44). En el caso de la sobreexpresión de DmWIF, utilizando un transgen *UAS-CG3135*, los individuos son 100% viables y de fenotipo silvestre.

Nos preguntamos qué función tendría la proteína humana WIF-1 en *Drosophila*, para lo que generamos moscas transgénicas portadoras de la proteína humana WIF-1 y la expresamos ectópicamente en el disco de ala, mediante el sistema *UAS-GAL4* (Brand and Perrimon, 1993). La primera observación es que la sobreexpresión de WIF-1 no rescata el fenotipo mutante *shf*. Sin embargo, la sobreexpresión de WIF-1 con las líneas *MD638-GAL4* o *hh-GAL4* da lugar a individuos con hendiduras en el margen del ala, fenotipo característico de una falta de función de Wg (figura 45A). Analizamos el patrón de expresión de Wg en discos de ala de individuos *hh-GAL4/UAS-WIF1* y se distingue una acumulación de Wg extracelular en el compartimento posterior, así como una disminución de las vesículas de internalización (figura 45B). Esta distribución del morfógeno concuerda con la función descrita de WIF-1 de secuestrar a Wg e impedir que se una al receptor, inactivando la vía de señalización (Hsieh et al., 1999).

De este conjunto de experimentos, concluimos que DmWIF y la proteína humana WIF-1 tienen una elevada homología de secuencia (descrita anteriormente en esta tesis (figura 25)), pero una función divergente: DmWIF es un componente de la vía de Hh, pero no modula la señalización por Wg en *Drosophila*; sin embargo, WIF-1 se comporta como un antagonista de la vía de Wg tanto en vertebrados como en *Drosophila*.

Análisis funcional de los dominios de DmWIF y de HWIF-1

A la vista de la divergencia funcional entre DmWIF y HWIF-1, consideramos necesario un análisis más detallado de ambas proteínas para explicar la causa de la discriminación entre la vía de Hh y de Wg. Para ello, generamos proteínas quimera intercambiando los dominios funcionales entre la proteína de *Drosophila* y la humana. Los transgenes generados fueron los siguientes (figura 46):

DmWIF^{ΔEGF}: forma de DmWIF en la que se han deletado los dominios EGF.

DmWIF^{ΔWIF}: forma de DmWIF en la que se ha deletado el dominio WIF.

DmWIF^{hWIF}: forma de DmWIF en la que se ha sustituido el dominio WIF de *Drosophila* por el dominio WIF de la proteína humana.

DmWIF^{hEGF}: forma de DmWIF en la que se han sustituido los dominios EGF de *Drosophila* por los dominios EGF de la proteína humana.

WIF-1^{DmWIF}: forma de WIF-1 en la que se ha sustituido el dominio WIF humano por el dominio WIF de la proteína de *Drosophila*.

Las construcciones fueron generadas mediante la técnica de “ Splicing by Overlapping Extension-PCR” (SOE-PCR) (Horton et al., 1989; Povelones and Nusse, 2005; Warrens et al., 1997), que consiste en generar moléculas de DNA recombinante a partir de fragmentos independientes y sin utilizar enzimas de restricción (para más detalles, consultar la sección de Material y Métodos de esta tesis). La ventaja reside en que no se está limitado por la presencia de dianas de restricción en los fragmentos a recombinar, lo que evita la generación de estas dianas y la modificación de la secuencia original. Las construcciones fueron clonadas en el vector pUAS, se generaron las correspondientes moscas transgénicas y se expresaron con diversas líneas *GAL4*.

La sobreexpresión de *DmWIF^{ΔEGF}* o *DmWIF^{ΔWIF}* no rescata el fenotipo *shf*; es decir, es necesaria la proteína completa para modular la vía de Hh. Por el contrario, en WIF-1, el dominio WIF por sí solo puede realizar la función de la proteína completa, antagonizando la señalización por Wnt/Wg (Hsieh et al., 1999).

La sobreexpresión de *DmWIF^{hWIF}* con la línea *hh-GAL4* no rescata el fenotipo *shf*, a diferencia de lo que ocurre con *DmWIF*, pero los individuos *DmWIF^{hWIF}/hh-GAL4* presentan hendiduras (“nicks”) en el margen del ala: es decir, *DmWIF^{hWIF}* no modula la vía de Hh, pero sí la de Wg. Por otro lado, los individuos *shf^{EY03173};WIF-1^{DmWIF}/hh-GAL4* no tienen fenotipo *shf* ni presentan “nicks” en el margen del ala: es decir, *WIF-1^{DmWIF}* rescata la señalización por Hh, pero no inhibe la vía de Wg. Lo mismo sucede con la sobreexpresión de *DmWIF^{hEGF}*: se rescata el fenotipo *shf* y no se genera un fenotipo *wg* (figura 46).

En resumen, la modulación de una vía o de otra se produce intercambiando sólo el dominio WIF. De aquí se concluye, que el dominio WIF es el responsable de la discriminación entre la vía de Wg y la de Hh, en la proteína humana y de *Drosophila*.

DISCUSIÓN

Papel de DmWIF en la vía de señalización de Hh

DmWIF es un nuevo componente de la vía de Hh y se requiere para la difusión del morfógeno

En el disco de ala, Hh tiene un doble papel: induce la expresión del morfógeno Dpp, pero también actúa como morfógeno de corto alcance *per se* y es la molécula señalizadora responsable de la formación de la vena L3 y del tejido comprendido entre las venas L3 y L4. La reducción de la señalización por Hh estrecha el dominio de expresión de su diana *col-kn* y, en consecuencia, el tamaño del tejido intervena entre L3 y L4 (Crozatier et al., 2002) (Mohler et al., 2000; Mullor et al., 1997; Strigini and Cohen, 1997; Vervoort et al., 1999). Así mismo, Hh induce la expresión de distintos genes en respuesta a los distintos niveles de concentración del morfógeno (Ingham and McMahon, 2001), por lo que la disminución de los dominios de expresión de estos genes diana es un indicador de que la señalización de Hh está afectada. Por lo tanto, el fenotipo de los alelos *shf* en el ala adulta, así como la disminución de los dominios de expresión de las dianas de Hh en el borde A/P del disco de ala en mutantes *shf*, nos permiten concluir que *shf* es un nuevo componente de la vía de Hh.

El siguiente paso era ubicar a *shf* dentro de la vía de señalización de Hh. La disminución de la expresión de los genes diana no sólo es característico de mutantes de genes que intervienen en la activación de la vía (*smo*, *fu* o *ci*) (Ingham and McMahon, 2001), sino que también se observa en mutantes que afectan a la liberación (*disp*) (Burke et al., 1999), difusión (*ttv*, *sfl*, *sgl*, *dally* y *dally-like*) (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Lum et al., 2003a; Takei et al., 2004; Takeo et al., 2005; The et al., 1999) o a modificaciones post-traduccionales del morfógeno (*ski*) (Amanai and Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Lee and Treisman, 2001; Micchelli et al., 2002).

Al realizar tinciones con el anticuerpo de Hh en discos mutantes para *shf* vimos que los niveles de proteína Hh eran más bajos que en discos silvestres, luego una posibilidad es que *shf* se requiriera para la transcripción de Hh. Se comparó el nivel del

tránsito en discos imaginales de individuos silvestres y mutantes, mediante análisis inmunohistoquímico del transgen *hh-lacZ* y mediante RT-PCR, obteniendo idéntico resultado: DmWIF no afecta a la expresión endógena de *hh*. Sin embargo, la tinción con anti-Hh sí que reflejaba una disminución generalizada de los niveles de proteína en los discos mutantes *shf*, lo que indicaba que DmWIF estabiliza a Hh en las células productoras del morfógeno. De manera recíproca, se produce una estabilización de DmWIF mediada por Hh, que se refleja en la modulación positiva de la proteína en el compartimento posterior del disco de ala. Esta estabilización mutua sugería que podía existir una interacción física entre ambas, dato que fue avalado al detectarse la colocalización en la matriz extracelular de DmWIF y Hh y con un posterior ensayo bioquímico de inmunoprecipitación entre DmWIF y Hh.

El análisis clonal de dobles mutantes *shf* y *ptc* nos indica que *ptc* es epistático respecto a *shf*, es decir, que DmWIF no interviene en la recepción de la señal ni en la transducción de la misma. A la misma conclusión nos permitió llegar el experimento de sobreexpresión de Hh en fondo mutante para *shf*: en un fondo silvestre, En se expresa dentro del clon (Callejo et al., 2006; Torroja et al., 2004) y lo mismo sucede en los discos *shf^{Df(1)2.5}*. La activación de las dianas (En) dentro del clon no se detectaría si *shf* interviniera en la recepción o en la transducción de Hh. Sin embargo, en los discos *shf^{Df(1)2.5}* del experimento anterior, no se detecta la señalización no autónoma de Hh, como ocurre en los discos silvestres debido a la difusión del morfógeno (Callejo et al., 2006; Torroja et al., 2004). Este dato sugería que era la secreción o difusión de Hh lo que se afectaba en ausencia de *shf*.

Por último, dado que *disp* codifica una proteína necesaria para la liberación de Hh desde la célula productora del morfógeno (Burke et al., 1999), justificaba el análisis clonal de dobles mutantes *shf* y *disp*. En clones de falta de función de *disp*, Hh se acumula en la parte externa de la membrana plasmática (Gorfinkiel, Callejo y Guerrero, datos no publicados). En clones *disp⁻* inducidos en discos *shf²* se observa la misma acumulación, lo que indica que DmWIF no interviene en la secreción de Hh desde las células productoras.

Los experimentos anteriores sugerían que la función de DmWIF en la vía de Hh sería la de facilitar una correcta difusión del morfógeno, pero las evidencias obtenidas eran indirectas, a través del mayor o menor rango de expresión de las dianas. El dato concluyente lo obtuvimos detectando la difusión del propio morfógeno en ausencia o

presencia de DmWIF. Para ello utilizamos la proteína de fusión Hh-GFP generada en el laboratorio y descrita en (Torroja et al., 2004); esta quimera se comporta de manera equivalente a la proteína silvestre, difundiendo y señalizando del mismo modo que Hh endógeno. Así, al sobreexpresar Hh-GFP en un fondo *shf*² no se detectaba Hh-GFP fuera del dominio de expresión de la proteína quimera, mientras que la señalización correspondiente a las células que producen el morfógeno no se veía afectada. Además, la sobreexpresión de DmWIF en un individuo mutante para *shf* rescataba la difusión de Hh-GFP y, como consecuencia, la señalización del morfógeno en el borde A/P. El conjunto de estos experimentos confirma que DmWIF se requiere para la difusión de Hh.

Los resultados obtenidos demuestran el papel de DmWIF en la difusión de Hh en el disco de ala larvario, pero nos quedaba resolver si DmWIF tenía la misma función en el embrión. En individuos silvestres, cada segmento embrionario está definido por un territorio de cutícula con dentículos y otro territorio de cutícula desnuda (Lawrence, 1992) (Hatini and DiNardo, 2001). Hh interviene en la generación del patrón segmental de la cutícula (Lee et al., 1992; Tabata et al., 1992), de tal manera que la cutícula de los mutantes *hh* no presenta un patrón segmental y está cubierta totalmente de dentículos (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Sin embargo, ninguno de los mutantes *shifted* descritos presentaba fenotipo embrionario. Esto podría explicarse por el elevado componente materno del transcrito en el huevo, que rescataría la carencia del producto en el cigoto. Para eliminar el componente materno generamos clones del alelo mutante *shf*^{EY03173} en la línea germinal. Los embriones obtenidos no presentaban alteraciones en la cutícula, lo que indica que ni el DmWIF cigótico ni el materno se necesitan durante el desarrollo embrionario. Este dato, aparentemente contradictorio con la función de DmWIF en el disco de ala, se explica si tenemos en cuenta que no se requiere una difusión de Hh a larga distancia para señalizar en el embrión: ni siquiera sería necesaria la secreción de Hh, siendo suficiente el contacto entre la célula que presenta Hh y la célula receptora para su señalización, dado que ésta se produce a 1-2 diámetros celulares de la fuente de Hh.

DmWIF modula la difusión de Hh modificado por lípidos

En las células productoras, Hh sufre una autoproteólisis y es modificado por un residuo de colesterol en el extremo C-terminal del fragmento N, dando lugar a la molécula activa -HhNp- (Porter et al., 1996; Porter et al., 1995). La modificación por colesterol supone el anclaje estable de HhNp a la superficie celular (Peters et al., 2004) lo que explica que la forma mutante no modificada por colesterol -HhN- tenga un mayor rango de difusión y señalización que HhNp en el disco imaginal (Burke et al., 1999; Callejo et al., 2006).

HhNp requiere la actividad de otros dos componentes para su difusión: los HSPGs de la matriz extracelular (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Takei et al., 2004; The et al., 1999) y *disp*, que codifica una proteína de membrana en las células productoras de Hh (Burke et al., 1999; Gallet et al., 2003). HhNp no difunde a través de células mutantes *ttv* (Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Takei et al., 2004) y no se libera de células mutantes *disp*, acumulándose en su superficie (Burke et al., 1999; Gallet et al., 2003). Sin embargo, la forma mutante no modificada por colesterol (HhN) tiene menor capacidad de señalización, pero su secreción y difusión son independientes de *disp* (Burke et al., 1999) y de *ttv*, respectivamente (Callejo et al., 2006; The et al., 1999).

Hh sufre otra modificación lipídica: la unión de una molécula de ácido palmítico a la Cys N-terminal, catalizada por una acil transferasa codificada por el gen denominado *skinny-hedgehog*, *sightless*, *central missing* o *raspberry* (Amanai and Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Lee and Treisman, 2001; Micchelli et al., 2002). La carencia de esta modificación (HhC85S) reduce la capacidad señalizadora de la proteína aun más que la falta de colesterol, mostrando también un mayor rango de difusión que HhNp y es independiente de la función de *ttv* (Callejo et al., 2006; Chamoun et al., 2001; Gallet et al., 2003).

Se justificaba así el análisis de la interacción de DmWIF con las formas de Hh no modificadas por lípidos -HhN-GFP y HhC85S-GFP-. A diferencia de lo observado con Hh-GFP, en un fondo *shf*² obtenemos el mismo resultado que en un fondo silvestre; es decir, la ausencia de DmWIF no produce ningún efecto en la difusión ni en la señalización de Hh sin lípidos, situación semejante a la que ocurre con los HSPGs. Sería interesante realizar ensayos de coimmunoprecipitación entre HhN o HhC85S y DmWIF: si no se detecta coimmunoprecipitación entre las formas de Hh no modificadas por lípidos y DmWIF nos confirmaría que la estabilización de Hh mediada por DmWIF se realiza a través de las modificaciones lipídicas del primero.

DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs en la matriz extracelular

Los fenotipos observados en mutaciones en los enzimas responsables de las modificaciones sulfo-glucídicas (*ttv*, *botv*, *sotv*, *sgl*, *sfl*), así como en el componente proteico de los glicanos (*dally* y *dally-like*), les atribuyen un papel en la estabilidad de Hh en la matriz extracelular, en la difusión del morfógeno a través de ésta y en la recepción de la señal (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Callejo et al., 2006; Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Lum et al., 2003a; Takei et al., 2004; Takeo et al., 2005; The et al., 1999). Los fenotipos característicos de estos mutantes, en el ala o en el disco de ala, son: acercamiento de venas L3-L4, señalización restringida a la primera línea de células en clones de falta de función en el borde A/P o ausencia de difusión de Hh a través de estos clones pero sin efecto sobre Hh no modificado por lípidos (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Takei et al., 2004; The et al., 1999). Estos fenotipos eran los mismos que los observados en la falta de función de *shf*.

Por otro lado, al igual que sucede con *shf*, el papel de los HSPGs no se limita al compartimento anterior del disco, donde ocurre la señalización, sino que también intervienen en la estabilización de Hh en el compartimento posterior, donde se produce el morfógeno. Así, en clones de falta de función de *ttv* o *sotv* o *ttv-botv* en dicho compartimento se detecta una bajada de los niveles de Hh, pero no se aprecia una disminución del nivel del transcrito en las células mutantes (Bornemann et al., 2004; Takei et al., 2004). Lo mismo sucede con los glicanos *dally* y *dally-like* (datos no publicados).

Este paralelismo entre la función de los HSPGs y DmWIF sobre la difusión de Hh nos condujo a proponer que es la interacción entre los tres componentes la que estabiliza al morfógeno en el epitelio, restringiendo su difusión y posibilitando la formación de un gradiente, dando como resultado una señalización correcta.

El mecanismo de la interacción entre DmWIF, HhNp y los HSPGs podría ser de diferentes maneras: bien que DmWIF module la actividad o los niveles de HSPGs lo que repercutiría en la interacción Hh-HSPGs en la matriz extracelular, o que Hh necesite de la presencia de las dos moléculas (HSPGs y DmWIF) para estabilizarse y

difundir en la matriz extracelular, o que DmWIF actúe como factor específico de unión de Hh a los HSPGs.

La posibilidad de que DmWIF modulara los niveles de HSPGs sería consecuente con la localización de DmWIF en la matriz extracelular, sin embargo, tras la tinción con anti-Dly en mutantes *shf* se comprobó que la falta de DmWIF no tiene ningún efecto sobre los niveles de la proteína Dally-like. Al realizar el experimento recíproco -clones de falta de función de *ttv* y tinción con anti-DmWIF- observamos que la ausencia de HSPGs afecta a los niveles de DmWIF tanto en el compartimento A como en el P del disco de ala. Además, el análisis de epistasia de dobles mutantes *shf* y *ttv* mostraba que los fenotipos *ttv* y *shf* no eran aditivos. Por último, hemos detectado la colocalización entre DmWIF y Dally-like en la matriz extracelular.

Estos datos sugieren que la estabilización de Hh por los HSPGs ocurre a través de DmWIF: DmWIF se uniría a Hh y a los HSPGs, estabilizando la interacción entre ambas moléculas (figura 47).

Los HSPGs no sólo modulan la actividad de Hh, sino también de otras moléculas difusibles- Wnt/Wg, TGF β /Dpp, FGF - (revisado en: Hacker et al., 2005; Lin, 2004; Tabata and Takei, 2004): la difusión restringida dependiente de HSPGs es un mecanismo común para generar un gradiente en los tres morfógenos. Permanece una incógnita cómo se establece la especificidad de los HSPGs por los distintos ligandos. Además, la mayoría de las interacciones descritas hacen referencia a la falta de función de los enzimas responsables de las modificaciones sulfo-glucídicas (*ttv*, *botv*, *sotv*, *sgl*, *sfl*), que afectarían al “pool” total de HSPGs, o a la falta de función simultánea de los glipicanos Dally y Dally-like. Un dato relevante por conocer y que estamos estudiando actualmente en el laboratorio, es si existe una actividad diferencial de cada HSPG en modular la vía de Hh, pudiendo ser DmWIF el factor que otorgara especificidad a ese HSPG por Hh.

Dally interviene en las vías de Wg y Dpp (Fujise et al., 2003; Jackson et al., 1997; Lin and Perrimon, 1999; Tsuda et al., 1999) (Han et al., 2005) (Belenkaya et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2006) (Takeo et al., 2005). Ni la falta de función ni la sobreexpresión presentan fenotipos en el ala adulta relacionados con la vía de Hh, aunque recientemente se ha descrito que la expresión ectópica de una construcción de Dally no unida a membrana (Dally-sec) aumenta el rango de activación de las dianas y disminuye la presencia del morfógeno en el dominio de sobreexpresión (Takeo et al., 2005). Los autores proponen que Dally-sec podría proporcionar una mayor “superficie

de estabilización” lo que aumentaría el rango de distribución de Hh, o por el contrario, que se uniera a Hh e impidiera su interacción con los componentes de la matriz extracelular eliminando su difusión restringida (de manera similar a lo que sucede con HhN) (Takeo et al., 2005). Otra posible explicación sería que la expresión ectópica de Dally-sec alterara la estructura de la matriz extracelular impidiendo la estabilización de Hh. En el laboratorio estamos generando clones de falta de función y de sobreexpresión de Dally para estudiar su efecto sobre DmWIF, Hh y las dianas del morfógeno. También sería interesante comprobar mediante métodos bioquímicos (p.ej. inmunoprecipitación) si existe o no una interacción física entre Dally y DmWIF y/o Hh y Dally. Por último, convendría analizar el efecto que tendría la expresión ectópica de Dally-sec sobre DmWIF.

La falta de función o la sobreexpresión de Dally-like afecta a la señalización mediada por Wg (Hufnagel et al., 2006; Kirkpatrick et al., 2004) (Franch-Marro et al., 2005) (Han et al., 2005; Kreuger et al., 2004) (Baeg et al., 2001). En el embrión y en células en cultivo, Dly también se requiere para la transducción de la señal de Hh (Desbordes and Sanson, 2003) (Lum et al., 2003a) y adultos homocigotos para el alelo nulo dly^{MH20} presentan un fenotipo de acercamiento de venas L3 y L4 en el ala, característico de la vía de Hh (Franch-Marro et al., 2005). A la vista de estos datos y dada la posible interacción entre DmWIF, HhNp y los HSPGs realizamos un experimento de rescate del fenotipo *shf* sobreexpresando Dly. El resultado previsto sería la ausencia del rescate, ya que todo apunta a que es necesaria la interacción entre DmWIF y los HSPGs para la estabilización de Hh. Sin embargo, se producía letalidad larvaria y un rescate parcial de la señalización en las células del borde A/P del disco que sobreexpresan Dly. Este resultado presenta dos contradicciones: ¿cómo es que no aparecen adultos si Dly rescata la señalización de Hh?, ¿cómo es que Dly rescata la señalización de Hh si es necesaria la interacción entre DmWIF y los HSPGs para la estabilización del morfógeno? La letalidad puede deberse a la sinergia entre el efecto que el alelo *shf* tiene sobre la vía de Hh y el efecto que la sobreexpresión de Dly tiene sobre la vía de Wg (Baeg et al., 2001; Franch-Marro et al., 2005; Giraldez et al., 2002; Han et al., 2005; Hufnagel et al., 2006). El rescate parcial de la señalización no resulta tan contradictorio, sino que matizaría la hipótesis inicial: la interacción entre DmWIF y los HSPGs permite una estabilización óptima de Hh, lo que no significa que Hh no se pueda unir inespecíficamente a componentes de la matriz extracelular que estén en exceso, resultando en la estabilización del morfógeno. La siguiente cuestión a debatir

sería el experimento recíproco: ¿puede DmWIF rescatar la falta de HSPGs?; para responder a esta pregunta, mediante el sistema MARCM (Lee and Luo, 1999) estamos generando clones de falta de función de *dally*, *dly*, *dally-dly*, o *ttv* y sobreexpresando DmWIF dentro del clon y así analizar la presencia de Hh y la activación de las dianas. A priori la respuesta sería negativa, ya que se necesitarían los HSPGs para la estabilidad de DmWIF. Igualmente, estamos generando clones de falta de función y de sobreexpresión de *Dly* para estudiar su efecto sobre DmWIF, Hh y las dianas del morfógeno en el disco silvestre. Así mismo realizaremos experimentos de inmunoprecipitación para comprobar la interacción física entre *Dly* y DmWIF y/o *Dly* y Hh.

Por último, también se ha sugerido que los perlecanos serían otros componentes de la vía de Hh. Como vimos en la Introducción, Perlecan es un proteoglicano de la membrana basal, codificado por el gen *trol* en *Drosophila* (Voigt et al., 2002). Se le ha atribuido una función de modulador de la señal de Hh en el proceso de proliferación de neuroblastos, sugiriéndose que podría afectar a la difusión o recepción de Hh (Park et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican que Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala. Esta discrepancia en el papel de *trol* podría deberse a una redundancia de los HSPGs en la matriz extracelular del disco: la falta de Perlecan sería reemplazada por la presencia de *Dally* y/o *Dally-like*. Por otro lado, no está descrita la presencia de *Dally* o *Dally-like* en los neuroblastos por lo que, en este tejido, Perlecan podría tener el papel que los glicicanos tienen en el epitelio del disco de ala en la estabilización de Hh.

Divergencia evolutiva de las proteínas DmWIF y HWIF-1.

Todas las proteínas descritas que poseen un dominio WIF, modulan la vía de Wg/Wnt. Así, la proteína humana HWIF-1 actúa como inhibidor de la vía de Wnt (Hsieh et al., 1999): la expresión ectópica en embriones de *Xenopus* mimetiza el fenotipo de bloqueo de XWnt8 e “in vitro” se une a Wg de *Drosophila* y a Wnt8 de *Xenopus*. Se considera que su modo de actuación “in vivo” sería secuestrar a Wnt impidiendo su unión al receptor Frizzled; en este caso, el dominio WIF puede realizar la función de la proteína completa (Hsieh et al., 1999; Hunter et al., 2004). Además, si se

sustituye el dominio extracelular CRD (“Cysteine Rich Domain”) de Frizzled por el dominio WIF de HWIF-1 se consigue reconstituir un receptor de Wg/Wnt funcional (Povelones and Nusse, 2005), hecho que no ocurre si se sustituye el dominio CRD de Frizzled por el dominio CRD extracelular de Smo (Povelones and Nusse, 2005; Wu and Nusse, 2002). El receptor de membrana de la familia RYK, Derailed, actúa como receptor de Wnt-5 de *Drosophila*, independiente de Frizzled y la unión entre el ligando y el receptor se realiza a través del dominio WIF de este último (Bolwig et al., 1995; Yoshikawa et al., 2003). En vertebrados, RYK une a Wnt1 y a Wnt3A a través del dominio WIF, y se forma un complejo ternario entre RYK, Wnt1 y Frizzled (Lu et al., 2004).

En el caso de la falta de función o de la expresión ectópica de DmWIF, no encontramos ningún fenotipo relacionado con la vía de Wnt/Wg: ni en adultos, como por ejemplo hendiduras o alteración del patrón de quetas en el margen del ala (Chen and Struhl, 1999), ni en el patrón de expresión de Wg, ni en el de sus dianas. Por el contrario, la expresión ectópica de HWIF-1 en el disco de ala no sólo no rescata el fenotipo *shf*, sino que los individuos que portan la construcción presentan hendiduras en el margen del ala y una distribución de Wg alterada en el epitelio del disco. Este fenotipo concuerda con la función descrita de HWIF-1 de secuestrar a Wg e impedir que se una al receptor, inactivando la vía de señalización (Hsieh et al., 1999). Por tanto, DmWIF y la proteína humana WIF-1 tienen una elevada homología de secuencia, pero una función divergente: DmWIF es un elemento de la vía de Hh, pero no modula la señalización por Wg en *Drosophila*; sin embargo, WIF-1 se comporta como un antagonista de la vía de Wg tanto en vertebrados como en *Drosophila*. Estos datos indican que la diferencia funcional entre DmWIF y HWIF-1 no se debe a diferencias en el ambiente en el que se expresan, sino a características distintas de las propias proteínas. La variación tiene que ser sutil para mantener la elevada homología de secuencia, pero suficiente para dar lugar a dominios funcionales distintos, específicos para cada vía de señalización.

Generamos proteínas quimera, intercambiando los dominios funcionales entre la proteína de *Drosophila* y la humana, para localizar el dominio responsable de la unión a ligando y de la discriminación entre la vía de Hh y la de Wg. Los resultados muestran que la modulación de una vía o de otra se produce intercambiando sólo el dominio WIF, concluyendo que éste es el dominio responsable de la especificidad por el morfógeno. Dado que en los mutantes hipomorfos de DmWIF está afectado el dominio EGF,

postulamos que este dominio es necesario para la difusibilidad del complejo WIF-ligando, quizás a través de su interacción con los HSPGs.

¿Cuáles son las diferencias estructurales entre los dominios WIF de la proteína humana y de *Drosophila*, para explicar la diferente afinidad por los distintos morfógenos? En un reciente estudio se describe la estructura tridimensional del dominio WIF de HWIF-1, por espectroscopía NMR (Liepinsh et al., 2006). Se destaca la existencia de un sitio de unión a cadenas alifáticas, conservado en todas las proteínas con dominio WIF. Así, se atribuye al dominio WIF la unión al ligando palmitoilado – Wnt o Hh –, lo que coincide con nuestros datos “in vivo”. En los dominios WIF de las proteínas que unen a Wnt (RYK, HWIF-1, Derailed, Doughnut), además se conserva un tripéptido de carácter ácido, adyacente al sitio de unión del palmítico, complementario a un octapéptido básico situado junto a la Cys palmitoilada de Wnt: este triplete está modificado en DmWIF, concretamente en el aminoácido 30 se produce una sustitución de un residuo ácido (Asp o Glu) por un residuo básico (Arg). Igualmente, DmWIF presenta un bucle entre los aminoácidos conservados Leu25 y Gly26 ausente en el resto de proteínas WIF (figura 48). Entre nuestros planes a corto plazo está realizar una mutagénesis dirigida e intercambiar estas secuencias en DmWIF y HWIF-1 y analizar la capacidad de las proteínas mutagenizadas de rescatar el fenotipo *shf* y/o de generar un fenotipo *wg*. Estos experimentos se completarían con ensayos de coimmunoprecipitación entre las proteínas mutagenizadas y Wg o Hh.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún mutante de falta de función de la proteína WIF-1 en vertebrados, por lo que además de su papel como modulador negativo de Wg, no podemos descartar que intervenga en la señalización mediada por Hh. Sería interesante hacer transgénicos de pez cebra o *Xenopus* que expresen DmWIF y analizar si rescatan fenotipos *hh*.

Si WIF-1 no es un elemento de la vía de Hh, ¿existe en vertebrados un homólogo funcional de DmWIF? Por análisis de secuencias, no hemos detectado ningún otro homólogo de *shifted* aparte de WIF-1. Sin embargo, como ya se comentó en la Introducción, en pez cebra se ha descrito el gen *you* que codifica la proteína ortóloga a Scube2 de mamíferos (Hollway et al., 2006) (Woods and Talbot, 2005) (Kawakamui et al., 2005) y es una glicoproteína extracelular asociada a membrana. Experimentos de epistasias y transplantes evidencian que You interviene en la matriz extracelular, en el dominio de las células receptoras, posiblemente en el transporte o estabilización de Hh

y que podría interactuar con componentes de la matriz extracelular (Woods and Talbot, 2005).

Asociación de las proteínas WIF a patologías humanas

La modulación negativa de las vías de señalización a través de factores extracelulares específicos, que actúan sobre la propia molécula señalizadora o sobre su receptor, es un mecanismo que aporta un nivel más de complejidad y de precisión en la regulación de la actividad de estas vías.

En el caso de Wnt, en vertebrados, se han descrito la familia de las sFRP (“secreted Frizzled Related Proteins”) y Cerberus (sólo en *Xenopus*), además del propio HWIF-1, que se unen a Wnt impidiendo su unión al receptor Frizzled (Kawano and Kypta, 2003) (Jones and Jomary, 2002). Un mecanismo de inhibición diferente lo realiza la proteína Dickkopf (Dkk), que se une al correceptor Lrp5/Lrp6, induciendo la endocitosis del receptor (Kawano and Kypta, 2003). Estas proteínas son exclusivas de vertebrados. En *Drosophila*, se ha sugerido que el gen *notum/wingful* codifica una hidrolasa secretable que rompería específicamente a Dly por su unión GPI a membrana, liberando la proteína unida a Wg; esto determinaría la señalización en gradiente del morfógeno mediante la modulación negativa de la señal en su lugar de expresión. (Gerlitz and Basler, 2002; Giraldez et al., 2002; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004).

En la vía de Hh en vertebrados, ya hemos comentado el papel de Hhip (Chuang and McMahon, 1999; Coulombe et al., 2004; Ochi et al., 2006), GAS1 (Mullor and Ruiz i Altaba, 2002) (Lee et al., 2001), Megalin (Fisher and Howie, 2006) (McCarthy et al., 2002) o *you* (Hollway et al., 2006) (Woods and Talbot, 2005) (Kawakami et al., 2005).

Por lo tanto, no resulta sorprendente que la desregulación de la expresión de estos factores aparezca asociada a un elevado porcentaje de tumores. Así, en un 64% de los tumores primarios de próstata se detecta la reducción de la expresión de HWIF-1 y en el 81% de estos pacientes se detecta un incremento en la expresión de sFRP4 (Wissmann et al., 2003). En el caso de cáncer de pulmón, la reducción de la expresión de HWIF-1 sube hasta un 75% de los pacientes estudiados (Wissmann et al., 2003). Además, la inactivación epigenética de sFRPs y de HWIF-1 se ha descrito en la

carcinogénesis colorrectal temprana y en tumores esofágicos y gástricos (He et al., 2005) (Taniguchi et al., 2005) (Suzuki et al., 2002). En estos tumores se detecta una hipermetilación del promotor de HWIF-1, inactivando la expresión del gen (Mazieres et al., 2004; Taniguchi et al., 2005).

La modulación de la activación aberrante de la vía de Wnt, mediante agentes desmetilantes que reviertan el silenciamiento de HWIF-1, es una diana potencial para el tratamiento y/o la prevención de este tipo de tumores (Taniguchi et al., 2005). Ya que hemos encontrado que HWIF-1 modula la vía de Wg en *Drosophila*, creemos que éste sería un buen sistema modelo para estudiar el mecanismo por el cual HWIF-1 interacciona con los componentes de la matriz extracelular. Si, además, la función de HWIF-1 no se limita a la vía de Wnt, se ampliaría el espectro de patologías a ser tratadas a través de esta diana terapéutica.

CONCLUSIONES

- 1) El gen *shf* es un nuevo componente de la vía de señalización de Hedgehog.
- 2) *Shf* codifica una proteína ortóloga a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor-1) de vertebrados, que la denominamos DmWIF.
- 3) DmWIF se requiere para la difusión de Hh modificado por lípidos en el disco imaginal y no interviene en la señalización de Hh en el embrión.
- 4) DmWIF es una proteína que difunde y colocaliza con Hh en la matriz extracelular del epitelio del disco de ala. Hh y DmWIF interactúan físicamente y se estabilizan recíprocamente.
- 5) DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs en la matriz extracelular.
- 6) Contrariamente a propuestas previas, Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala.
- 7) DmWIF es un componente de la vía de Hh, pero no modula la señalización por Wg en *Drosophila*; sin embargo, HWIF-1 se comporta como un antagonista de la vía de Wg tanto en vertebrados como en *Drosophila*.
- 8) El dominio WIF es el responsable de la discriminación entre la vía de Wg y la de Hh, en la proteína humana y en la de *Drosophila*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes de moscas

El cuidado de las moscas y su manipulación se realizó siguiendo técnicas clásicas descritas en Ashburner, 1989.

Las estirpes utilizadas fueron: Oregon R (Lindsley and Zimm, 1992), *shf*² (Lindsley and Zimm, 1992), *shf*⁰¹⁹ (Canal, 1988; Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990), *shf*^{EY03173} (Glise et al., 2005), *shf*^{dfl(1)2.5} (Gorfinkiel et al., 2005), *ptc*¹⁶ (Capdevila et al., 1994), *ptc*¹⁴ {Torroja, 2004 #146}, *ptc*^{G20} (Phillips et al., 1990), *disp*^{S037707} (Burke et al., 1999), *hh*^{ts2} (Ma et al., 1993), *ttv*⁰⁰⁶⁸¹ (Bellaiche et al., 1998), *trol*^{null}, *trol*^{l(1)G0271} y *trol*^{EP(1)1160} todas descritas en (Voigt et al., 2002), *smo*³ (Nusslein-Volhard, 1984), *kn*¹ (Diaz Benjumea, 1989).

Inserciones de elementos P

dpp-lacZ^{BS 3.0} (Blackman et al., 1991), *hh-lacZ*^{P30} (Lee et al., 1992), *P{EY03173}* (Bellen et al., 2004), *P{EP}EP1613* (Spradling et al., 1999), *EP(1)1160* (Voigt et al., 2002).

Las construcciones *dpp-lacZ*^{BS 3.0} y *hh-lacZ*^{P30} nos permiten detectar la expresión de un gen determinado (*hh* o *dpp*, en este caso). Llevan el gen *lacZ*, que codifica para la β-galactosidasa, bajo el control de secuencias activadoras específicas del gen cuya expresión queremos analizar. Estas construcciones tienen el mismo patrón de expresión que el ARNm correspondiente y se detecta mediante una tinción con anticuerpo anti-β-galactosidasa.

Inducción de clones de falta de función

Esta técnica permite estudiar alelos que, en homocigosis en todo el organismo, producen letalidad embrionaria. Se trata de que en un individuo, sólo determinadas poblaciones de células (clones) lleven la mutación, lo que permite estudiar la función de

estos genes en etapas del desarrollo más tardías. Igualmente, nos permite estudiar el efecto autónomo o no autónomo que tenga la actividad de un gen, al poder comparar el fenotipo entre las células mutantes del clon y las células silvestres ajenas al clon.

Para generar clones de falta de función se utilizó el sistema FLP/FRT (Golic, 1991) (Xu and Rubin, 1993). La flipasa (FLP) es una enzima que induce la recombinación entre dos secuencias FRT (“flipase recombination targets”) en el ADN. No se encuentra de forma endógena en *Drosophila* y se regula por un promotor de respuesta al calor (hsp70). Las secuencias FRT han de localizarse en la misma posición cromosómica, en cromosomas homólogos. De esta manera, al inducir la expresión de la FLP con un choque térmico, se puede generar la recombinación entre los sitios FRT de cromátidas de cromosomas homólogos. El resultado tras la mitosis son dos células hijas, cada una con una cromátida de cada cromosoma de la célula madre. Si en un par de cromosomas homólogos con secuencias FRT hay un gen en heterocigosis, el resultado tras la recombinación y la mitosis será de dos células hijas con distinta dotación génica: cada una homocigota para cada uno de los alelos del gen recombinado (figura 49). El resto del tejido seguirá siendo heterocigoto para ese gen.

Los clones se indujeron a las 24-48h o 48-72h después de la puesta del huevo, mediante un choque térmico a 37°C durante 1h. Larvas de los siguientes genotipos se diseccionaron en el tercer estadio larvario:

shf²; FRT42D ptc¹⁶/FRT42D arm-lacZ;HS-FLP/+
shf²; FRT42D ptc¹⁴/FRT42D arm-lacZ;HS-FLP/+
shf² FRT101/FRT101 ubi-GFP; HS-FLP/+
shf²/HS-FLP; FRT82 disp^{S037707}/FRT82 arm-lacZ
shf²; FRT42D ttv⁰⁰⁶⁸¹/FRT42D arm-lacZ;HS-FLP/+
shf^{EY03173}; FRT42D ttv⁰⁰⁶⁸¹/FRT42D arm-lacZ;HS-FLP/+
troI^{null} FRT101/FRT101 ubi-GFP; HS-FLP/+

Los clones se identificaron por la ausencia de GFP o de tinción de β-galactosidasa.

También indujimos clones de falta de función en la línea germinal. Mediante esta técnica se generan oocitos homocigotos mutantes para el gen de interés, de tal manera que el cigoto resultante carece del aporte materno de ese producto. El sistema empleado es el descrito por (Chou and Perrimon, 1992) (Chou and Perrimon, 1996)

denominado FLP-DFS (“ flipase-dominant female sterile”): los clones mutantes homocigotos en las células de la línea germinal se generan por recombinación mitótica (FRT-FLP)(Golic, 1991). Para poder seleccionar los huevos homocigotos mutantes, el cromosoma homólogo de las hembras parentales lleva la mutación *Ovo-D^l*, que produce esterilidad y es dominante. De esta manera, se eliminan los oocitos *Ovo-D^l/Ovo-D^l* y *Ovo-D^l/mutante* y sólo sobreviven los oocitos homocigotos *mutante/mutante*.

En nuestro caso, generamos clones en la línea germinal del mutante *shf^{EY03173}*, mediante recombinación homóloga en larvas de genotipo: *shf^{EY03173}FRT101/ywv Ovo-D^lFRT101; hs-FLP*. Las hembras adultas las cruzamos con machos *shf²* y sólo aquellas que sufrieron la recombinación en la línea germinal pusieron huevos.

Expresión ectópica de genes

Para la expresión ectópica de genes se utilizó el sistema GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993). Este sistema utiliza un activador transcripcional de levaduras (GAL4) que no tiene homólogo en *Drosophila*. Se induce la expresión del gen de interés que esté bajo el control de la secuencia de respuesta a GAL4 (secuencia UAS: “upstream activating sequence”). El gen *GAL4* se inserta aleatoriamente en el genoma de *Drosophila*, de manera que su expresión queda bajo el control de las regiones reguladoras adyacentes al punto de inserción. De esta manera se consiguen líneas transgénicas que expresan el activador GAL4 en dominios específicos. Por otro lado, el gen que queremos expresar ectópicamente se clona bajo el control de la secuencia UAS y se inserta en el genoma de otra cepa de moscas. Al cruzar las dos cepas, se consigue que la descendencia exprese el gen de interés en el dominio de expresión de GAL4 (figura 50).

Las líneas *GAL4* utilizadas fueron las siguientes: *hh-GAL4* (cedida por T. Tabata), *C765-GAL4* (Nellen et al., 1996), *ap-GAL4* (cedida por G. Morata), *69b-GAL4* (cedida por A. Brand), *MD638-GAL4* (Mullor et al., 1997), *da-GAL4* (Wodarz et al., 1995); *ABI-GAL4* (Munro and Freeman, 2000).

Las líneas *UAS* utilizadas fueron las siguientes: *UAS-CG3135* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-YFP-DmWIF* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-C3G* (Ishimaru et al., 1999), *UAS-shifted^{RNAi}* descrita en esta tesis, *hWIF* fue cedido por Hsieh et al. (1999) y se clonó en el vector pUAST, *UAS-Hh* (Capdevila and Guerrero, 1994), *UAS-HhGFP* {Torroja,

2004 #146}, *UAS-HhNGFP* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-Hhc85sGFP* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-dly* (Baeg et al., 2001), *UAS-dally* (Jackson et al., 1997), *UAS-trot^{RNAi}* descrita en esta tesis, *UAS-DmWIF^{ΔEGF}* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-DmWIF^{ΔWIF}* (Gorfinkiel et al., 2005), *UAS-DmWIF^{Hwif}*, *UAS-DmWIF^{hEGF}* y *UAS-HWIF-1^{DmWIF}* descritas en esta tesis.

Inducción de clones de expresión ectópica

Para generar clones en los que se expresa ectópicamente un gen de interés se utilizó una combinación de los sistemas GAL4/UAS y FLP/FRT (Pignoni and Zipursky, 1997). En este caso el gen *GAL4* se encuentra bajo el control de un promotor de expresión generalizada, pero separados el uno del otro por dos secuencias FRT (>) en *cis*, entre las que hay una secuencia terminadora de la transcripción y un gen marcador: *promotor > marcador > GAL4*. Por tanto, sólo se expresará el gen *GAL4* si se induce la recombinación entre las secuencias FRT mediante la inducción de la expresión de una FLP. Si colocamos el gen de interés bajo el control de la secuencia UAS, se podrá inducir su expresión en clones de células (figura 51). Para detectar los clones en el disco de ala usamos la construcción *UAS-lacZ*, que se coloca al lado del gen *GAL4* (de Celis et al., 1997); cuando se produce la recombinación se expresará la β-galactosidasa, detectable mediante una tinción con anticuerpo.

Para nuestros ensayos utilizamos larvas de genotipo *shf^{Df(1)2.5}; abx>f^{*}>GAL4, UAS-lacZ/ HS-FLP; UAS-hh*. Los clones se indujeron a las 24-48h o 48-72h después de la puesta del huevo, mediante un choque térmico a 37°C durante 15min y las larvas se diseccionaron en el tercer estadio de desarrollo.

Inmunohistoquímica de los discos imaginales

Se diseccionaron las larvas de estadio 3 en PBS y se fijaron en una solución de paraformaldehído 4% en PBS durante 20min. Se lavaron varias veces en PBT (PBS+Tritón X-100 al 0.1%) y se bloquearon en PBT-BSA al 1% durante 1h. Se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche. Tras varios lavados con

PBT se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente durante dos horas. Se lavaron y se montaron los discos en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories). El protocolo está descrito en (Sanchez-Herrero et al., 1996).

Los anticuerpos primarios utilizados, con sus correspondientes diluciones, fueron los siguientes: anti-DmWIF, 1:1000 (Glise et al., 2005); anti-Ptc, 1:200 (Capdevila et al., 1994); anti-Ci, 1:10 (Motzny and Holmgren, 1995); anti-Col, 1:200 (Vervoort et al., 1999); anti-En, 1:100 (Patel et al., 1989); anti-Hh, 1:500 (Takei et al., 2004); anti-Dlp, 1:200 (Baeg et al., 2001); anti-Dlp, 1:50 (Lum et al., 2003); anti-DE-Cad, 1:50 (Iowa University Hybridoma Bank), anti- β -gal, 1: 2000 (Cappel o Roche); anti-GFP, 1:200 (Clontech), anti-DPerlecan, 1:3000 (Friedrich et al., 2000), anti-Wg, 1:50 (Brook and Cohen, 1996), anti-Dll, 1:200 (Panganiban et al., 1995), anti-Cut, 1:100 (2B10, Iowa University Hybridoma Bank).

Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a FITC, TxRed, Rhodamina o Cy5, de las casas Alexa y Jackson Immunoresearch.

Una variación de este método es el marcaje extracelular de YFP-DmWIF con anti-GFP, realizado según se describe en {Torroja, 2004 #146}. La principal modificación frente a una inmunotinción convencional es que la incubación con el anticuerpo primario se realiza en medio M3 frío, previa a la fijación. El frío detiene el tráfico vesicular intracelular y la incubación *in vivo*, sin detergentes y antes de fijar, impide que el anticuerpo atraviese la membrana plasmática y éste se une sólo a epítomos extracelulares. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se fija el tejido y se continúa el protocolo de inmunotinción.

Microscopía

Para la microscopía de campo claro se utilizó un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss), acoplado a una cámara CCD. Para la microscopía confocal de fluorescencia se utilizó un Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

Hibridación “in situ”

Esta técnica se utiliza para analizar el patrón de expresión de un gen, mediante la detección del ARNm en el tejido. Para ello se sintetiza una sonda de RNA específica, complementaria a la secuencia del RNAm del gen y marcada con digoxigenina (DIG) (Tautz and Pfeifle, 1989).

En el caso de *shifted*, clonamos un fragmento de 476 nucleótidos (1104–1580 del “open reading frame” del *CG3135*) en pBluescript II SK. Sintetizamos la ribsonda utilizando la polimerasa T7 y el “kit” de marcaje con DIG de Roche Molecular Biochemical. La hibridación la realizamos según el protocolo descrito en (Tautz and Pfeifle, 1989).

RNA de interferencia

Para generar un RNAi frente a *shifted* elegimos un fragmento de 220 nucleótidos del transcrito de *CG3135* (290-510 del cDNA). Analizamos esta secuencia con un programa informático de diseño de RNAi (GenomeRNAi: <http://dkfz-heidelberg.de/signaling/cge-bin/ernai>), dando como resultado una especificidad del 100% y una eficiencia teórica del 14%. Los valores de estos parámetros eran más satisfactorios que los de las secuencias ofrecidas por la base de datos del mismo programa: especificidad del 98% y una eficiencia teórica del 11%. El fragmento se obtuvo por PCR y los oligonucleótidos utilizados como “primers” contenían las dianas de restricción BamH1 y Kpn1 en sus extremos 5' y 3', respectivamente, para facilitar su posterior clonaje. El fragmento amplificado se subclonó en el vector pHBS y de éste al pUAS, según el protocolo de (Nagel et al., 2002). De esta manera podíamos suprimir la expresión de *shifted* en el lugar y momento que nosotros precisáramos, mediante el sistema UAS-GAL4 (Brand and Perrimon, 1993).

Para generar un RNAi frente a *trol*, elegimos un fragmento de 505 nucleótidos del *CG7981* (6201-6705), propuesto por la base de datos de RNAi (GenomeRNAi: <http://dkfz-heidelberg.de/signaling/cge-bin/ernai>). Esta secuencia tenía una especificidad del 100% y una eficiencia teórica del 15%. El fragmento lo amplificamos a partir de un pool de cDNA de larva 3 y lo clonamos en el vector pUAS, según el protocolo de (Nagel et al., 2002).

Ensayos de Inmunoprecipitación

Para realizar estos ensayos, obtuvimos un extracto proteico tras sobreexpresar YFP-DmWIF y Hh en glándulas salivares (*ABI-Gal4/UAS-Hh*, *UAS-YFP-DmWIF*). El extracto (300 mg. de proteína) se preincubó con bolas de Proteína A-Sefarosa (SIGMA) para eliminar la unión de proteínas inespecíficas a las bolas. Se centrifugó y el sobrenadante se incubó con 5mg. de anticuerpo anti-GFP policlonal (Clontech y Molecular Probes), durante 2hr. a 4°C. El complejo proteínas-anticuerpo se incubó con 6 mg de bolas de Proteína A-Sepharosa para que las inmunoglobulinas quedaran adheridas a las bolas. Las bolas se lavaron con tampón de lisis, se resuspendieron en Laemmli, se hirvieron durante 5min. y se centrifugaron. El sobrenadante se resolvió por electroforesis SDS-PAGE, se transfirió a filtro de nitrocelulosa (“Western blot”) y el filtro se incubó con anticuerpo anti-Hh de rata (1:100) (Torroja et al., 2004). Para detectar la señal se reveló con un anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia)).

Como control negativo, se corrió un extracto de proteínas de glándulas salivares de moscas *yw*, inmunoprecipitado con anti-GFP. Como control positivo, se corrió un extracto de proteínas de glándulas salivares que sobreexpresaban Hh (*ABI-Gal4/UAS-Hh*).

RT-PCR cuantitativa

Utilizamos esta técnica para cuantificar los niveles de transcrito de un gen. En nuestro caso, comparamos la expresión de *shf* en el alelo *shf^{EY03173}* y en el alelo silvestre. Aislamos el RNAm de 50 larvas de tercer estadio según el protocolo convencional. Para generar el cDNA por retrotranscripción, utilizamos oligodTs y la transcriptasa reversa del AMV (Promega). Del “pool” de moléculas de cDNA, amplificamos por PCR un fragmento de 150 nucleótidos del gen *shf*; como control interno analizamos la expresión de la histona H4 en los dos alelos, amplificando un fragmento de 312 nucleótidos. Se realizaron amplificaciones de 20 y 30 ciclos y se cargaron muestras de 10µl en un gel de agarosa.

SOE-PCR

Las construcciones quimera entre DmWIF y HWIF-1 se generaron utilizando la técnica denominada “Splicing by Overlapping Extension-PCR” (SOE-PCR) (Horton et al., 1989; Povelones and Nusse, 2005; Warrens et al., 1997), que consiste en generar moléculas de DNA recombinante a partir de fragmentos independientes y sin utilizar enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA a recombinar se amplifican por reacciones de PCR independientes y los cebadores (“primers”) se diseñan de tal manera que los extremos de los productos de PCR sean complementarios. Los productos de estas PCRs se someten a otra PCR, común, de tal manera que sus extremos 3’ solapan y actúan como sus propios cebadores en las sucesivas rondas de replicación. El producto final es un “pool” de moléculas recombinantes. La ventaja reside en que no se está limitado por la presencia de dianas de restricción en los fragmentos a recombinar, lo que evita la generación de estas dianas y la modificación de la secuencia original. Los detalles de las PCRs se muestran en las siguientes tablas y en las figuras 52, 53 y 54.

<i>DmWIF^{hWIF}</i>	MOLDE	Oligo dir. (*)	Oligo rev. (*)	Nts.
PCR1	DmWIF	Not5’ frag1S1: ggggccgcgatgacacatcagggcatcggc	3’ frag1S1: gcatcgatccatagcgagatgccgctctcc	372
PCR2	HWIF-1	5’ frag2S1: ggagagcggcatctcgctatggatcgatgct	3’ frag2S1: cacacctgtgtggcacatgttttaagaa	453
PCR3	DmWIF	5’ frag3S1: ctttaaacaatgtgccacagaggtgtgtatga	Kpn3’ frag3S1: ggtaccctagaactggagtcacg	612
PCR4	PCR1+PCR2	Not5’ frag1S1	3’ frag2S1	792
PCR5	PCR3+PCR4	Not5’ frag1S1	Kpn3’ frag3S1	1366

<i>DmWIF^{hEGF}</i>	MOLDE	Oligo dir. (*)	Oligo rev. (*)	Nts.
PCR1	DmWIF	Not5’ frag1S1: ggggccgcgatgacacatcagggcatcggc	3’ frag1S2: gcactcagctgtgtgttagtgaagtagggtgg	840
PCR2	HWIF-1	5’ frag2S2: cctactcactaacacaacaagctgagtgcccaggc	Kpn3’ frag2S2: ggtacctcaccagatgtaattggattcagg	610
PCR3	PCR1+PCR2	Not5’ frag1S1	Kpn3’ frag2S2	1450

<i>HWIF-1^{DmWIF}</i>	MOLDE	Oligo dir. (*)	Oligo rev. (*)	Nts.
-------------------------------	-------	----------------	----------------	------

PCR1	HWIF-1	Not5'frag1S3: gcggccgcatggccccgaggagcgcc	3'frag1S3: ctcattgatecacaagtacaggctcctcctcg	110
PCR2	DmWIF	5'frag2S3: gaggagagcctgtactgtggatcaatgagcagcagc	3'frag2S3: gcactcagcttggcattccttttgaagttgagcg	430
PCR3	HWIF-1	5'frag3S3: cttcaaaaaggatgccaacaagctgagtgcccaggc	Kpn3'frag2S2 ggtacctcaccagatgtaattgattcagg	630
PCR4	PCR1+PCR2	Not5'frag1S3	3'frag2S3	540
PCR5	PCR3+PCR4	Not5'frag1S3	Kpn3'frag2S2	1170

(*): Nucleótidos en azul, pertenecen a *DmWIF*. Nucleótidos en rojo, pertenecen a *HWIF-1*, Nucleótidos en **negro**, pertenecen a las dianas de restricción.

Las construcciones fueron clonadas en el vector pUAS en las dianas Not-Kpn. se generaron las correspondientes moscas transgénicas y se expresaron con diversas líneas *GAL4*.

Programas informáticos y bases de datos

Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>): base de datos de *Drosophila melanogaster*.

FlyBase BLAST (<http://flybase.bio.indiana.edu>): programa de análisis de secuencias de *Drosophila melanogaster*.

UNIPROT (<http://www.ebi.uniprot.org>): base de datos de secuencias de proteínas.

CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>): programa de alineamiento de secuencias de proteínas.

GenomeRNAi (<http://dkfz-heidelberg.de/signaling/cge-bin/ernai>): programa de diseño de RNAi y base de datos de RNAi.

Primer3Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi): programa para seleccionar oligonucleótidos para PCRs.

123genomics (<http://www.123genomics.com/>): base de datos de programas informáticos de genómica, proteómica y bioinformática.

DNA Strider: programa de herramientas de Biología Molecular (ORFs, mapas de restricción, traducción de secuencias de ácidos nucleicos, etc...).

Edit seq: programa para la lectura de cromatogramas de secuencias de ácidos nucleicos.

Metamorph, Image J y Adobe Photoshop: programas de tratamiento de imágenes.

EndNote5: programa de tratamiento de referencias bibliográficas.

Microsoft Word: programa de tratamiento de textos.

Microsoft Power Point: programa de diseño de presentaciones.

El trabajo se realizó en un ordenador iMac con sistema operativo MacOS 9.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S. and Joyner, A. L.** (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894-7.
- Amanai, K. and Jiang, J.** (2001). Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development* **128**, 5119-27.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*, a laboratory handbook.: CSHL Press.
- Ashe, H. L. and Briscoe, J.** (2006). The interpretation of morphogen gradients. *Development* **133**, 385-94.
- Baeg, G. H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S. and Perrimon, N.** (2001). Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* **128**, 87-94.
- Bateman, A. J.** (1950). [New mutants report.]. *D. I. S.* **24**, 54--56.
- Belenkaya, T. Y., Han, C., Yan, D., Opoka, R. J., Khodoun, M., Liu, H. and Lin, X.** (2004). Drosophila Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* **119**, 231-44.
- Bellaiche, Y., The, I. and Perrimon, N.** (1998). Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* **394**, 85-8.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M. et al.** (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes. *Genetics* **167**, 761-81.
- Bijlsma, M. F., Spek, C. A., Zivkovic, D., van de Water, S., Rezaee, F. and Peppelenbosch, M. P.** (2006). Repression of Smoothened by Patched-Dependent (Pro-)Vitamin D3 Secretion. *PLoS Biol* **4**.
- Blackman, R. K., Sanicola, M., Raftery, L. A., Gillevet, T. and Gelbart, W. M.** (1991). An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in Drosophila. *Development* **111**, 657-66.
- Blair, S. S.** (2003). Lineage compartments in Drosophila. *Curr Biol* **13**, R548-51.
- Bolwig, G. M., Del Vecchio, M., Hannon, G. and Tully, T.** (1995). Molecular cloning of linotte in Drosophila: a novel gene that functions in adults during associative learning. *Neuron* **15**, 829-42.

- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. and Struhl, G.** (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* **7**, 1279-91.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Brook, W. J. and Cohen, S. M.** (1996). Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* **273**, 1373-7.
- Bumcrot, D. A., Takada, R. and McMahon, A. P.** (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* **15**, 2294-303.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J. and Basler, K.** (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**, 803-15.
- Callejo, A., Torroja, C., Quijada, L. and Guerrero, I.** (2006). Hedgehog lipid modifications are required for Hedgehog stabilization in the extracellular matrix. *Development* **133**, 471-83.
- Campbell, I. D., Baron, M., Cooke, R. M., Dudgeon, T. J., Fallon, A., Harvey, T. S. and Tappin, M. J.** (1990). Structure-function relationships in epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- α (TGF- α). *Biochem Pharmacol* **40**, 35-40.
- Canal, I.** (1988). Análisis genético del metamerismo en el sistema nervioso embrionario de *Drosophila*., (ed.: Universidad Autónoma de Madrid).
- Capdevila, J., Estrada, M. P., Sanchez-Herrero, E. and Guerrero, I.** (1994). The *Drosophila* segment polarity gene patched interacts with decapentaplegic in wing development. *Embo J* **13**, 71-82.
- Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-68.
- Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J. and Marti, E.** (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* **133**, 517-28.

- Chen, C. M. and Struhl, G.** (1999). Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Development* **126**, 5441-52.
- Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M. and Chuang, P. T.** (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* **18**, 641-59.
- Chen, Y. and Schier, A. F.** (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature* **411**, 607-10.
- Chen, Y. and Struhl, G.** (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-63.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-53.
- Chou, T. B. and Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.
- Chuang, P. T. and McMahon, A. P.** (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**, 617-21.
- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. and Reiter, J. F.** (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-21.
- Corcoran, R. B. and Scott, M. P.** (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells
10.1073/pnas.0602852103. *PNAS* **103**, 8408-8413.
- Craymer, L. and Roy, E.** (1980). Report of New Mutants -- *Drosophila melanogaster*. *D. I. S.* **55**, 200--204.
- Crozatier, M., Glise, B. and Vincent, A.** (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of *collier/knot* in the AP organiser. *Development* **129**, 4261-9.
- Crozatier, M., Glise, B. and Vincent, A.** (2004). Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet* **20**, 498-505.
- Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H. and Ruiz i Altaba, A.** (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**, 5201-12.
- Dahmann, C. and Basler, K.** (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* **15**, 320-6.

Datta, M. W., Hernandez, A. M., Schlicht, M. J., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Dhir, R., Shah, R. B., Farach-Carson, C., Barrett, A. and Datta, S. (2006). Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol Cancer* **5**, 9.

de Celis, J. F., Bray, S. and Garcia-Bellido, A. (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1919-28.

Del Sal, G., Ruaro, M. E., Philipson, L. and Schneider, C. (1992). The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell* **70**, 595-607.

Demerec, M., Kaufmann, B. P., Fano, U., Sutton, E. and Sansome, E. R. (1942). The gene. *Yb. Carnegie Instn, Wash.* **41**, 190--199.

Denef, N., Neubuser, D., Perez, L. and Cohen, S. M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**, 521-31.

Desbordes, S. C. and Sanson, B. (2003). The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* **130**, 6245-55.

Deshpande, G., Swanhart, L., Chiang, P. and Schedl, P. (2001). Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* **106**, 759-69.

Diaz Benjumea, J., González Gaitán, M.A.F., García Bellido, A. (1989). Developmental genetics of the wing vein pattern of *Drosophila*. *Genome* **31**, 612-619.

Diaz-Benjumea, F. J., Cohen, B. and Cohen, S. M. (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* **372**, 175-9.

Diaz-Benjumea, F. J. and Garcia-Bellido, A. (1990). Genetic analysis of the wing vein pattern of *Drosophila*. *Roux Arch. dev. Biol.* **198**, 336--354.

Dominguez, M. (1999). Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene *atonal* during ommatidia development. *Development* **126**, 2345-53.

Drossopoulou, G., Lewis, K. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Nikbakht, N., McMahon, A. P., Hofmann, C. and Tickle, C. (2000). A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* **127**, 1337-48.

- Duprez, D. M., Kostakopoulou, K., Francis-West, P. H., Tickle, C. and Brickell, P. M.** (1996). Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb. *Development* **122**, 1821-8.
- Eggenschwiler, J. T., Bulgakov, O. V., Qin, J., Li, T. and Anderson, K. V.** (2006). Mouse Rab23 regulates hedgehog signaling from smoothed to Gli proteins. *Dev Biol* **290**, 1-12.
- Eggenschwiler, J. T., Espinoza, E. and Anderson, K. V.** (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* **412**, 194-8.
- Eldar, A., Rosin, D., Shilo, B. Z. and Barkai, N.** (2003). Self-enhanced ligand degradation underlies robustness of morphogen gradients. *Dev Cell* **5**, 635-46.
- Eldar, A., Shilo, B. Z. and Barkai, N.** (2004). Elucidating mechanisms underlying robustness of morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 435-9.
- Entchev, E. V., Schwabedissen, A. and Gonzalez-Gaitan, M.** (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.
- 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* **391**, 806-11.
- Fisher, C. E. and Howie, S. E.** (2006). The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol* **296**, 279-97.
- Franch-Marro, X., Marchand, O., Piddini, E., Ricardo, S., Alexandre, C. and Vincent, J. P.** (2005). Glypicans shunt the Wingless signal between local signalling and further transport. *Development* **132**, 659-66.
- Friedrich, M. V., Schneider, M., Timpl, R. and Baumgartner, S.** (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur J Biochem* **267**, 3149-59.
- Fujise, M., Izumi, S., Selleck, S. B. and Nakato, H.** (2001). Regulation of dally, an integral membrane proteoglycan, and its function during adult sensory organ formation of *Drosophila*. *Dev Biol* **235**, 433-48.
- Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L. and Therond, P. P.** (2006). Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* **133**, 407-18.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.

- Glise, B., Miller, C. A., Crozatier, M., Halbisen, M. A., Wise, S., Olson, D. J., Vincent, A. and Blair, S. S.** (2005). Shifted, the Drosophila ortholog of Wnt inhibitory factor-1, controls the distribution and movement of Hedgehog. *Dev Cell* **8**, 255-66.
- Golic, K. G.** (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila. *Science* **252**, 958-61.
- Gorfinkiel, N., Sanchez, L. and Guerrero, I.** (2003). Development of the Drosophila genital disc requires interactions between its segmental primordia. *Development* **130**, 295-305.
- Gorfinkiel, N., Sierra, J., Callejo, A., Ibanez, C. and Guerrero, I.** (2005). The Drosophila ortholog of the human Wnt inhibitor factor Shifted controls the diffusion of lipid-modified Hedgehog. *Dev Cell* **8**, 241-53.
- Greco, V., Hannus, M. and Eaton, S.** (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.
- Guerrero, I. and Chiang, C.** (2006). A conserved mechanism of Hedgehog gradient formation by lipid modifications. *Trends Cell Biol.*
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of engrailed and the specification of Drosophila wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Gurdon, J. B. and Bourillot, P. Y.** (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature* **413**, 797-803.
- Hacker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N.** (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 530-41.
- Halford, M. M. and Stacker, S. A.** (2001). Revelations of the RYK receptor. *Bioessays* **23**, 34-45.
- Han, C., Belenkaya, T. Y., Wang, B. and Lin, X.** (2004). Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* **131**, 601-11.
- Han, C., Yan, D., Belenkaya, T. Y. and Lin, X.** (2005). Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development* **132**, 667-79.
- Hatini, V. and DiNardo, S.** (2001). Divide and conquer: pattern formation in Drosophila embryonic epidermis. *Trends Genet* **17**, 574-9.
- He, B., Reguart, N., You, L., Mazieres, J., Xu, Z., Lee, A. Y., Mikami, I., McCormick, F. and Jablons, D. M.** (2005). Blockade of Wnt-1 signaling induces

apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* **24**, 3054-8.

Hollway, G. E., Maule, J., Gautier, P., Evans, T. M., Keenan, D. G., Lohs, C., Fischer, D., Wicking, C. and Currie, P. D. (2006). Scube2 mediates Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Dev Biol* **294**, 104-18.

Hooper, J. E. and Scott, M. P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 306-17.

Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-8.

Huangfu, D. and Anderson, K. V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* **133**, 3-14.

Incardona, J. P., Gruenberg, J. and Roelink, H. (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol* **12**, 983-95.

Ingham, P. W. and McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-87.

Irvine, K. D. and Wieschaus, E. (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development. *Cell* **79**, 595-606.

Ishimaru, S., Williams, R., Clark, E., Hanafusa, H. and Gaul, U. (1999). Activation of the Drosophila C3G leads to cell fate changes and overproliferation during development, mediated by the RAS-MAPK pathway and RAP1. *Embo J* **18**, 145-55.

Jackson, S. M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C. and Selleck, S. B. (1997). dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Development* **124**, 4113-20.

Jeong, J. and McMahon, A. P. (2005). Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* **132**, 143-54.

Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.

Jia, J., Zhang, L., Zhang, Q., Tong, C., Wang, B., Hou, F., Amanai, K. and Jiang, J. (2005). Phosphorylation by Double-Time/CKI[epsilon] and CKI[alpha] Targets

- Cubitus Interruptus for Slimb/ β -TRCP-Mediated Proteolytic Processing. *Developmental Cell* **9**, 819 - 830.
- Jonas, A.** (2002). Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Paris: Elsevier.
- Jones, S. E. and Jomary, C.** (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**, 811-20.
- Katoh, Y. and Katoh, M.** (2004). KIF27 is one of orthologs for Drosophila Costal-2. *Int J Oncol* **25**, 1875-80.
- Kawano, Y. and Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.
- Khare, N. and Baumgartner, S.** (2000). Dally-like protein, a new Drosophila glypican with expression overlapping with wingless. *Mech Dev* **99**, 199-202.
- 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* **82**, 795-802.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of Drosophila: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.
- Kuwabara, P. E. and Labouesse, M.** (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* **18**, 193-201.
- Lander, A. D., Nie, Q. and Wan, F. Y.** (2002). Do morphogen gradients arise by diffusion? *Dev Cell* **2**, 785-96.
- Lawrence, P. A.** (1992). The making of a fly: the genetics of animal design.: Blackwell Scientific Publications.
- Lecuit, T. and Cohen, S. M.** (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the Drosophila wing imaginal disc. *Development* **125**, 4901-7.
- Lee, C. S., Buttitta, L. and Fan, C. M.** (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11347-52.
- Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S. and Beachy, P. A.** (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* **71**, 33-50.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.

- Lei, Q., Zelman, A. K., Kuang, E., Li, S. and Matise, M. P.** (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* **131**, 3593-604.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M. and Tabin, C.** (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-14.
- Li, Y., Zhang, H., Litingtung, Y. and Chiang, C.** (2006). Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud
10.1073/pnas.0600124103. *PNAS* **103**, 6548-6553.
- Liepinsh, E., Banyai, L., Patthy, L. and Otting, G.** (2006). NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J Mol Biol* **357**, 942-50.
- Lin, X.** (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009-21.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
- Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M. and Beachy, P. A.** (2003). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* **299**, 2039-45.
- Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103-14.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A. and Moses, K.** (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **75**, 927-38.
- Marigo, V. and Tabin, C. J.** (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9346-51.
- Marti, E. and Bovolenta, P.** (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* **25**, 89-96.
- Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R. and McMahon, A. P.** (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **375**, 322-5.
- McCarthy, R. A., Barth, J. L., Chintalapudi, M. R., Knaak, C. and Argraves, W. S.** (2002). Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J Biol Chem* **277**, 25660-7.

- McKeegan, K. S., Borges-Walmsley, M. I. and Walmsley, A. R.** (2003). The structure and function of drug pumps: an update. *Trends Microbiol* **11**, 21-9.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W. and Tabin, C. J.** (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.
- Mello, C. C. and Conte, D., Jr.** (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338-42.
- Mohler, J. and Vani, K.** (1992). Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* **115**, 957-71.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-7.
- Morgan and Bridges.** (1916). Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Publ. Carnegie Instn.* **237**, 1-88.
- Motzny, C. K. and Holmgren, R.** (1995). The *Drosophila cubitus interruptus* protein and its role in the wingless and hedgehog signal transduction pathways. *Mech Dev* **52**, 137-50.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R.** (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-37.
- Mullor, J. L. and Ruiz i Altaba, A.** (2002). Growth, hedgehog and the price of GAS. *Bioessays* **24**, 22-6.
- Munro, S. and Freeman, M.** (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol* **10**, 813-20.
- Nagel, A. C., Maier, D. and Preiss, A.** (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **212**, 93-8.
- Nakato, H., Futch, T. A. and Selleck, S. B.** (1995). The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development* **121**, 3687-702.

- Needham, J.** (1937). Integrative levels: a revaluation of the idea of progress. Oxford: The Clarendon Press.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **183**, 267-282.
- Nybakken, K., Vokes, S. A., Lin, T. Y., McMahon, A. P. and Perrimon, N.** (2005). A genome-wide RNA interference screen in *Drosophila melanogaster* cells for new components of the Hh signaling pathway. *Nat Genet* **37**, 1323-32.
- Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. and Eaton, S.** (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**, 58-65.
- Panganiban, G., Sebring, A., Nagy, L. and Carroll, S.** (1995). The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* **270**, 1363-6.
- Patel, N. H., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S.** (1989). Expression of engrailed during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* **107**, 201-12.
- Patthy, L.** (2000). The WIF module. *Trends Biochem Sci* **25**, 12-3.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K. et al.** (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* **273**, 14037-45.
- Peters, C., Wolf, A., Wagner, M., Kuhlmann, J. and Waldmann, H.** (2004). The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8531-6.
- Phillips, R. G., Roberts, I. J., Ingham, P. W. and Whittle, J. R.** (1990). The *Drosophila* segment polarity gene patched is involved in a position-signalling mechanism in imaginal discs. *Development* **110**, 105-14.
- Pignoni, F. and Zipursky, S. L.** (1997). Induction of *Drosophila* eye development by decapentaplegic. *Development* **124**, 271-8.
- Porter, J. A., Ekker, S. C., Park, W. J., von Kessler, D. P., Young, K. E., Chen, C. H., Ma, Y., Woods, A. S., Cotter, R. J., Koonin, E. V. et al.** (1996). Hedgehog

patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* **86**, 21-34.

Porter, J. A., von Kessler, D. P., Ekker, S. C., Young, K. E., Lee, J. J., Moses, K. and Beachy, P. A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* **374**, 363-6.

Povelones, M. and Nusse, R. (2005). The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wntless-Armadillo signaling. *Embo J* **24**, 3493-503.

Ramirez-Weber, F. A. and Kornberg, T. B. (1999). Cytosomes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **97**, 599-607.

Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.

Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K. and Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* **274**, 12049-54.

Sanchez-Herrero, E., Couso, J. P., Capdevila, J. and Guerrero, I. (1996). The *fu* gene discriminates between pathways to control *dpp* expression in *Drosophila* imaginal discs. *Mech Dev* **55**, 159-70.

Saunders, J. W., and Gasseling, M. (1968). Epithelial-Mesenchymal Interactions. Baltimore: Williams & Wilkins.

Schneider, M., Khalil, A. A., Poulton, J., Castillejo-Lopez, C., Egger-Adam, D., Wodarz, A., Deng, W. M. and Baumgartner, S. (2006). Perlecan and Dystroglycan act at the basal side of the *Drosophila* follicular epithelium to maintain epithelial organization. *Development* **133**, 3805-15.

Sharp, P. A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev* **15**, 485-90.

Smelkinson, M. G. and Kalderon, D. (2006). Processing of the *Drosophila* Hedgehog Signaling Effector Ci-155 to the Repressor Ci-75 Is Mediated by Direct Binding to the SCF Component Slimb. *Current Biology* **16**, 110 - 116.

Spemann, H. u. M., H. (1924). Über die Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *W. Roux' Arch. f. Entw. d. Organism. u. mikrosk. Anat.* **100**, 599-638.

Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Laverly, T., Mozdén, N., Misra, S. and Rubin, G. M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene

disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-77.

Spring, J., Paine-Saunders, S. E., Hynes, R. O. and Bernfield, M. (1994). *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3334-8.

Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A. and Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626-41.

Strigini, M. and Cohen, S. M. (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr Biol* **10**, 293-300.

Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M. P., Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* **31**, 141-9.

Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T. B. (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* **6**, 2635-45.

Tabata, T. and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.

Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T. and Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* **418**, 892-7.

Takei, Y., Ozawa, Y., Sato, M., Watanabe, A. and Tabata, T. (2004). Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development* **131**, 73-82.

Takeo, S., Akiyama, T., Firkus, C., Aigaki, T. and Nakato, H. (2005). Expression of a secreted form of Dally, a *Drosophila* glypican, induces overgrowth phenotype by affecting action range of Hedgehog. *Dev Biol* **284**, 204-18.

Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hirata, T., Miyamoto, N., Oki, M., Noshio, K., Adachi, Y., Endo, T., Imai, K. and Shinomura, Y. (2005). Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* **24**, 7946-52.

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.

- Teleman, A. A. and Cohen, S. M.** (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* **103**, 971-80.
- Tenzen, T., Allen, B. L., Cole, F., Kang, J. S., Krauss, R. S. and McMahon, A. P.** (2006). The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* **10**, 647-56.
- The, I., Bellaiche, Y. and Perrimon, N.** (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell* **4**, 633-9.
- Torroja, C., Gorfinkiel, N. and Guerrero, I.** (2004). Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* **131**, 2395-408.
- Tricoire, H.** (1999). *Drosophila melanogaster* D-COQ7 gene for putative COQ7 isologue, exons 1-3., (ed.: GenBank/EMBL/DDBJ).
- Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D. and Vincent, A.** (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* **9**, 632-9.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schafer, U. and Jackle, H.** (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev Dyn* **224**, 403-12.
- Warrens, A. N., Jones, M. D. and Lechler, R. I.** (1997). Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* **186**, 29-35.
- Wendler, F., Franch-Marro, X. and Vincent, J. P.** (2006). How does cholesterol affect the way Hedgehog works? *Development* **133**, 3055-61.
- Wharton, S. J., Basu, S. P. and Ashe, H. L.** (2004). Smad affinity can direct distinct readouts of the embryonic extracellular Dpp gradient in *Drosophila*. *Curr Biol* **14**, 1550-8.
- Wilson, S. W. and Houart, C.** (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* **6**, 167-81.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67-76.
- Wolpert, L.** (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol.* **25**, 1-47.
- Wolpert, L.** (1989). Positional information revisited. *Development* **107 Suppl**, 3-12.

- Wolpert, L.** (1996). One hundred years of positional information. *Trends Genet.* **12**, 359-64.
- Woods, I. G. and Talbot, W. S.** (2005). The you gene encodes an EGF-CUB protein essential for Hedgehog signaling in zebrafish. *PLoS Biol* **3**, e66.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. et al.** (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* **124**, 4393-404.
- Yao, S., Lum, L. and Beachy, P.** (2006). The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* **125**, 343-57.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. and Thomas, J. B.** (2003). Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* **422**, 583-8.
- Zak, B. M., Crawford, B. E. and Esko, J. D.** (2002). Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 346-55.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zerial, M. and McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.
- Zhang, W., Kang, J. S., Cole, F., Yi, M. J. and Krauss, R. S.** (2006). Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell* **10**, 657-65.
- Zhu, A. J., Zheng, L., Suyama, K. and Scott, M. P.** (2003). Altered localization of *Drosophila* Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev* **17**, 1240-52.

FIGURAS

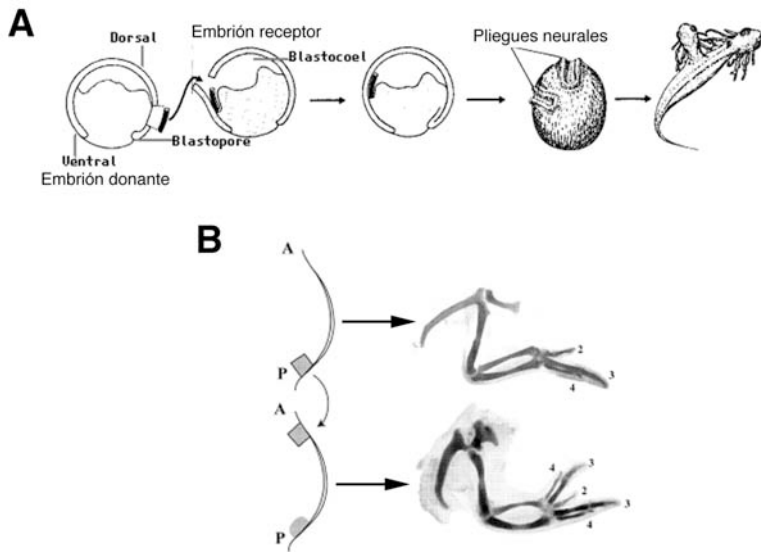


Figura 1: Organizadores morfogenéticos.

(A) Esquema del experimento de Spemann-Mangold (1924): al transplantar el labio dorsal del blastoporo de un embrión de ajolote a otro embrión hospedador, en este último se formaba un segundo eje antero-posterior. A este tejido, con capacidad de dirigir el desarrollo del tejido hospedador se le denominó "Organizador de Spemann".

(B) Esquema del experimento de Saunders (1968). A, anterior; P, posterior. Los números se refieren a los dígitos. Se transplantó un fragmento de tejido mesenquimático del margen posterior del primordio de ala de un pollo, al margen anterior del primordio de ala de otro individuo. El resultado es la duplicación de los dígitos en imagen especular con respecto al eje antero-posterior de la extremidad. A esa región organizadora del primordio se la denominó zonade actividad polarizante (ZPA). Modificado de Tickle, 2000.

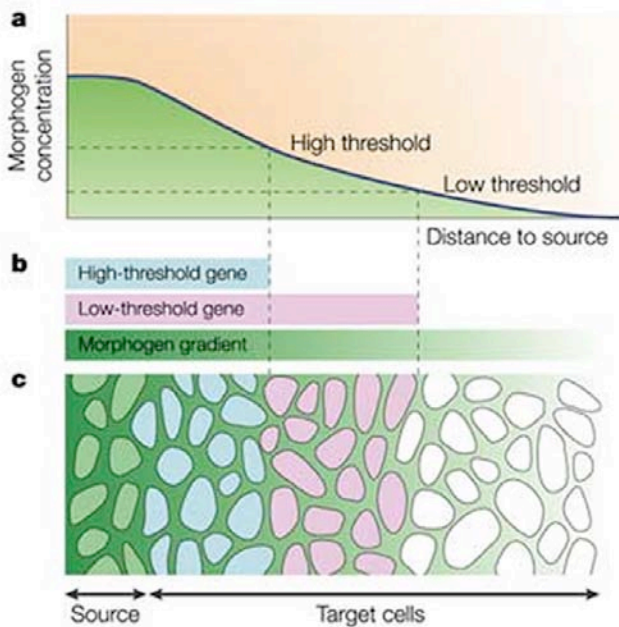


Figura 2: Información posicional y morfógenos.

Esquema que muestra la adquisición del valor posicional a través de la interpretación del gradiente de concentración de una molécula difusible. Un morfógeno es una molécula difusible, señalizadora, que forma un gradiente de concentración desde la fuente donde se produce (a). El morfógeno difunde por el tejido y las células responden de manera diferente en función del nivel de señal que reciben (c). Se denominan genes diana de altos niveles o de bajos niveles los que se expresan como respuesta a altos o bajos niveles del morfógeno, respectivamente (b). Modificado de González-Gaitán, 2003.

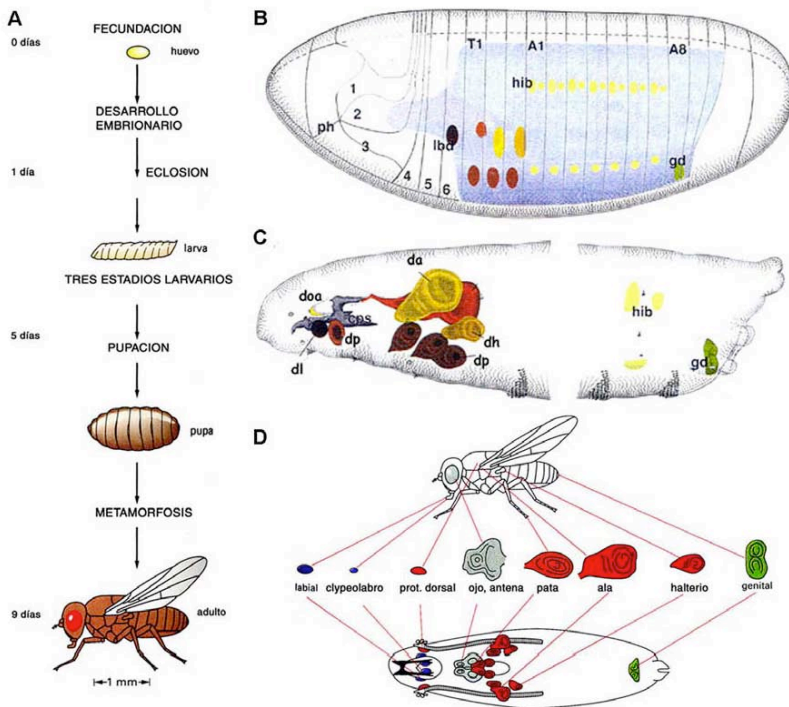


Figura 3: Ciclo vital de *Drosophila*. Esquemas del embrión y larva.

(A) Esquema del ciclo vital de *Drosophila*, a 25°C.

(B) Esquema de un embrión al final del desarrollo embrionario con los primordios imaginales.

(C) Esquema de una larva de tercer estadio con los discos imaginales.

(D) Correspondencia de los discos imaginales con las estructuras adultas a las que dan lugar.

Leyenda. T1: segmento torácico 1, A1 y A8: segmentos abdominales 1 y 8, dl: disco labial, doa: disco de ojo-antena, da: disco de ala, dh: disco de halterio, dp: disco de pata, dg: disco genital, hib: histoblastos.

A y D modificados de (Alberts, 1994). B y C cedidas por el Dr. Fco. Martín.

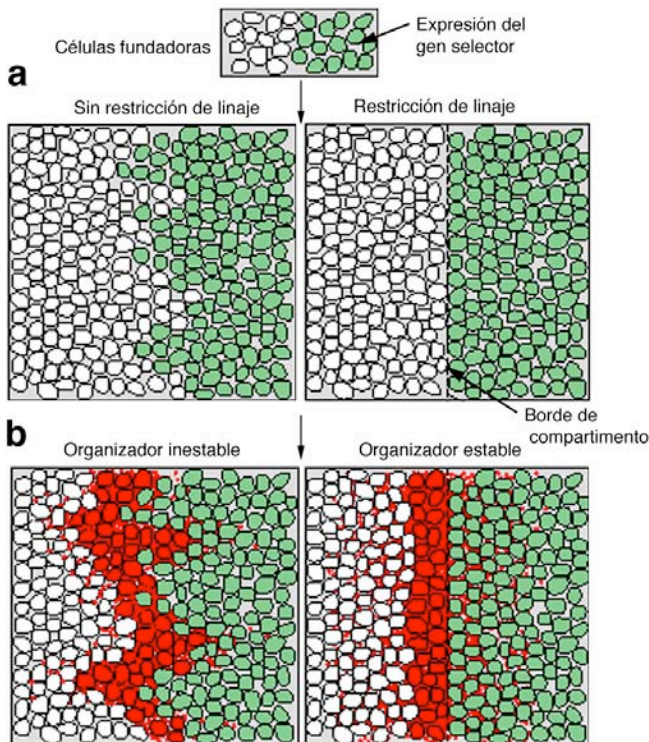


Figura 4: Bordos de compartimento y organizadores morfogenéticos.

(a) Esquema de la formación de un borde de compartimento. En el primer esquema, un grupo de células fundadoras de una población adquiere la identidad específica de compartimento mediante la expresión de un gen selector (células de color verde). La expresión o la ausencia de expresión del gen selector resulta en la especificación de dos tipos celulares distintos (células verdes o blancas) y en la constitución de un borde de restricción de linaje.

(b) Las células que componen el borde de compartimento constituyen el organizador morfogenético. Las células de un compartimento mandan una señal de corto alcance, que sólo es recibida por las células más próximas del compartimento adyacente. Esta señal induce la secreción del morfógeno por parte de las células del borde, constituyendo el organizador morfogenético (células rojas). El organizador mantiene la integridad espacial gracias a la restricción de linaje. En ausencia de la restricción de linaje, el organizador sería espacialmente inestable. Modificado de Dahmann y Basler, 1999.

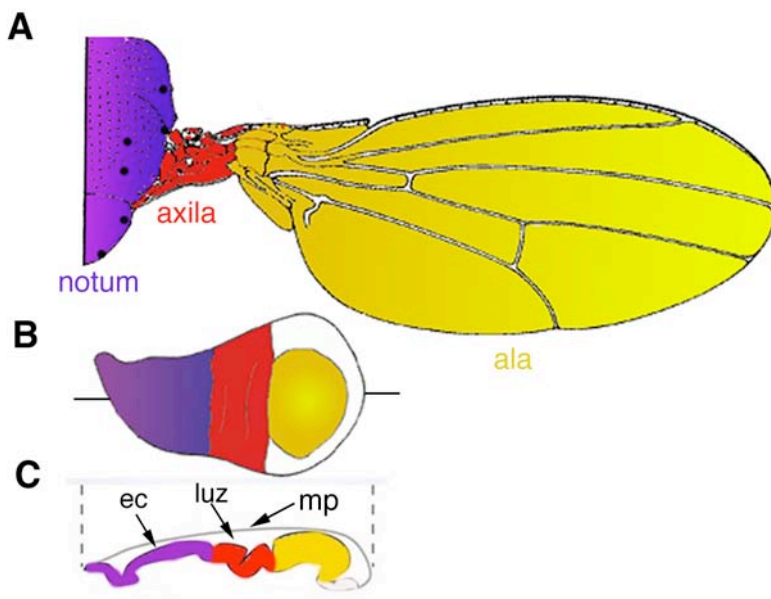


Figura 5: Esquema del ala de adulto y del disco imaginal de ala.

(A) Visión dorsal de las estructuras del tórax y del ala de un adulto.

(B) Esquema de un disco imaginal de ala, de tercer estadio larvario. En él se destaca la correspondencia entre la zona presuntiva de ala (amarillo), de axila (rojo) y *notum* (violeta) y las estructuras adultas. La región blanca da lugar a las pleuras. Cedido por el Dr. Francisco Martín.

(C) Esquema de un corte ortogonal del disco de ala en el que se destaca la membrana peripodial (mp), el epitelio columnar (ec) y la luz del disco. Modificado de Tabata y Takei, 2004.

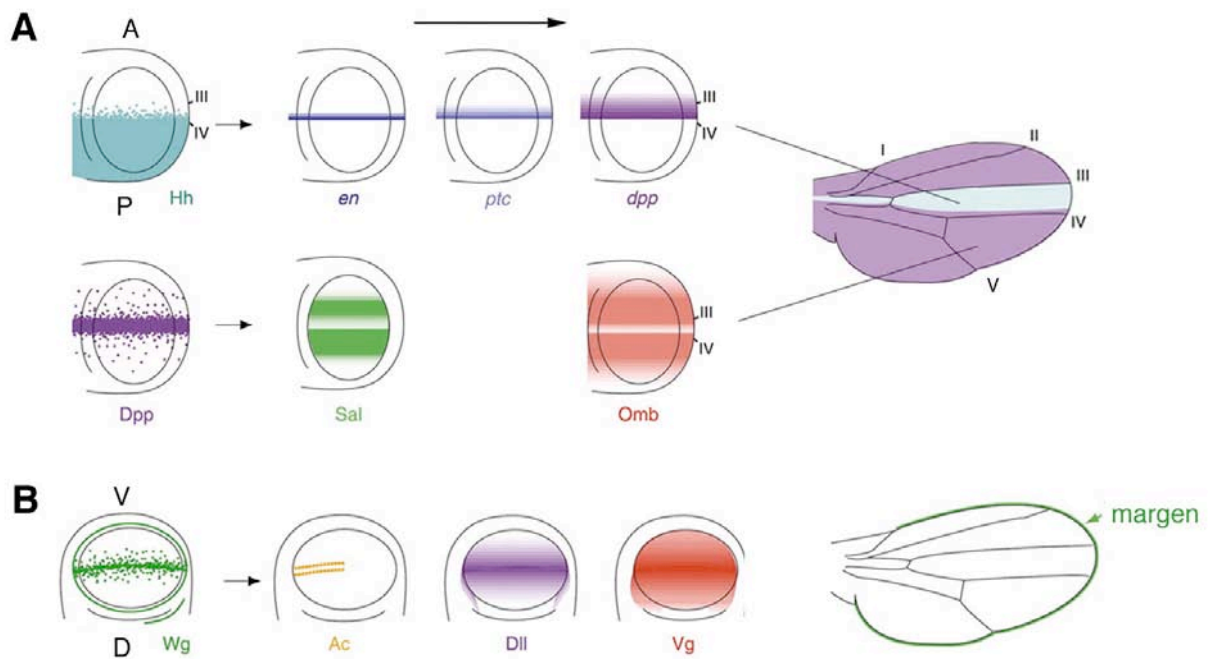


Figura 6: Compartimentos y morfógenos en el disco imaginal de ala.

(A) Las células P secretan la proteína Hedgehog (Hh) que actúa como un morfógeno de corto alcance, señalizando a las células A para formar el patrón central del ala. Hh además induce la expresión de *en*, *ptc* y *dpp* en una estrecha banda de células adyacentes al borde A/P.

(B) Dpp difunde a ambos lados del borde A/P y actúa como un morfógeno de largo alcance, induciendo la expresión de genes diana (*sal*, *omb*) y el crecimiento del ala en el eje antero-posterior, mas allá del dominio central.

(C) Las células a ambos lados del borde de compartimento D/V secretan el morfógeno Wingless. Wg induce la expresión de genes diana como *achaete*, *distal-less* o *vestigial* y es el responsable del patrón morfológico del ala a lo largo del eje dorso ventral. Modificado de Tabata y Takei, 2004.

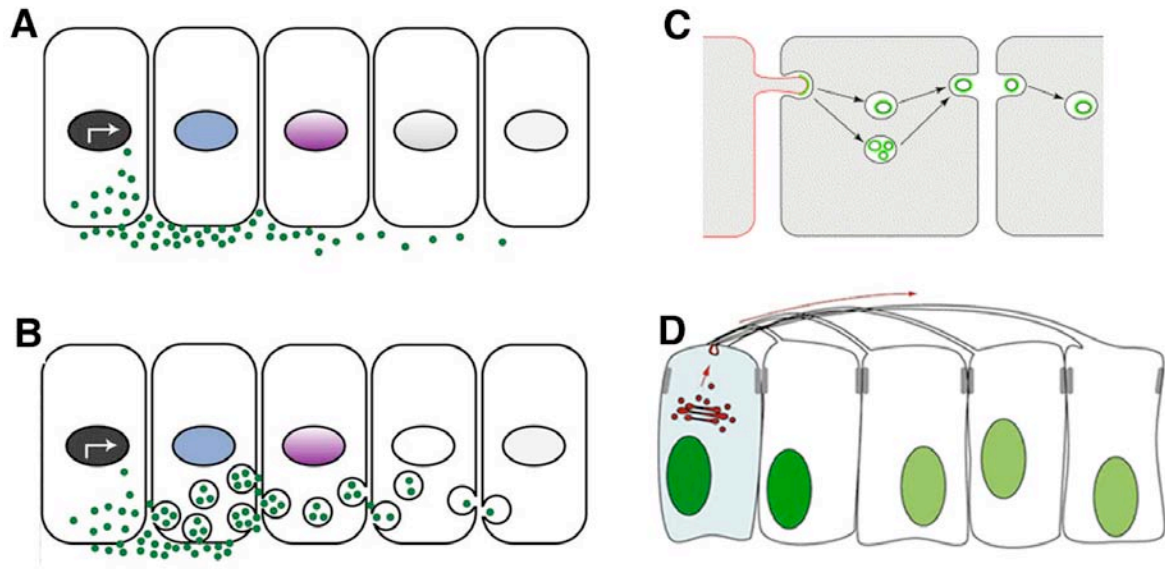


Figura 7: Modelos de distribución del morfógeno.

Esquemas que representan los distintos modelos para explicar la distribución en gradiente de un morfógeno.

(A) Difusión restringida: el morfógeno difunde por el espacio extracelular, existiendo una interacción entre las moléculas del morfógeno y las moléculas de la superficie celular.

(B) Transcitosis planar: el movimiento del morfógeno a través del tejido se explica mediante ciclos repetidos de endocitosis, transporte intracelular y exocitosis.

(C) Argosomas: el morfógeno se transporta en fragmentos procedentes de dominios específicos de la membrana plasmática, que se liberan de las células productoras y se desplazan a través del epitelio. Estas estructuras se denominan argosomas. Modificado de Vincent y Magee, 2002.

(D) Citonemas: son extensiones celulares, que se proyectan hacia el organizador A/P y que se originan en las células de la periferia del disco imaginal de ala. Serían un vehículo de transporte del morfógeno hacia las células alejadas de la fuente. Modificado de Tabata y Takei, 2004

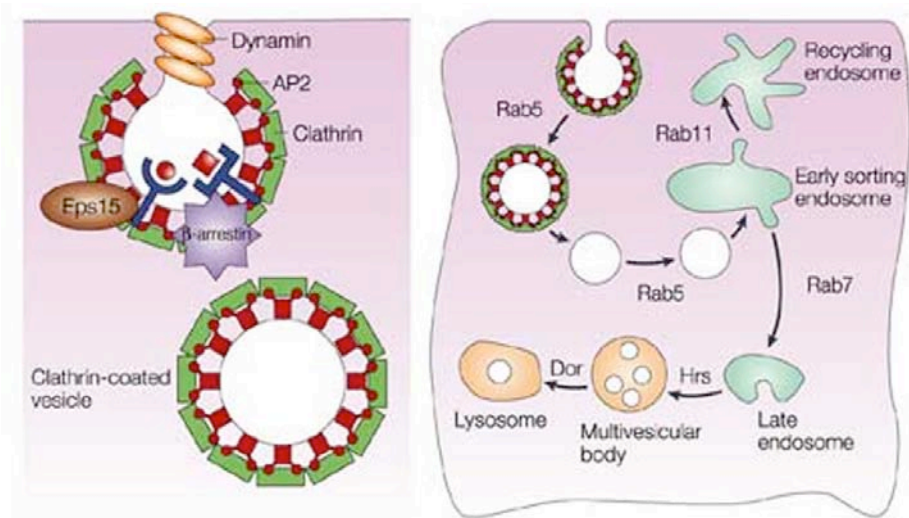


Figura 8: Esquema de la vía endocítica.

Ver explicación en el texto. Modificado de González-Gaitán, 2003.

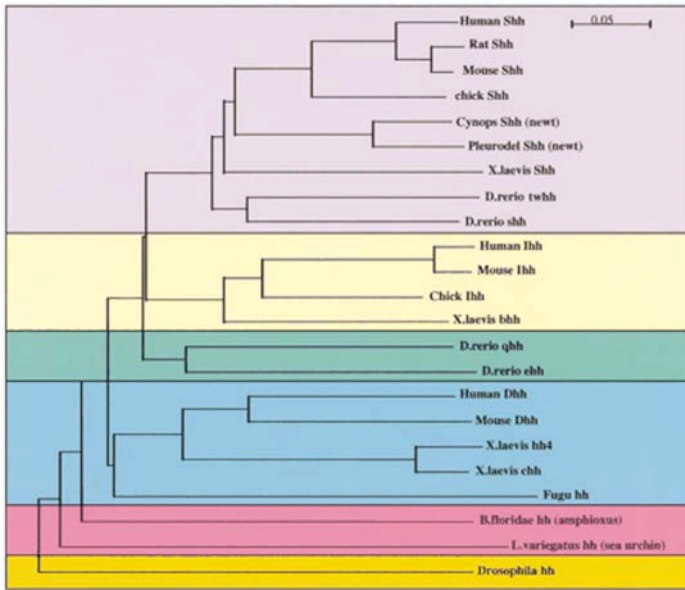


Figura 9: Relación filogenética entre los miembros de la familia de proteínas Hh de vertebrados, cefalocordados y *Drosophila*.

Las proteínas Hh de los amniotas se diferencian en tres grupos: Sonic (color violeta, en el esquema), Indian (amarillo) y Desert (azul). Ehh y Qhh del pez cebra, son miembros divergentes del grupo de Ihh. Modificado de Ingham y McMahon, 2001.

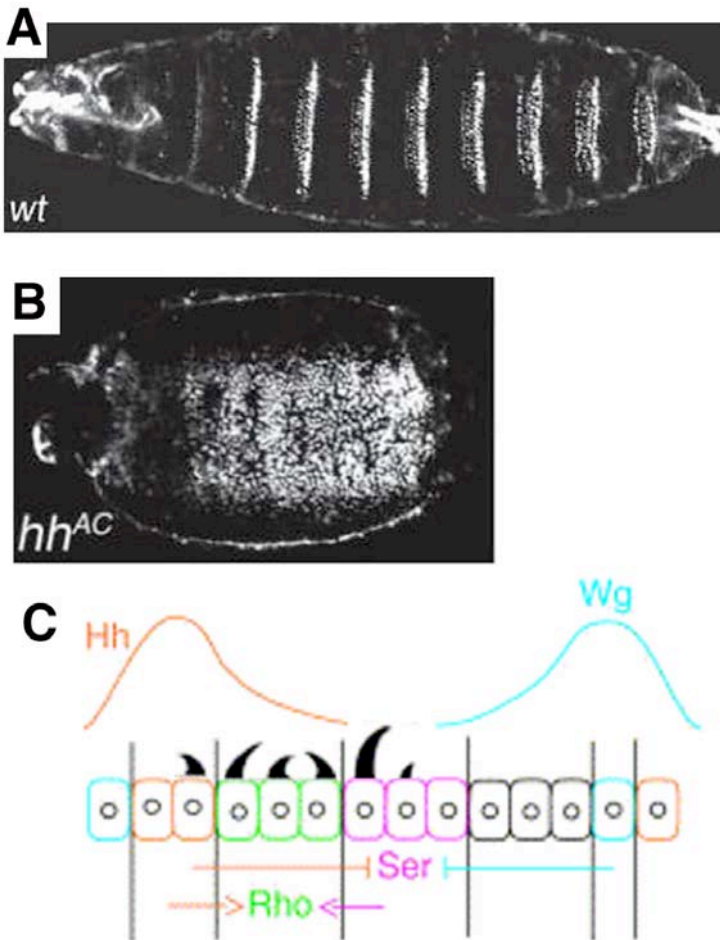


Figura 10: Hh especifica el patrón segmental embrionario de *Drosophila*.

(A) Imagen de contraste de fases de una larva silvestre en estadio I. Se observa que cada segmento embrionario está definido por un territorio de cutícula desnuda y otro territorio de cutícula con denticulos.

(B) Imagen de contraste de fases de una larva mutante nula para *hh*. Se observa que la cutícula no presenta un patrón segmental y que está cubierta totalmente de denticulos.

(C) Regulación genética del patrón segmental de la cutícula embrionaria (ver explicación en el texto).

A y B, modificados de Nusslein-Volhardt y Wieschaus, 1980. C, modificado de Hatini y DiNardo, 2001.

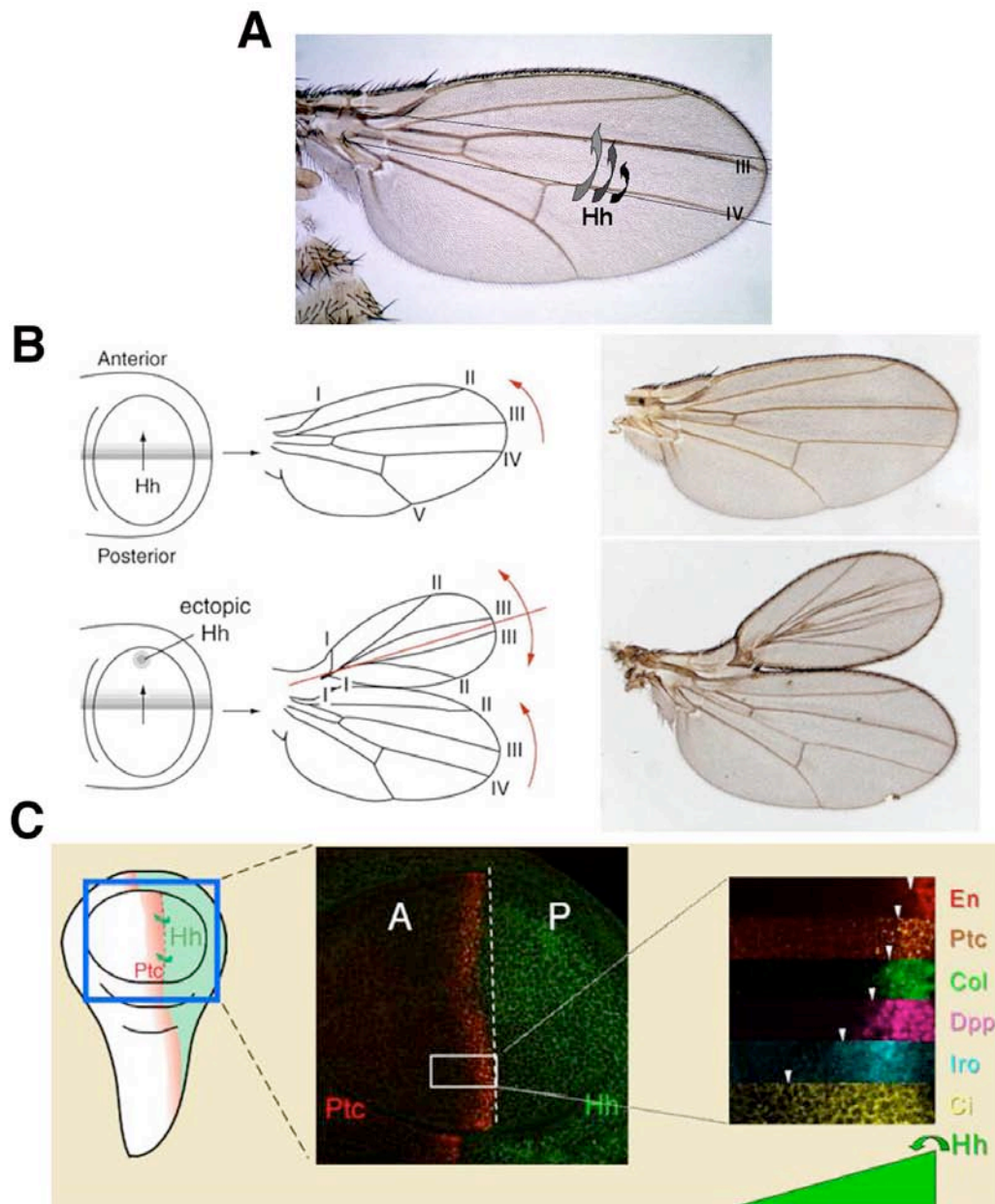


Figura 11: Hh y la especificación del patrón en el ala de *Drosophila*.

(A) Ala de individuo adulto. La actividad señalizadora de corto alcance de Hh es la responsable de la formación del patrón en la región central del ala: Hh especifica la posición de las venas L3 y L4 y el tejido intervena.

(B) Esquema y fotografía de un ala que expresa Hh de manera ectópica. Un clon de células que expresa Hh en el compartimento A induce una duplicación especular de esa región. Modificado de (Tabata and Takei, 2004).

(C) Esquema del disco imaginal de ala e inmunotinción de Hh y de los genes diana que activa. Hh (verde) se produce en las células del compartimento posterior del disco y difunde al compartimento anterior, donde induce la expresión de distintos genes en respuesta a los distintos niveles de concentración del morfógeno: En (rojo) y Ptc (naranja) responden a altos niveles de Hh; Col (verde) y Dpp (violeta) responden a niveles medios; e Iro (azul) responde a bajos niveles. La estabilización de Ci (amarillo) también depende del gradiente de Hh. Modificado de Torroja, 2005.

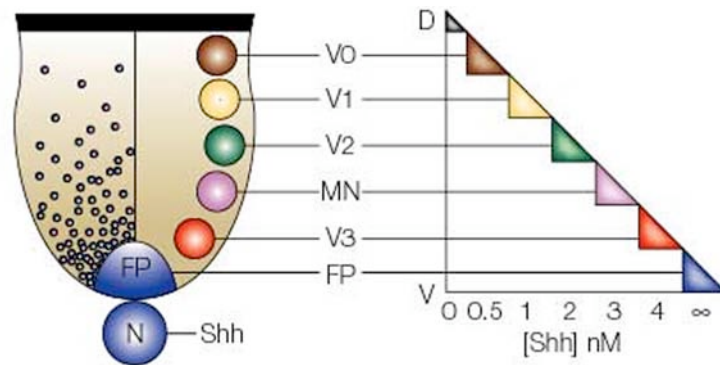


Figura 12: Shh especifica el patrón ventral del tubo neural de los vertebrados.

Esquema de un corte transversal, de la región ventral, del tubo neural de los vertebrados. Ventralmente, Shh (color violeta) es producido por la notocorda (N) e induce la formación de la placa del suelo (*floor plate*, FP). Shh se expresa también en la *floor plate* y genera un gradiente de actividad, a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural, que promueve la especificación de distintos tipos celulares ventrales: V0, V1, V2 y V3 representan cuatro tipos distintos de interneuronas ventrales; MN son motoneuronas. Modificado de Jessell, 2000.

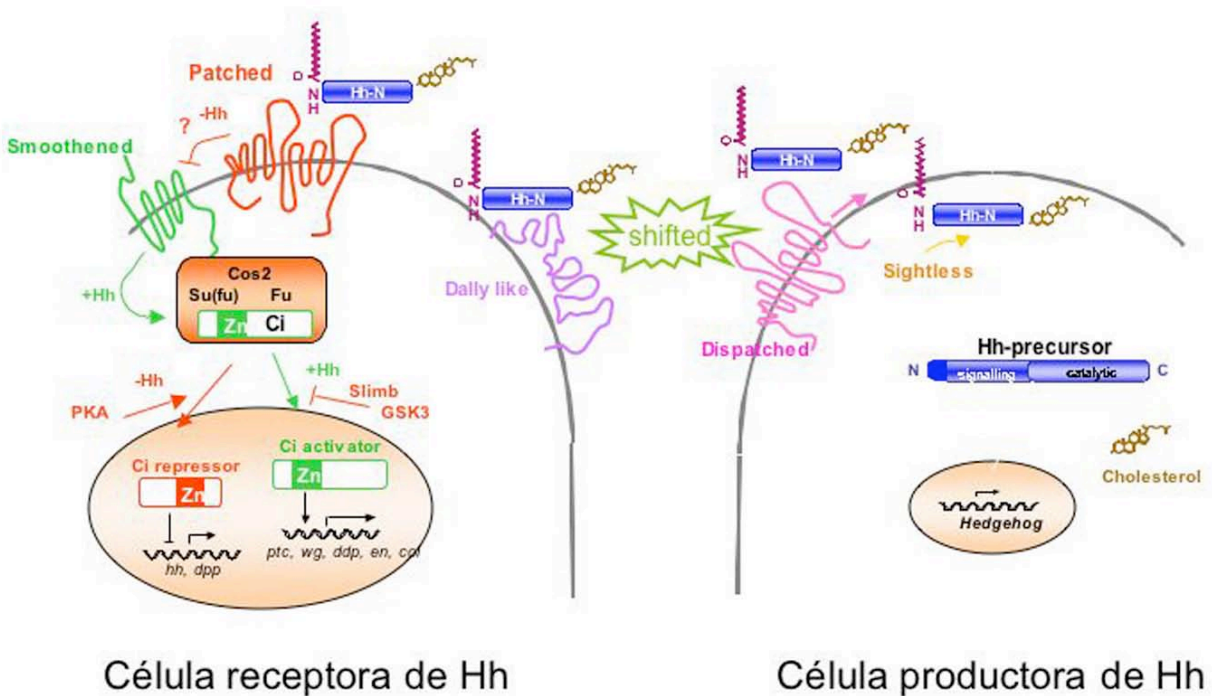


Figura 13: Esquema de los componentes de la vía de Hh, descritos en Drosophila. Ver explicación en el texto.

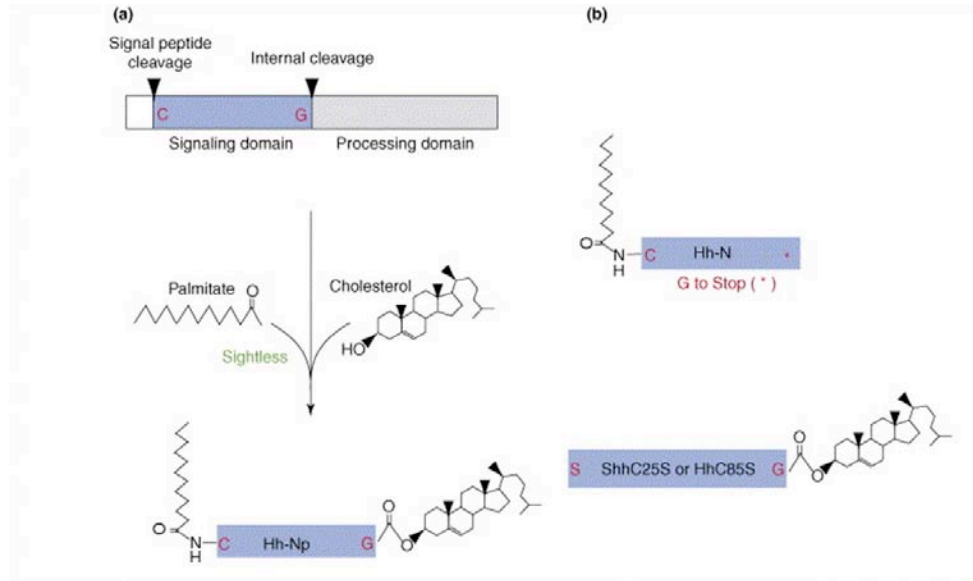


Figura 14: Biogénesis de Hh.

(a) Esquema del procesamiento y de las modificaciones lipídicas de Hh. El dominio N-terminal con actividad señalizadora se genera por la hidrólisis intramolecular de un precursor, asociada a la unión covalente de una molécula de colesterol. Además, Hh sufre una segunda modificación lipídica que consiste en la unión covalente de una molécula de ácido palmítico a la Cys amino terminal. Esta reacción está catalizada por una O-aciltransferasa unida a membrana codificada por el gen *sightless*.

(b) Formas mutantes de Hh no modificadas por lípidos. HhN: forma sin colesterol en la que una Gly se ha mutado a un codón de terminación, careciendo del dominio con actividad autocatalítica. HhC85S o ShhC25S: forma sin palmítico debido a una mutación puntual que cambia la Cys amino terminal por una Ser.

Modificado de Guerrero y Chiang, 2006.

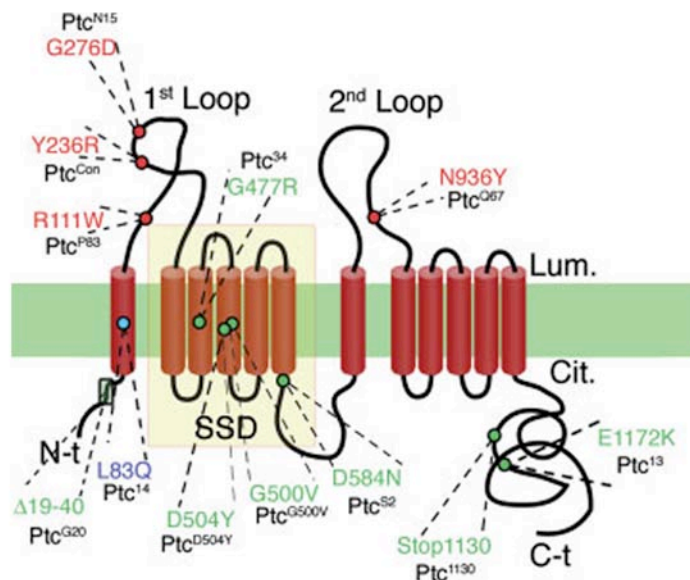


Figura 15: Esquema del receptor Ptc de *Drosophila*.

Ptc es una proteína integral de membrana, estructuralmente dividida en dos módulos, cada uno constituido por un lazo extracelular y seis dominios transmembrana. Los dominios transmembrana del 2 al 6 del primer módulo forman el SSD.

Las mutaciones que afectan a la señalización y al secuestro de Hh se indican en color rojo; las mutaciones que afectan a la señalización pero no al secuestro de Hh se indican en color verde; las mutaciones que afectan al secuestro de Hh pero no a la señalización se indican en color azul. Modificado de Torroja y cols., 2005.

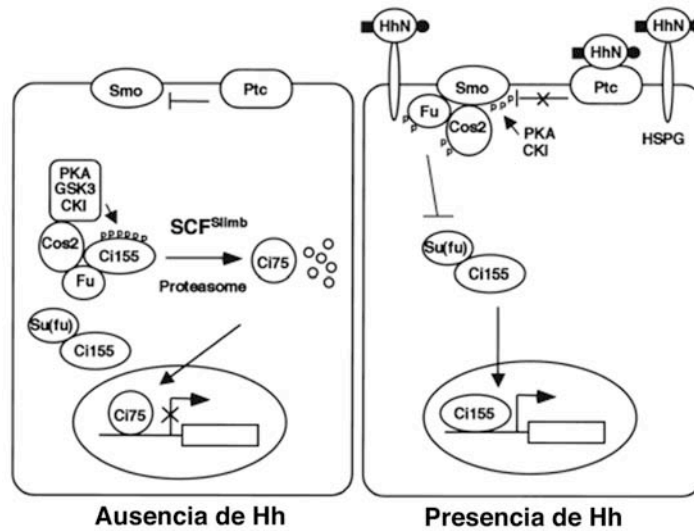


Figura 16: Transducción de la señal de Hh.

Esquema de la actividad de los componentes intracelulares de la vía de Hh, en ausencia y presencia de de la señal.

En ausencia de Hh, Ptc reprime a Smo; Ci¹⁵⁵ forma complejos con Cos2 y Fu y con Su(fu); Cos2 recluta a la PKA, GSK3 y CKI para fosforilar a Ci¹⁵⁵; Ci¹⁵⁵ hiperfosforilado es reconocido por SCF^{limb} quien lo dirige al proteosoma para dar lugar a la forma truncada, represora, Ci⁷⁵.

La unión de Hh a Ptc induce la fosforilación de Smo por PKA y CKI, lo que resulta en la acumulación en la superficie celular y en su activación. Smo recluta al complejo Cos2-Fu-Ci¹⁵⁵ en la membrana y se disocian las quinasas de Cos2, resultando en el no procesamiento de Ci¹⁵⁵. Además Ci¹⁵⁵ se disocia de Su(fu), translocándose al núcleo y activando la transcripción de los genes diana.

Modificado de Jia y Jiang, 2006 .

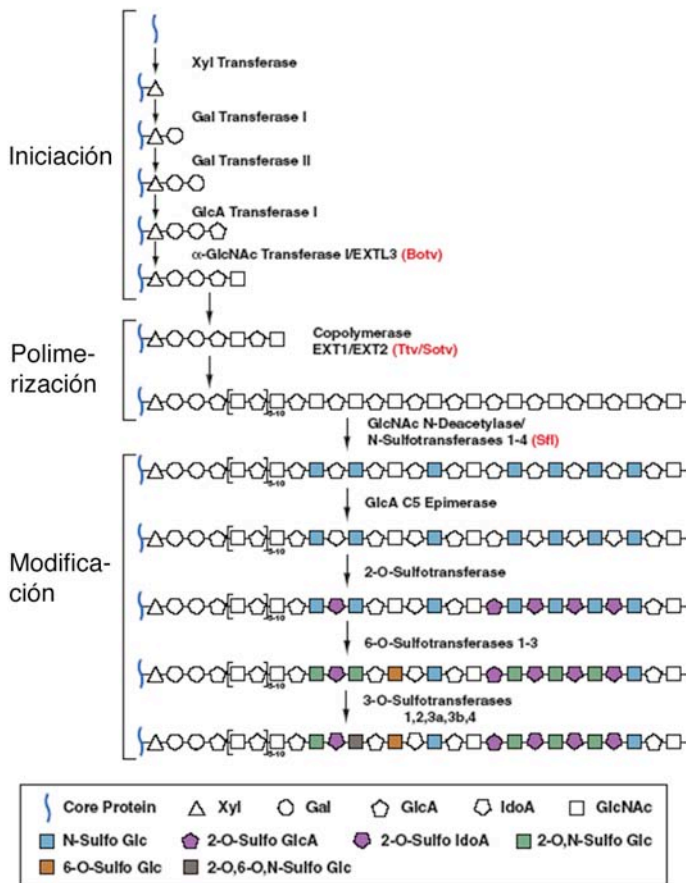


Figura 17: Biosíntesis de las cadenas de HSGAG.

Las cadenas de heparán sulfato glicosaminoglicanos se sintetizan sobre un núcleo proteico por la acción secuencial de glicosiltransferasas específicas. El proceso consta de tres pasos: iniciación de la cadena, polimerización y modificación.

Modificado de Lin, 2004.

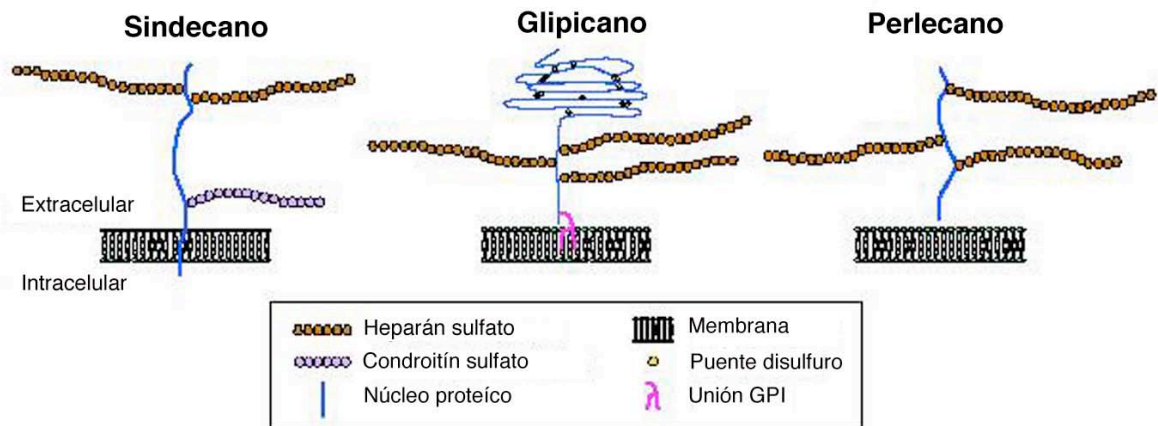


Figura 18: Clases de Heparán Sulfato Proteoglicanos (HSPGs).

Esquema de las tres clases de HSPGs, en función de la estructura de su núcleo proteico. Sindecanos: proteínas transmembrana en las que las cadenas glucídicas se disponen en el extremo distal N-terminal y pueden tener alguna cadena de condroitínsulfato. Glipicanos: proteínas globulares, estabilizadas por puentes disulfuro, que se unen a la membrana a través de un puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI); las cadenas glucídicas se localizan próximas a la membrana plasmática. Perlecanos: moléculas difusibles de la matriz extracelular, con cadenas de HSGAGs. Modificado de Lin, 2004.

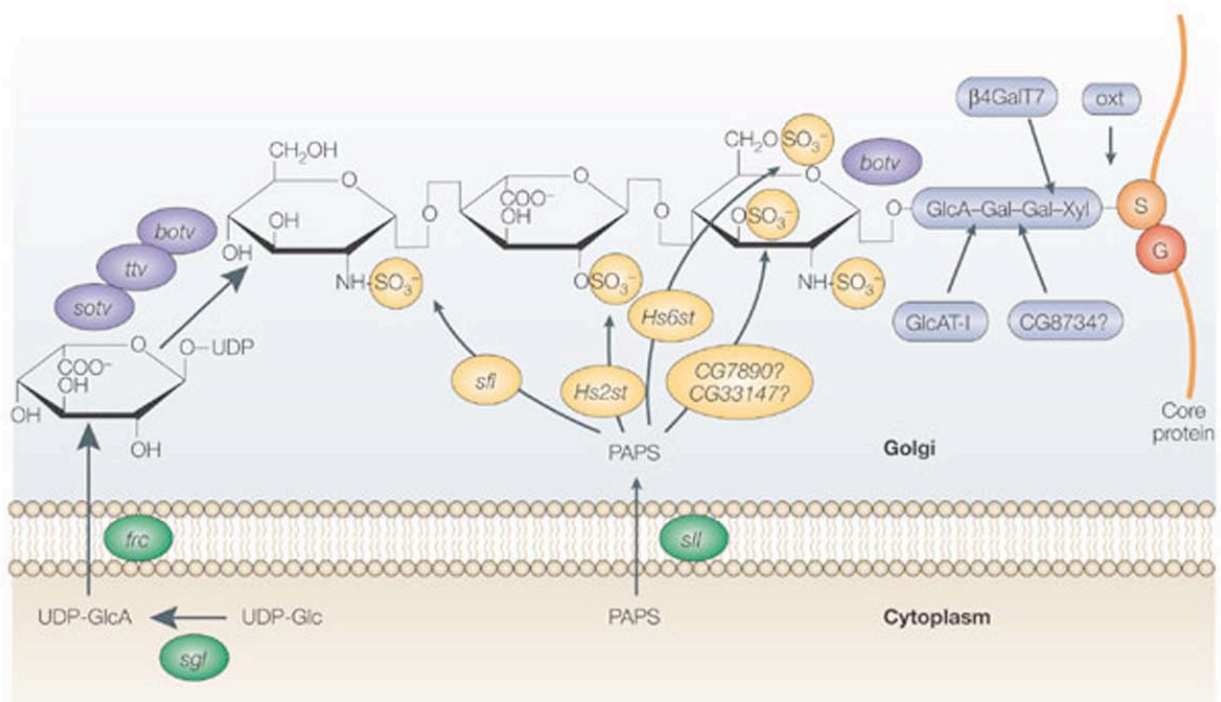


Figura 19: Esquema de los enzimas implicados en la síntesis de los HSPGs y cuya carencia tiene un efecto sobre la vía de Hh.

Ver explicación en el texto. Modificado de Hacker, 2005.

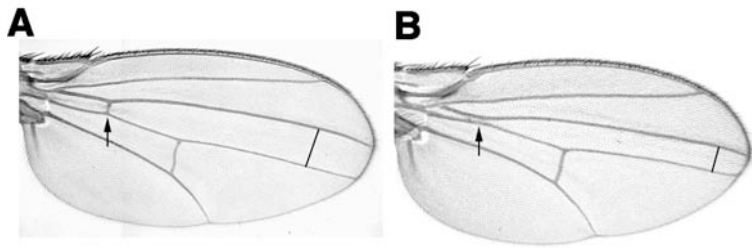


Figura 20: Fenotipo del ala de individuos shifted.

Alas de individuos adultos silvestres (A) e individuos mutantes para *shf* (*shf²*) (B). Nótese en *shf²* el menor tamaño del ala, el acercamiento de las venas L3 y L4 y la ausencia de la vena transversal anterior (punta de flecha).

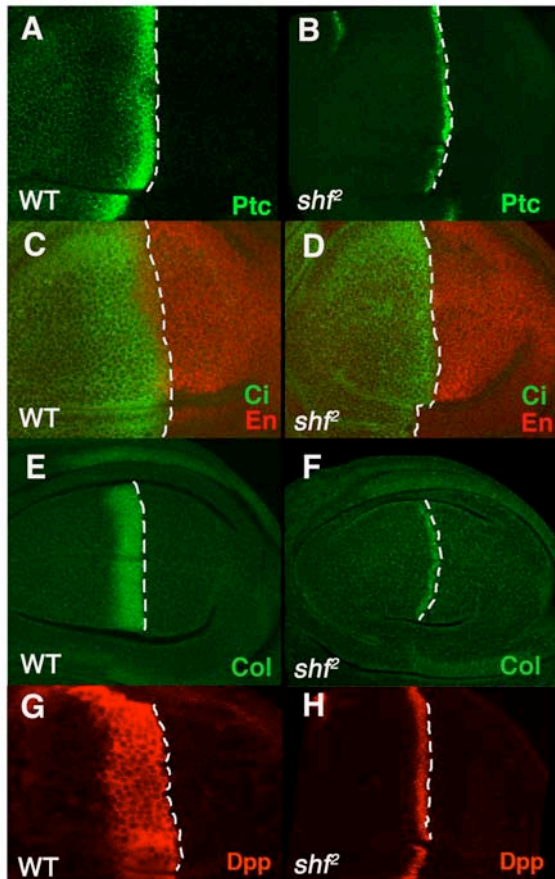


Figura 21: shifted es un componente de la vía de Hh .

Discos de ala de larva 3, teñidos para distintas dianas de la vía de Hh: anti-Ptc (verde) (A y B), anti-Ci (verde) y anti-En (rojo) (C y D), anti-Col (verde) (E y F) y *dpp-lacZ* (rojo) (G y H). A, C, E y G son discos silvestres; B, D, F y H son discos *shf²*. En ésta y en las demás figuras el disco se encuentra orientado con el compartimento anterior a la izquierda y el compartimento ventral hacia arriba. El borde de compartimento A/P se indica mediante una línea discontinua blanca. En los discos *shf²*, los dominios de expresión de las dianas de la vía de Hh están reducidos en el borde A/P.

Figura 22: shf codifica una proteína ortóloga a la proteína WIF-1 (Wnt inhibitor factor-1) de vertebrados.

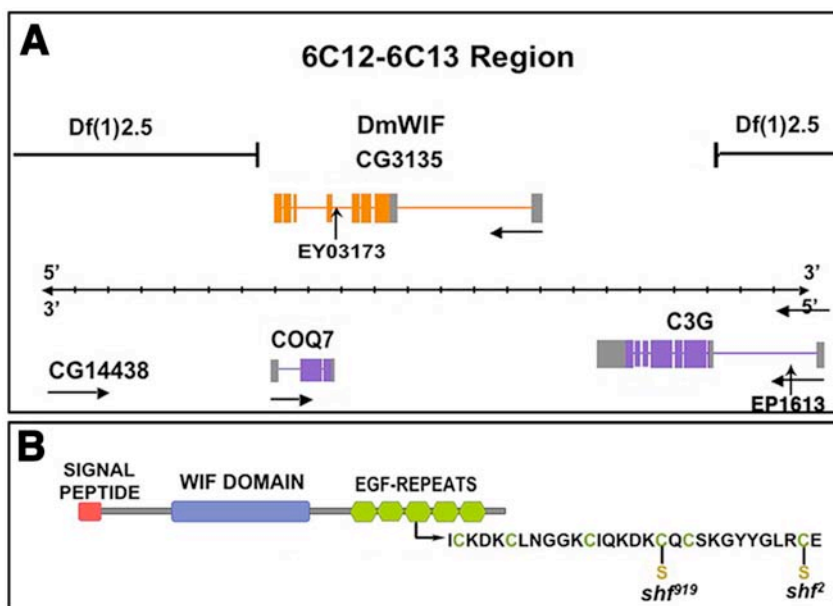
(A) Región genómica del locus shifted.

La deficiencia *Df(1)2.5* se generó por escisiones imprecisas del elemento P *EP1613*. Esta deficiencia cubre tres unidades de transcripción: *COQ7*, *C3G* y *CG3135*; sólo *CG3135* rescata el fenotipo *shf²*. *EY03173* es un elemento P insertado a 38 nucleótidos del quinto exón de *CG3135* y es mutante para el locus *shf*. Las flechas verticales indican inserciones de elementos P; las flechas horizontales indican el sentido de la transcripción. La región genómica se encuentra orientada con el extremo distal hacia la derecha y el extremo proximal a la izquierda.

(B) Estructura de la proteína DmWIF.

La secuencia del cDNA (GH27042) del gen *CG3135* codifica una proteína de 456 aminoácidos, que es ortóloga a la proteína WIF-1 de vertebrados (Flybase: <http://flybase.bio.indiana.edu>). DmWIF está constituida, desde su extremo N-terminal, por: un péptido señal, un dominio WIF, cinco dominios EGF en tandem, y una cola C-terminal hidrofóbica (<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q9W3W5>).

Se muestra también la secuencia de aminoácidos del tercer dominio EGF de la proteína, donde mapean las dos mutaciones puntuales (de C a S) encontradas en los alelos *shf^{p19}* y *shf²*.



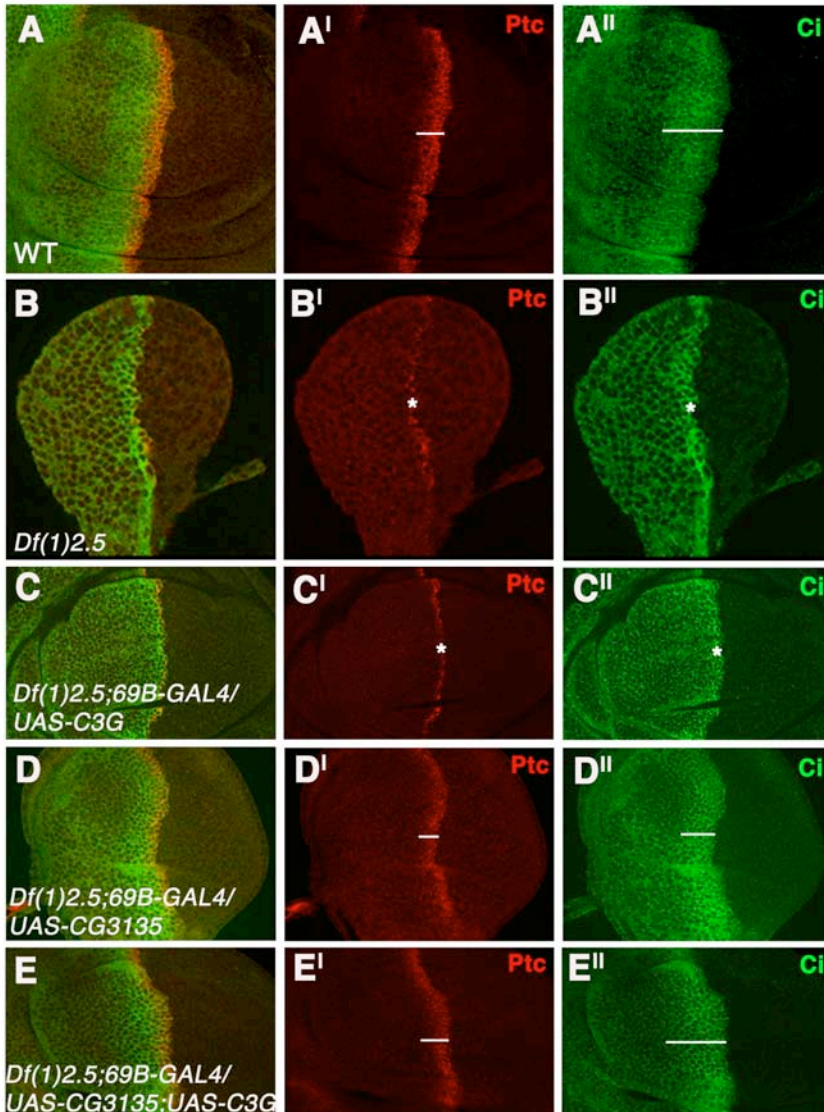


Figura 23: El gen *CG3135* rescata la expresión de las dianas de Hh en el borde A/P de compartimento, en discos *shifted*.

Discos imaginales de ala de larva 3 teñidos con anti-Ptc (A, A', E, E') y anti-Ci (A, A''- E, E''). (A-A'') Discos silvestres. (B-B'') Discos homocigotos para la deficiencia *Df(1)2,5*: éstos son más pequeños que los discos de individuos silvestres y la expresión de las dianas de Hh en el borde A/P del disco está reducida. (C-C'') Sobreexpresión del gen *C3G* con la línea de expresión generalizada *69B-GAL4*, en moscas *Df(1)2,5*: se recupera en un 80% el tamaño del disco, pero la expresión de Ptc y Ci en el borde A/P de compartimento se mantiene reducida. (D-D'') Sobreexpresión del gen *CG3135* con la misma línea *GAL4*, en moscas con la deficiencia *Df(1)2,5*: se rescata la expresión de Ptc y Ci en el borde A/P de compartimento, pero no así el tamaño de estos discos. (E-E'') Expresión simultánea de *CG3135* y de *C3G* en las moscas *Df(1)2,5*: se rescata casi por completo el tamaño del disco, así como la expresión de las dianas de Hh en el borde A/P de compartimento.

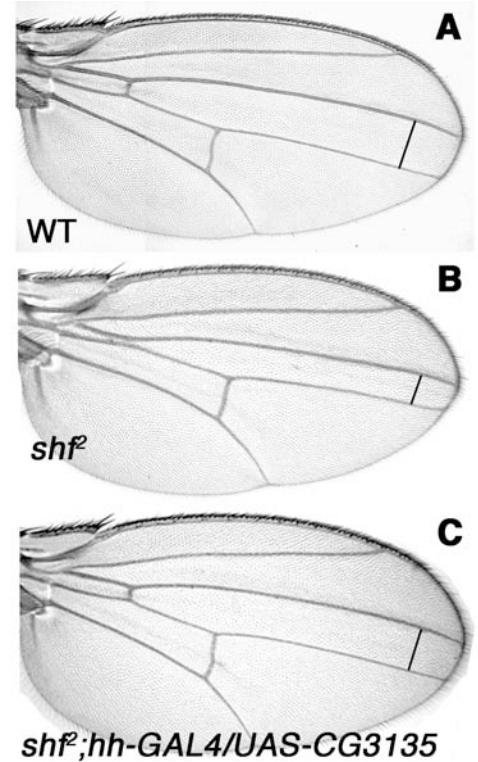


Figura 24: El gen *CG3135* rescata el fenotipo *shf2* en el ala adulta.

(A) Ala adulta de un individuo silvestre. (B) Ala adulta de un individuo *shifted*.

(C) Sobreexpresión de *CG3135* en el compartimento posterior del disco de ala *shf2* (*hh-Gal4/UAS-CG3135*): se rescata el fenotipo *shf* de acercamiento de venas L3 y L4 en el ala adulta.

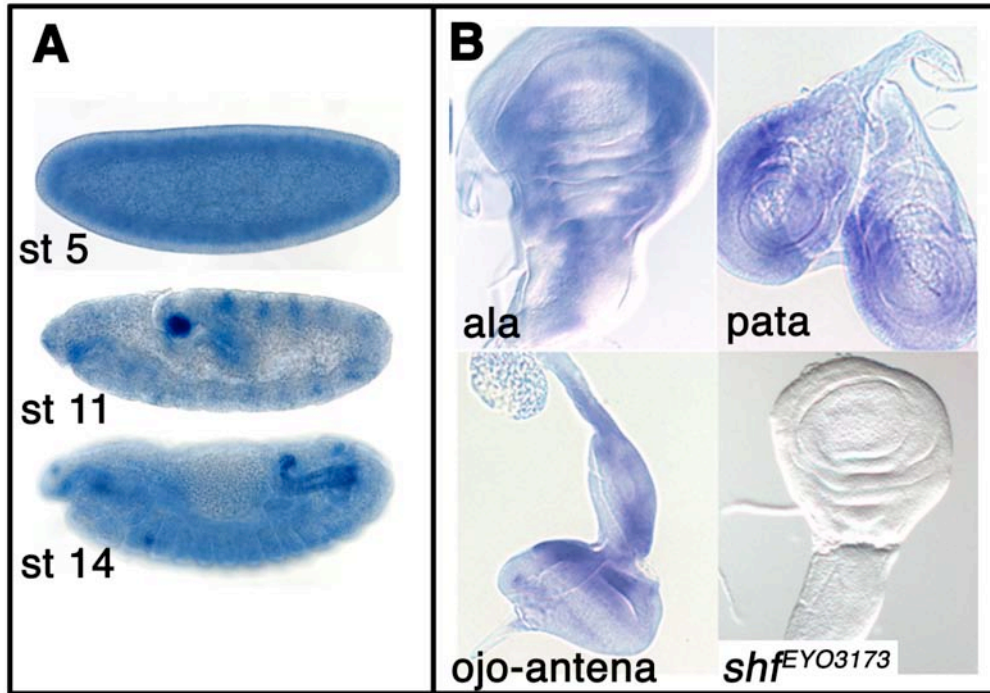


Figura 27: Patrón de expresión de *shifted* durante el desarrollo.

Hibridación “in situ” con una sonda de RNA específica para *shf*, marcada con digoxigenina {Tautz, 1989 #296}.

(A) **Patrón embrionario:** *shf* se expresa de manera generalizada en el estadio de blastodermo (st 5). A medida que avanza la embriogénesis, se detecta en la epidermis y en el sistema nervioso central con un patrón segmentado, así como en el intestino anterior y posterior (st 11 y st 14).

(B) **Patrón en discos imaginales:** En el disco de ala, se detecta un alto nivel de expresión en la parte más anterior y posterior del disco, y una casi ausencia de expresión coincidiendo con el borde A/P de compartimento; lo mismo sucede en los discos de pata. En el disco de ojo, el nivel de expresión de *shifted* disminuye en la zona correspondiente al surco morfogenético. En el alelo *shf^{EYO3173}* no se detecta la expresión del transcrito de DmWIF.

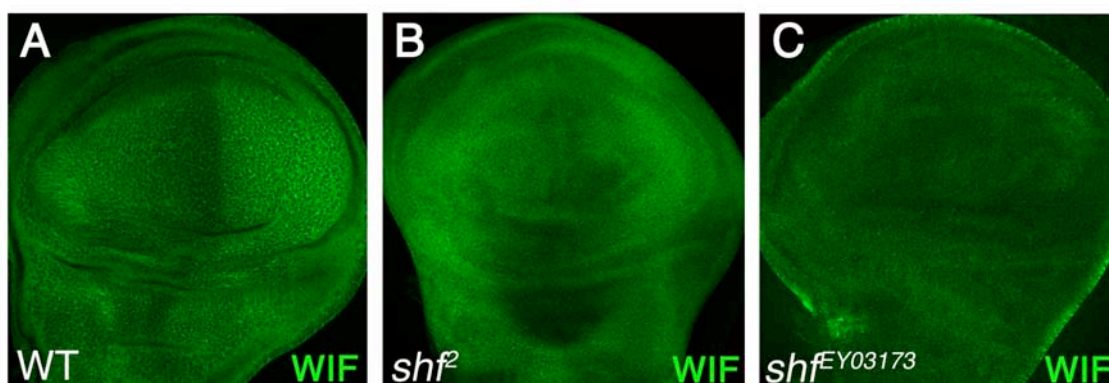


Figura 28: Distribución de la proteína Dm-WIF en el disco de ala.

Tinción con anticuerpo anti-DmWIF en el disco imaginal de ala de larva 3. (A) En los discos silvestres la proteína se detecta en la parte más anterior y posterior del disco, con un vano en la parte central; además, se observa una modulación positiva de la proteína en el compartimento posterior. (B) En *shf²*, la proteína se distribuye de una manera difusa por la zona central del disco y carece de la modulación positiva en el compartimento posterior. (C) En el alelo *shf^{EYO3173}* no se detecta la proteína.

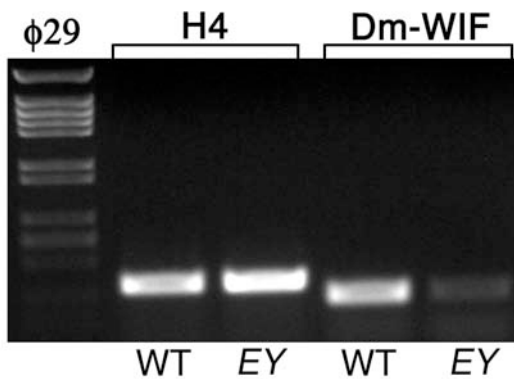


Figura 29: *shf^{EY03173}* es un alelo nulo. RT-PCR de *shf* en el alelo *shf^{EY03173}* y en el alelo silvestre. Los fragmentos de $\phi 29$ digerido con HindIII son marcadores del tamaño del DNA. Como control interno analizamos la expresión de la histona H4 en los dos alelos. El experimento da como resultado la casi nula presencia del transcrito en el extracto celular del alelo mutante.

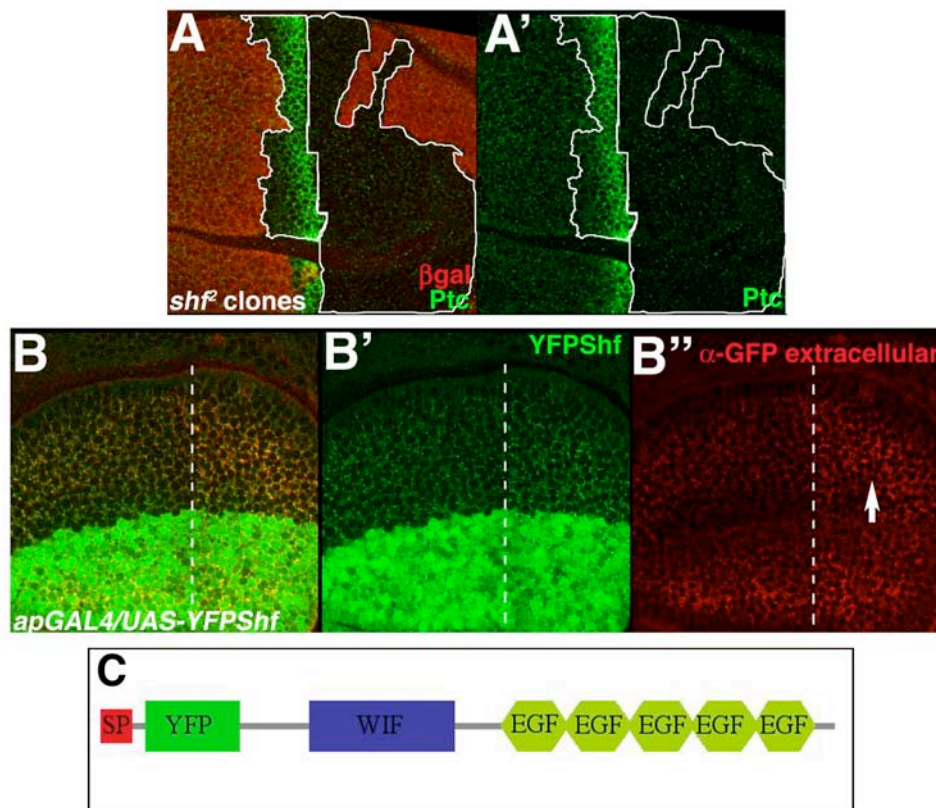


Figura 30: Dm-WIF es un factor difusible.

(A, A') Clones *shf²* en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Ptc (verde) y anti- β -galactosidasa (rojo); la ausencia de rojo marca el clon. La expresión de Ptc no se ve afectada dentro del clon, lo que indica que la proteína DmWIF que expresan las células silvestres tiene un efecto no autónomo que es capaz de rescatar a las células mutantes.

(B-B'') Sobreexpresión de YFP-DmWIF (verde) en el compartimento dorsal del disco de ala (*apGal4/UAS-YFP-DmWIF*) y tinción extracelular con anti-GFP (rojo). La línea discontinua señala el borde A/P de compartimento. (B') YFP-DmWIF también se detecta en el compartimento ventral, lo que indica que es un factor secretable y difusible. (B, B'') Colocalización del marcaje del anticuerpo con la fluorescencia de la YFP, lo que indica la localización extracelular de DmWIF.

(C) Esquema de la proteína quimera YFP-DmWIF. La YFP se fusionó entre el péptido señal y el dominio WIF, manteniendo el marco de lectura: de esta manera se garantiza la funcionalidad del péptido señal y el transporte de la proteína a la membrana.

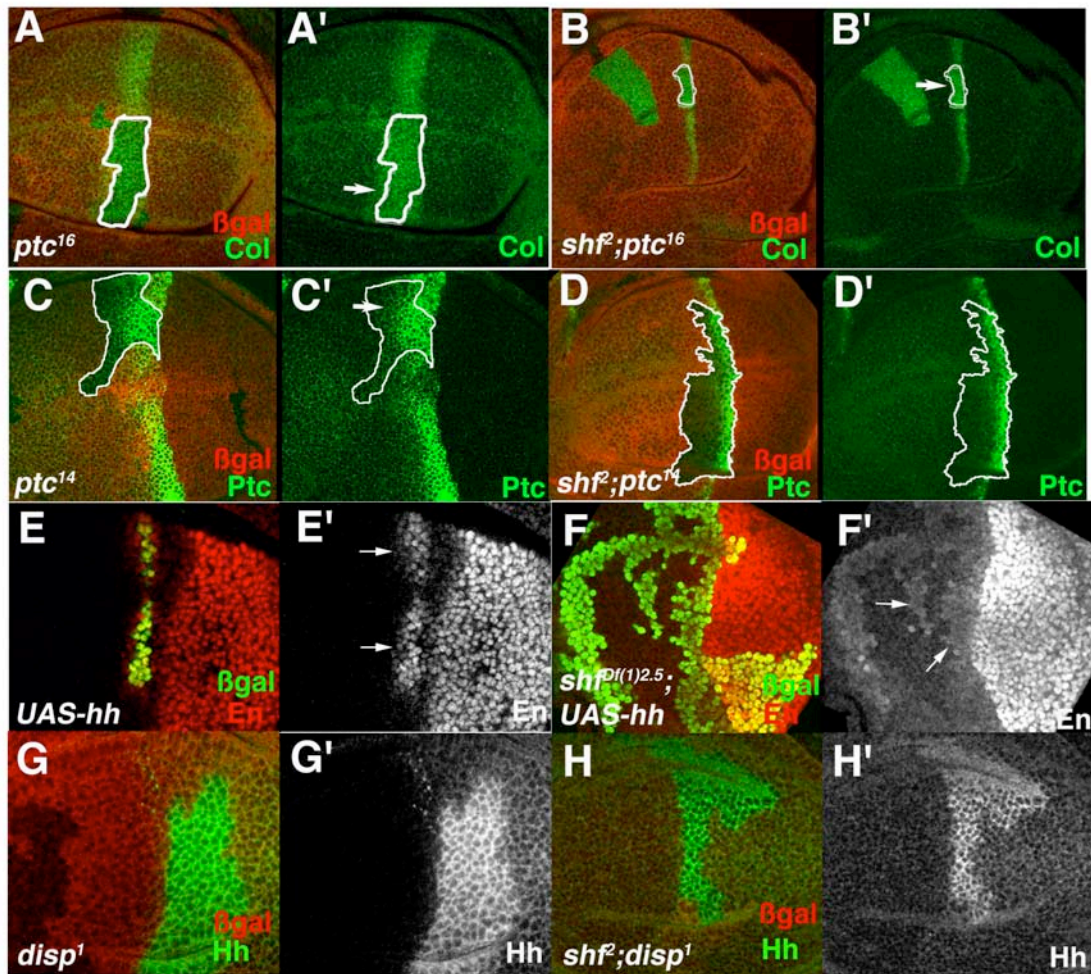


Figura 31: *shifted* actúa por encima (“upstream”) de *ptc* en la vía de Hh.

(A-B') Clones *ptc*¹⁶ en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Col (verde) y anti-β-galactosidasa (rojo); la ausencia de rojo marca el clon. En fondo silvestre (A, A'), *col* se activa dentro del clon y en las células silvestres anteriores al clon (flecha A') debido a que Hh no se retiene por la falta de proteína Ptc, lo que permite una difusión del morfógeno a través del clon. En fondo *shf*² (B, B'), *col* se activa dentro del clon: esto indica que *ptc* es epistático respecto a *shf*. Sin embargo, no se detecta en las células silvestres anteriores al clon (flecha B'), lo que indica que Hh no difunde a través del mismo.

(C-D') Clones *ptc*¹⁴ en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Ptc (verde) y anti-β-galactosidasa (rojo); la ausencia de rojo marca el clon. En fondo silvestre (C, C'), *ptc* no se activa constitutivamente dentro del clon, pero sí se extiende el gradiente de Hh debido a una menor retención de Hh por la proteína mutante Ptc¹⁴ (Torroja et al., 2004), lo que produce una expansión del rango de activación de *ptc*. En fondo *shf*² (D, D'), el rango de activación de *ptc* en los clones *ptc*¹⁴ es el mismo que en las células de fuera del clon, lo que se interpreta como que en el doble mutante no se extiende el gradiente de Hh. Este resultado indica que Shf es capaz de rescatar el efecto de una mayor difusión de Hh en las células mutantes *ptc*¹⁴.

(E-F') Clones de expresión ectópica de Hh en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-En (rojo) y anti-β-galactosidasa (verde); la presencia de verde marca el clon. En fondo silvestre (E, E'), *en* se activa dentro del clon y en las células silvestres adyacentes al clon (flecha E'). En los discos *shf*^{Df(1)2.5}, la expresión de *en* se localiza en el interior del clon (flecha F'), pero no se detecta la señalización no autónoma (F, F'). Este dato confirma que en los mutantes *shf* la recepción no está afectada.

(G-H') Clones *disp*^{S037707} en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Hh (verde) y anti-β-galactosidasa (rojo); la ausencia de rojo marca el clon. En un fondo silvestre, Hh se acumula en la superficie de las células del clon (G, G'). En los discos *shf*² no se aprecia ninguna diferencia en los niveles de acumulación de Hh, respecto a los de los clones *disp*¹ en fondo silvestre (H, H'). Este resultado sugiere que la secreción de Hh hasta la membrana plasmática en las células productoras no se ve afectada en los mutantes *shf*.

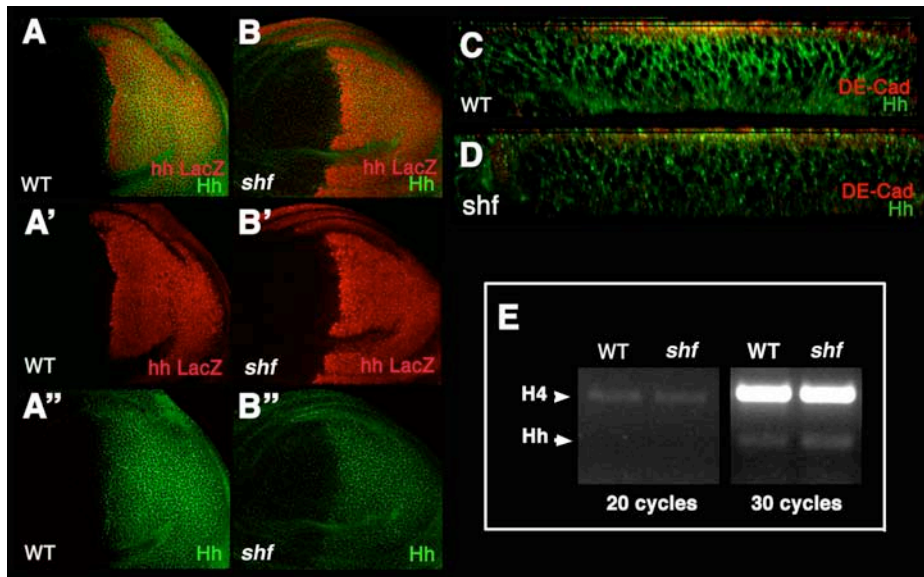


Figura 32: DmWIF estabiliza a Hh en el compartimento posterior.

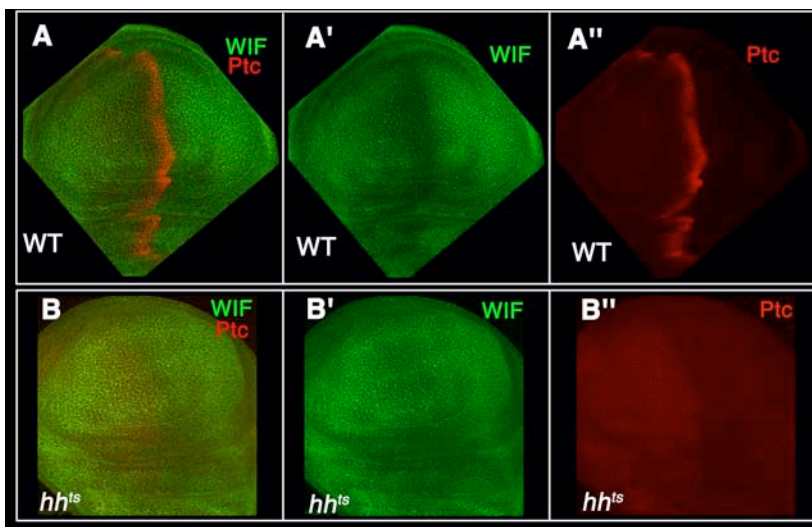
(A-B'') Tinción con anticuerpo anti-Hh (verde) y anti-β-galactosidasa (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos silvestres (A-A'') y *shf^{EY03173}* (B-B''). No se observa ninguna diferencia en la tinción con anti-β-galactosidasa entre discos silvestres (A') y discos mutantes *shf^{EY03173}* (B'), lo que sugiere que DmWIF no afecta a la expresión endógena de *hh*. En la tinción con anti-Hh, se aprecia una disminución generalizada de los niveles de proteína en el disco *shf^{EY03173}* (B'') respecto al silvestre (A''). Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia con dos programas de tratamiento de imágenes, de manera independiente (Metamorph e ImageJ), y se detectó una diferencia del 40% en los niveles de la proteína entre los discos silvestres y mutantes. Esto indica que DmWIF estabiliza a Hh en las células productoras del morfógeno.

(C-D) Secciones ópticas ortogonales de un disco de ala silvestre (C) y *shf^{EY03173}* (D), teñido con anticuerpo anti-Hh (verde) y anti-DE-cadherina (rojo). La disminución de la señal de Hh se produce de manera uniforme, tanto en la superficie apical como en la basolateral de las células de los discos mutantes. La DE-cadherina marca la región apical del disco. La línea negra señala el límite entre la membrana peripodial y las células del disco propio.

(E) RT-PCR semicuantitativa que compara los niveles de transcripción de *hh* entre individuos silvestres y mutantes *shf^{EY03173}*. En ambos casos, la banda correspondiente al transcrito de *hh* tiene la misma intensidad, lo que confirma que DmWIF no afecta a la expresión de *hh*. Como control interno analizamos la expresión de la histona H4 en los dos alelos (banda superior), mostrando el mismo nivel de intensidad tanto a 20 ciclos como a 30 ciclos de PCR.

Figura 33: Hh estabiliza a DmWIF en el compartimento posterior.

Tinción con anticuerpo anti-WIF (verde) y anti-Ptc (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos silvestres (A-A'') y *hh^{ts2}* después de 18 horas a temperatura restrictiva (B-B''). En el fondo mutante *hh^{ts2}*, la proteína DmWIF carece de la modulación positiva en el compartimento posterior y desaparece el borde definido entre el compartimento anterior y posterior (B, B'). Por tanto, la acumulación de DmWIF en el compartimento posterior se debe a una estabilización de la proteína mediada por Hh. Nótese en el disco *hh^{ts2}* la ausencia de la banda de Ptc en el borde A/P, debido a la carencia de Hh funcional (B'').



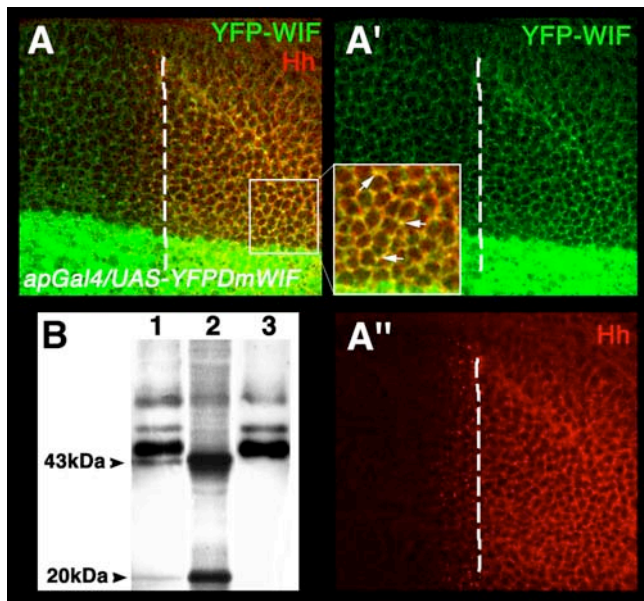


Figura 34: Hh y DmWIF interactúan físicamente.

(A-A'') Colocalización de Hh y YFP-DmWIF. Sobreexpresión de YFP-DmWIF (verde) en el compartimento dorsal del disco de ala (*apGal4/UAS-YFP-DmWIF*) y tinción extracelular con anti-Hh (rojo). El marcaje del anticuerpo colocaliza con la fluorescencia de la YFP en el compartimento posterior (ampliación y flechas). La línea discontinua señala el borde A/P de compartimento.

(B) Inmunoprecipitación de Hh y YFP-DmWIF. Carril 1: "Western blot" de un extracto de proteínas de glándulas salivares que sobreexpresan YFP-DmWIF y Hh (*ABI-Gal4/UAS-Hh, UAS-YFPDmWIF*), inmunoprecipitado con anticuerpo anti-GFP. Carril 2: "Western blot" de un extracto de proteínas de glándulas salivares que sobreexpresan Hh (*ABI-Gal4/UAS-Hh*). Carril 3: "Western blot" de un extracto de proteínas de glándulas salivares de moscas *yw*, inmunoprecipitado con anti-GFP. Los tres "Western blot" se revelaron con anticuerpo anti-Hh. Tanto en el control positivo (carril2), como en el ensayo experimental de inmunoprecipitación se obtienen dos bandas específicas, de 43kDa y de 19,5kDa, que corresponden a la forma completa y procesada, respectivamente, de Hh. Por el contrario, en el control negativo (carril3) no aparecen estas dos bandas específicas. Las bandas inespecíficas que aparecen en los carriles 1 y 3 corresponden a las inmunoglobulinas.

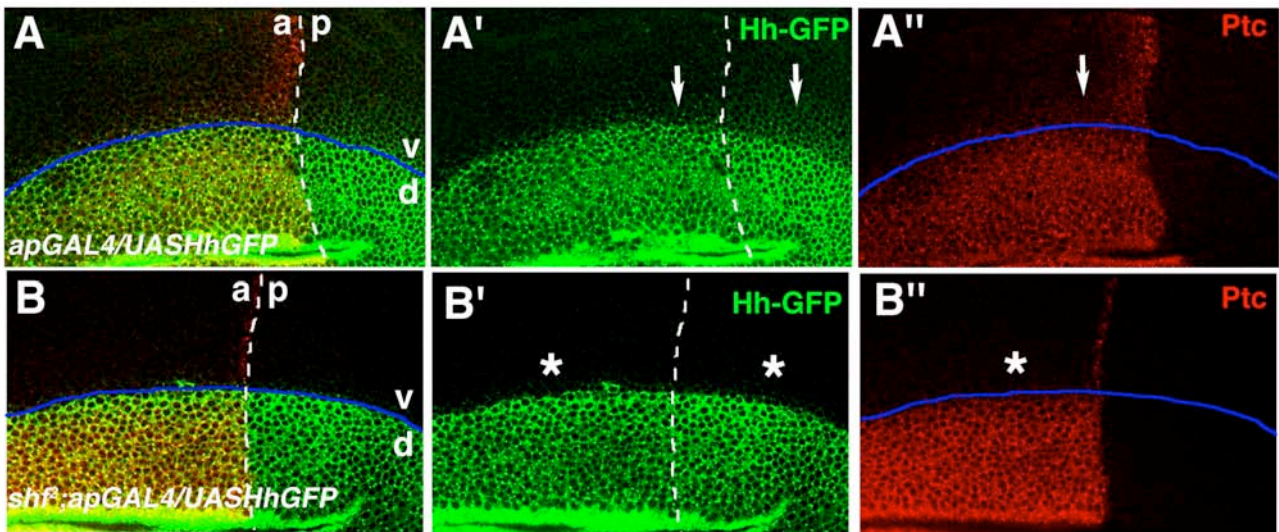


Figura 35: DmWIF es necesario para la difusión de Hh.

Sobreexpresión de Hh-GFP (verde) en el compartimento dorsal del disco de ala (*ap-GAL4/UAS-hhGFP*) en discos silvestres (A-A'') y mutantes *shf²* (B-B''). La tinción con anticuerpo anti-Ptc (rojo) muestra la activación de las dianas en el territorio donde señala el morfógeno. La línea discontinua blanca señala el borde A/P de compartimento y la línea discontinua azul señala el borde dorsoventral.

En los discos silvestres, Hh-GFP difunde hacia el compartimento ventral (A, A'). Las flechas en (A') señalan el menor rango de difusión de Hh-GFP en el compartimento anterior respecto al compartimento posterior. Las estructuras punteadas de Hh-GFP en el compartimento anterior corresponden a vesículas endocíticas de Hh internalizado por Ptc {Torroja, 2004 #146}. Ptc se induce en un rango de ocho células ventrales desde el borde dorso ventral del compartimento anterior (flecha en A''), que corresponde a la zona de difusión de Hh-GFP.

En los discos mutantes *shf²*, Hh-GFP no difunde al compartimento ventral (B, B', asteriscos en B'). En consecuencia, tampoco se detecta la señal de Ptc en células ventrales del borde D/V (B'', asterisco en B''). La señalización en las células que producen Hh-GFP no se ve afectada (B'').

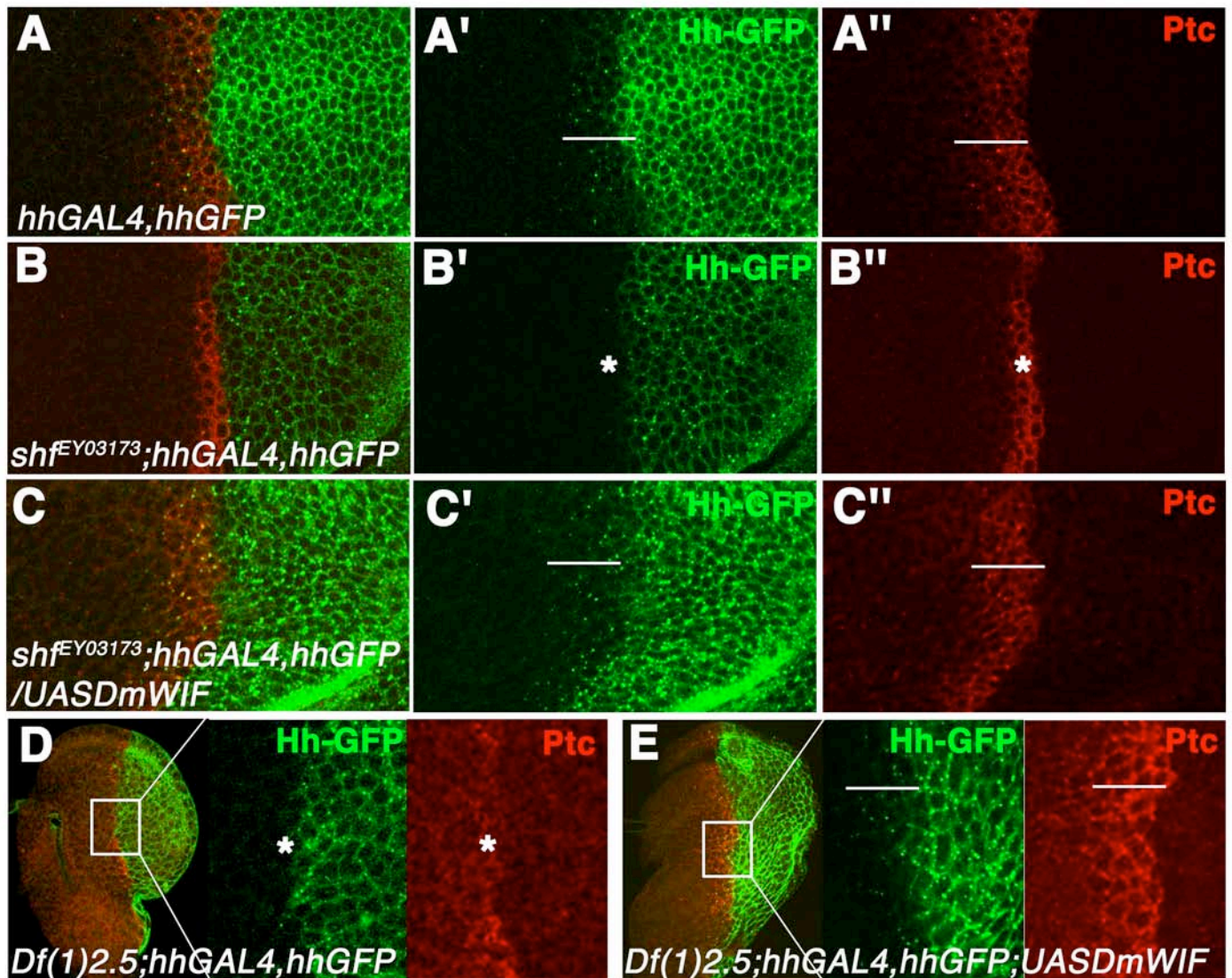


Figura 36: DmWIF rescata la difusión de Hh en individuos mutantes *shf*.

Sobreexpresión de Hh-GFP (verde) en el compartimento posterior del disco de ala en individuos silvestres (A-A''), mutantes *shf* (B-B'' y D), y mutantes *shf* que sobreexpresan DmWIF en posterior (C-C'' y E). La tinción con anticuerpo anti-Ptc (rojo) muestra el rango de activación de esta diana.

En individuos silvestres, Hh-GFP difunde desde las células productoras del compartimento posterior hacia el compartimento anterior (A, A' y línea blanca en A'). Como consecuencia, Ptc se activa en 6-8 diámetros celulares en el compartimento anterior (A'' y línea blanca en A'').

En los individuos *shf*^{EY03173}, no se detecta difusión de Hh-GFP desde las células productoras del compartimento posterior hacia el compartimento anterior (B, B' y asterisco en B'). El rango de la señalización está restringido a la primera línea de células del compartimento anterior (B'' y asterisco en B''). Lo mismo ocurre en los discos portadores de la deficiencia *Df(1)2.5* (D y asterisco en ampliaciones del panel D).

La sobreexpresión de DmWIF en los individuos mutantes, rescata la difusión de Hh-GFP en el compartimento anterior (C, C', línea blanca en C', E, línea blanca en ampliación de E). Así mismo, se rescata la señalización (expresión de *ptc*) en el borde A/P del compartimento anterior (C, C'', línea blanca en C'', E, línea blanca en ampliación de E). El conjunto de estos experimentos confirma que DmWIF se requiere para la difusión de Hh.

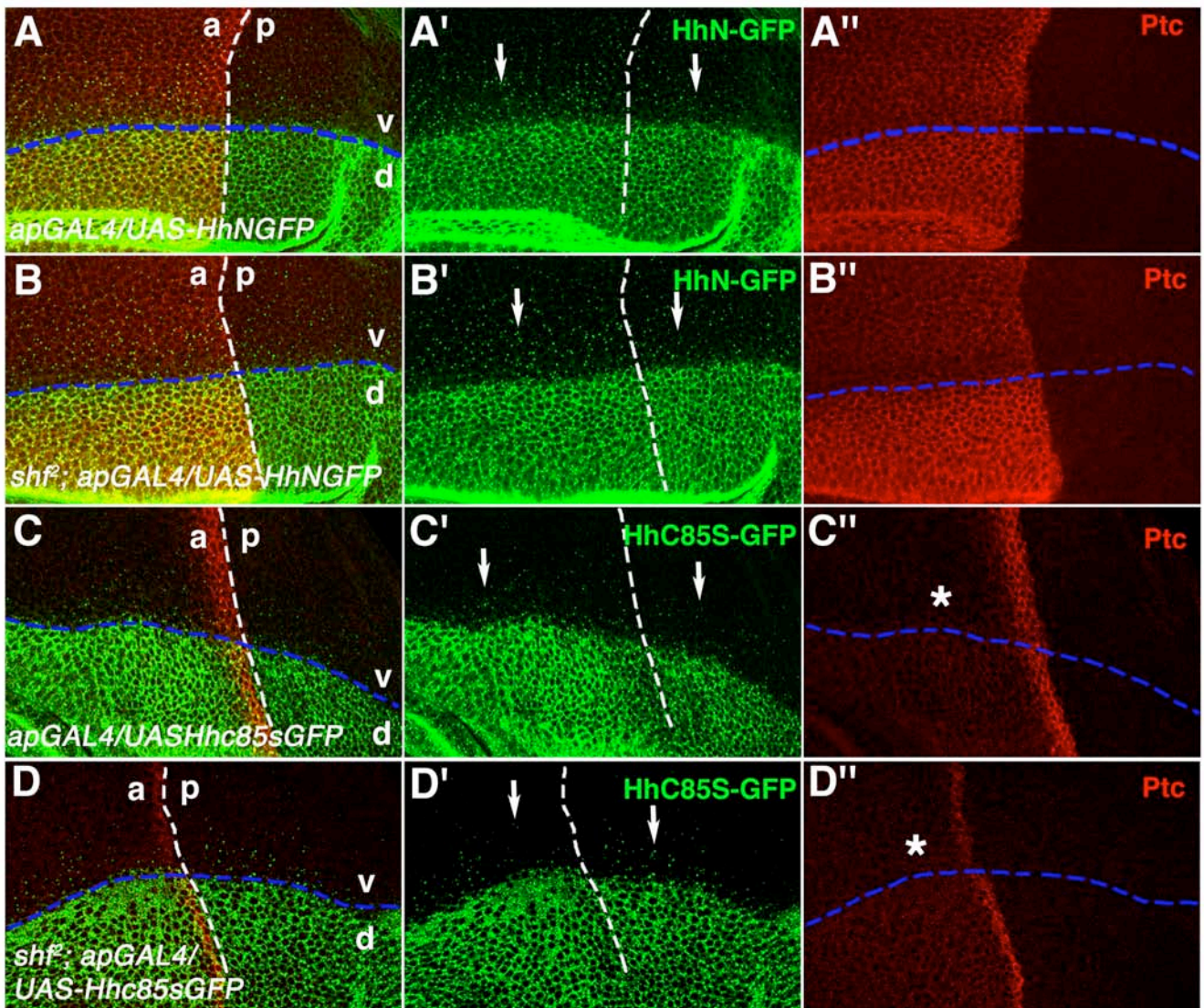


Figura 37: DmWIF sólo regula la difusión de Hh modificado por lípidos.

Sobreexpresión de HhN-GFP (A-B'') o HhC85S-GFP (C-D'') (ambos en verde) en el compartimento dorsal del disco de ala en discos silvestres (A-A'' y C-C'') y mutantes *shf*² (B-B'' y D-D''). La tinción con anticuerpo anti-Ptc (rojo) muestra la activación de las dianas en el territorio donde señala el morfógeno. La línea discontinua blanca señala el borde A/P de compartimento y la línea discontinua azul señala el borde dorsoventral.

En los discos silvestres, tanto en el caso de HhN-GFP (A, A') como de HhC85S-GFP (C, C'), la proteína se detecta por todo el compartimento ventral (flechas en A' y B'). Esto se debe a una difusión no controlada por los HSPG de la matriz extracelular ni por el receptor Ptc {Callejo, 2006 #81}. Las estructuras punteadas GFP (flechas en A' y B') corresponden a vesículas endocíticas de Hh internalizado, pero por un mecanismo independiente de Ptc {Callejo, 2006 #81}.

La tinción con anticuerpo anti-Ptc muestra la activación de esta diana en el territorio donde señala el morfógeno. En el caso de HhN-GFP, Ptc se induce en todo el compartimento anterior: en dorsal - que corresponde a las células que producen HhN-GFP - y en menor grado en ventral - que corresponde a la zona de difusión de la proteína - (A, A''). Sin embargo, HhC85S-GFP sólo señala debilmente, de manera autónoma, en el compartimento anterior dorsal: es decir, en las células que producen el morfógeno (C, C'') y no se aprecia el efecto no autónomo de HhC85S-GFP (asterisco en C'').

En un fondo *shf*² obtenemos el mismo resultado que en un fondo silvestre. Tanto en el caso de HhN-GFP (B, B'') como de HhC85S-GFP (D, D''), la proteína se detecta por todo el compartimento ventral (flechas en B' y D'). La ausencia de DmWIF no provoca ningún efecto en la señalización de Hh sin lípidos: con HhN-GFP, Ptc se induce en todo el compartimento anterior (B, B''); con HhC85S-GFP, Ptc se induce debilmente en el compartimento anterior dorsal (D, D'') y no se aprecia el efecto no autónomo del morfógeno (asterisco en D'').

Por tanto, concluimos que la función de DmWIF como regulador de la difusión de Hh sólo se produce sobre la proteína modificada por lípidos.

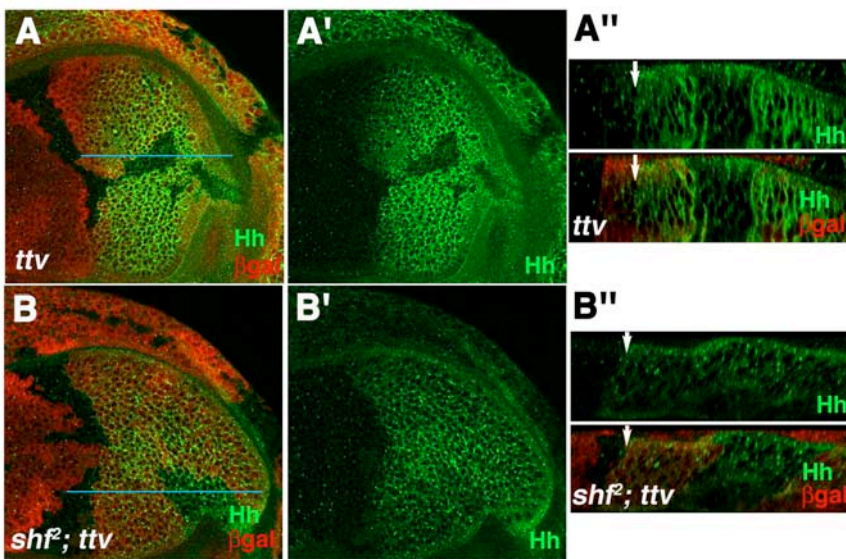


Figura 38: DmWIF se requiere para la estabilización de Hh por los HSPGs. (A-B'') Clones *ttv⁰⁰⁶⁸¹* en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Hh (verde) y anti-β-galactosidasa (rojo); la ausencia de rojo marca el clon. En un fondo silvestre (A, A''), se detecta una bajada de los niveles de Hh dentro del clon. En fondo *shf²* (B, B''), los niveles de Hh tanto dentro como fuera del clon son similares. (A'' y B'') Secciones ópticas ortogonales al plano del disco en las que se aprecia la bajada de niveles de Hh en el clon *ttv⁰⁰⁶⁸¹* (A''), pero no en el clon *ttv⁰⁰⁶⁸¹* en fondo *shf²* (B''). Las flechas blancas indican el borde A/P; las líneas azules indican el eje de corte.

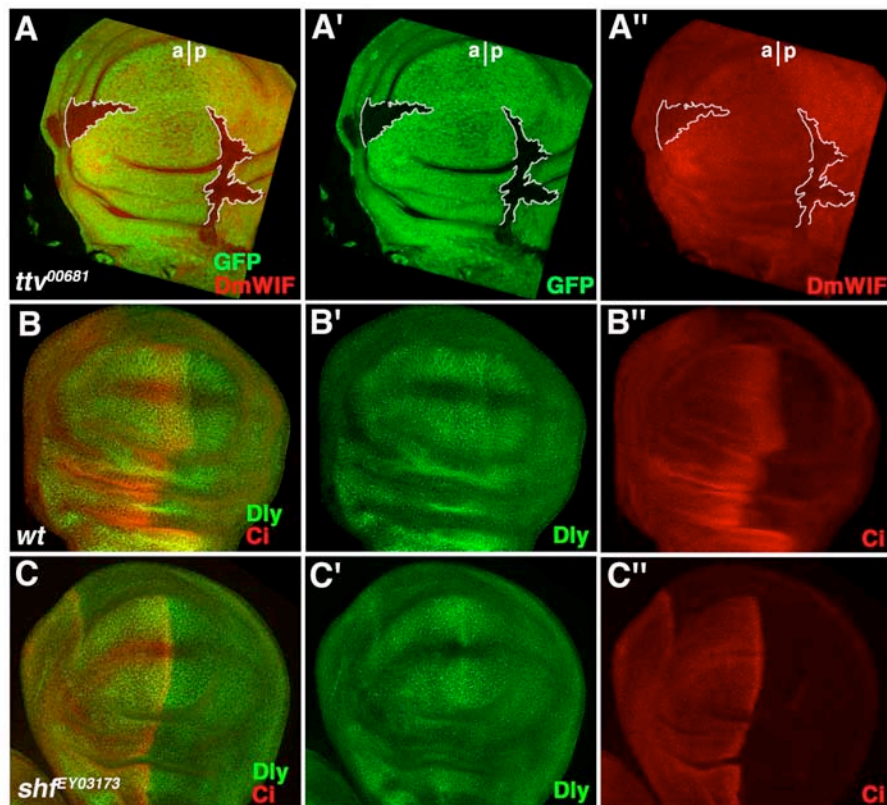


Figura 39: Los HSPGs modulan los niveles de DmWIF.

(A-A'') Clones *ttv⁰⁰⁶⁸¹* en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-DmWIF (rojo); la ausencia de GFP (verde) marca el clon. Se observa una disminución de la señal de DmWIF dentro del clon, tanto en clones en el compartimento anterior como en el compartimento posterior del disco (A, A''). La reducción de los niveles de DmWIF en clones *ttv*, se debe a un efecto directo de los glipicanos sobre la estabilidad de DmWIF (ver explicación en el texto).

(B-C'') Tinción con anticuerpo anti-Dly (verde) y anti-Ci (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos silvestres (B-B'') y *shf^{EY03173}* (C-C''). No se aprecia ninguna diferencia en los niveles de Dly, entre los discos silvestres y los discos mutantes para *shf*.

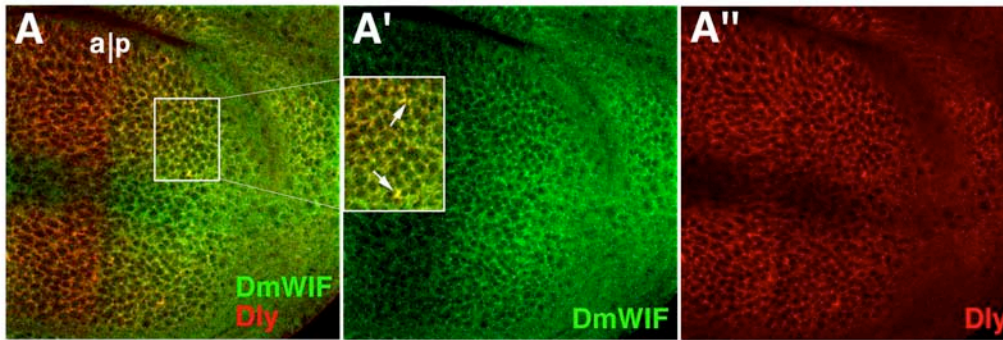


Figura 40: DmWIF colocaliza con los HSPGs.

(A-A'') Tinción con anticuerpo anti-DmWIF (verde) y anti-Dly (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos silvestres. Nótese la colocalización de ambas proteínas en estructuras puntuadas (ampliación y flechas).

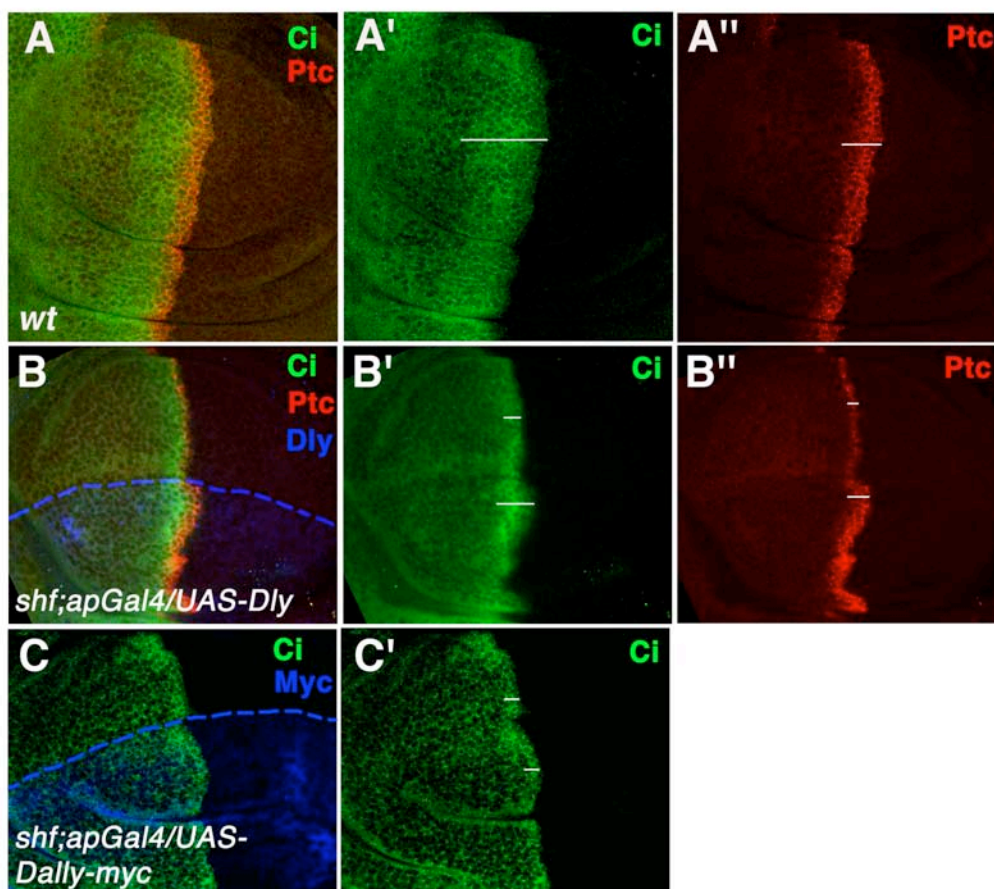


Figura 41: La sobreexpresión de Dly, pero no de Dally, rescata parcialmente la señalización de Hh en discos mutantes *shf*.

(A-A'') Disco imaginal de ala de larva 3, de individuo silvestre, teñido con anti-Ci (verde) (A, A') y anti-Ptc (rojo) (A, A''). Las líneas blancas muestran el rango de expresión de cada proteína.

(B-B'') Tinción con anticuerpo anti-Ci (verde), anti-Ptc (rojo) y anti-Dly (azul) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos *shf^{EY03173}* y que sobreexpresan Dly en el compartimento dorsal. La línea azul discontinua marca el límite del dominio de expresión de Dly. Tanto el rango de expresión de Ci (B') como el de Ptc (B'') se rescata parcialmente en las células que sobreexpresan Dly -líneas blancas en (B') y (B'')-.

(C-C') Tinción con anticuerpo anti-Ci (verde), y anti-Myc (azul) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos *shf^{EY03173}* y que sobreexpresan Dally-myc en el compartimento dorsal. La línea azul discontinua marca el límite del dominio de expresión de Dally. En este caso, no se rescata el rango de expresión de Ci -líneas blancas en (C')-. No se realizó la tinción con anti-Ptc por incompatibilidad de este anticuerpo con anti-Myc.

Figura 42: Perlecan es un proteoglicano de la membrana basal.

(A-D) Tinción con anticuerpos anti-Pln (verde), anti-Ci (rojo) y anti-Ubx (azul) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos silvestres. Cada panel es un plano diferente del mismo disco. (A) Plano más apical, en el que destaca el marcaje con anti-Ubx (azul) de las células de la membrana peripodial. (B) Plano medio, en el que destaca el marcaje con anti-Ci (rojo) de las células del disco propio. (C) Plano basal, en el que aparece el marcaje con anti-Pln (verde). (D) Canal de anti-Pln del panel C, para mostrar con más claridad la distribución de la proteína en el disco.

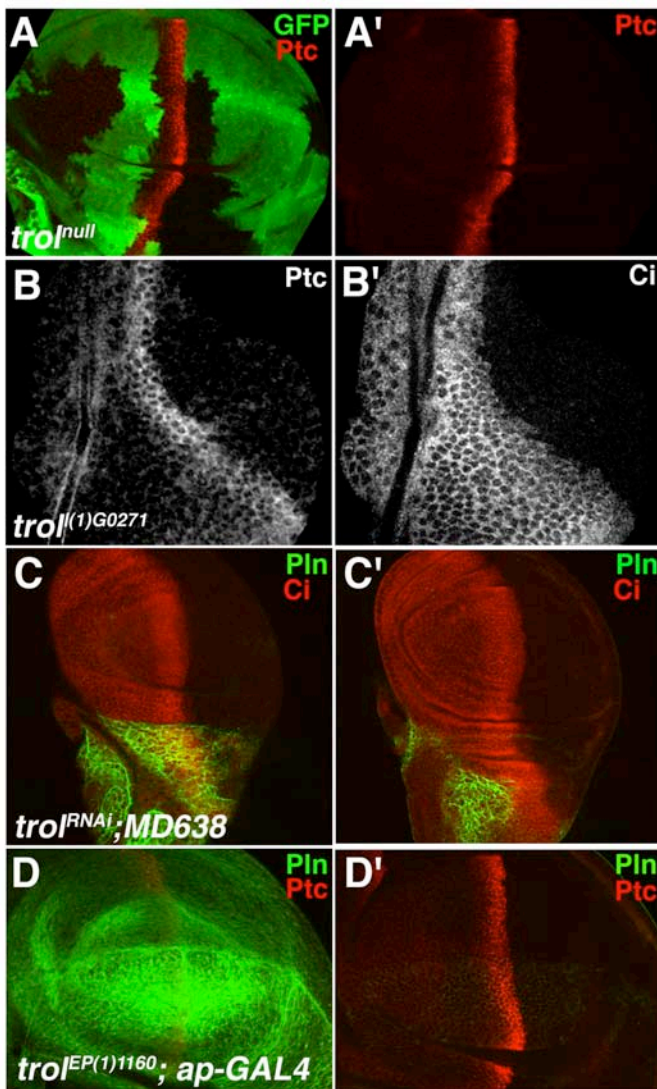
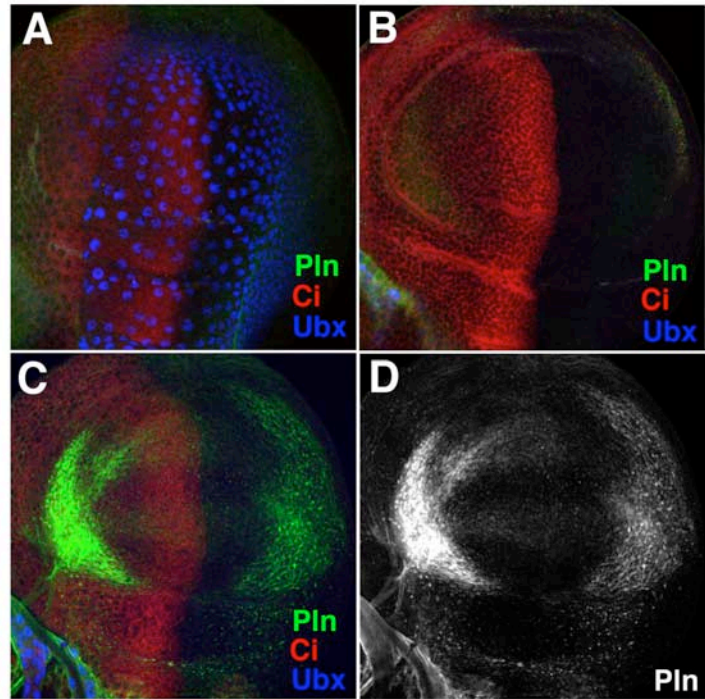


Figura 43: Perlecan no se requiere para la señalización de Hh en el disco imaginal de ala.

(A-A') Clones *trol*^{null} en discos imaginales de ala de larva 3, teñidos con anti-Ptc (rojo); la ausencia de GFP (verde) marca el clon. No se aprecia alteración de esta diana en las células del clon.

(B-B') Tinción con anticuerpos anti-Ptc y anti-Ci en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos *trol*^{(1)G0271}. Este alelo presenta discos imaginales muy pequeños, pero sin que se vea afectado el rango de distribución de Ptc y Ci.

(C-C') Tinción con anticuerpos anti-Pln (verde) y anti-Ci (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos que expresan un RNAi frente a *trol* en la zona del ala ("wing pouch"). Cada panel es un plano diferente del mismo disco.

(C) Plano basal en el que se muestra la ausencia de Pln en las células que expresan el RNAi. (C') Plano medial en el que se aprecia que la expresión del RNAi no afecta al rango de distribución de Ci.

(D-D') Tinción con anticuerpos anti-Pln (verde) y anti-Ptc (rojo) en el disco imaginal de ala de larva 3, de individuos que sobreexpresan *trol* en el compartimento dorsal del disco. Cada panel es un plano diferente del mismo disco. (D) Plano basal en el que se muestra la sobreexpresión de Pln. (D') Plano medial en el que se aprecia que la sobreexpresión de Pln no afecta al rango de distribución de Ptc.

Figura 44: *shf* no afecta a la vía de Wg/Wnt.

(A-F) Tinción con anticuerpos frente a Wg (verde), frente a dianas de la vía de Wg (Cut y Dll)(verde), y frente a dianas de la vía de Hh (Ptc y Ci) (rojo), en discos de ala de individuos silvestres (A-C) e individuos mutantes para *shf* (D-F). (A, D) Wg y Ci, (B, E) Dll y Ptc, (C, F) Cut y Ci. En los discos mutantes no se aprecia alteración del patrón de expresión de Wg ni de sus dianas Dll y Cut.

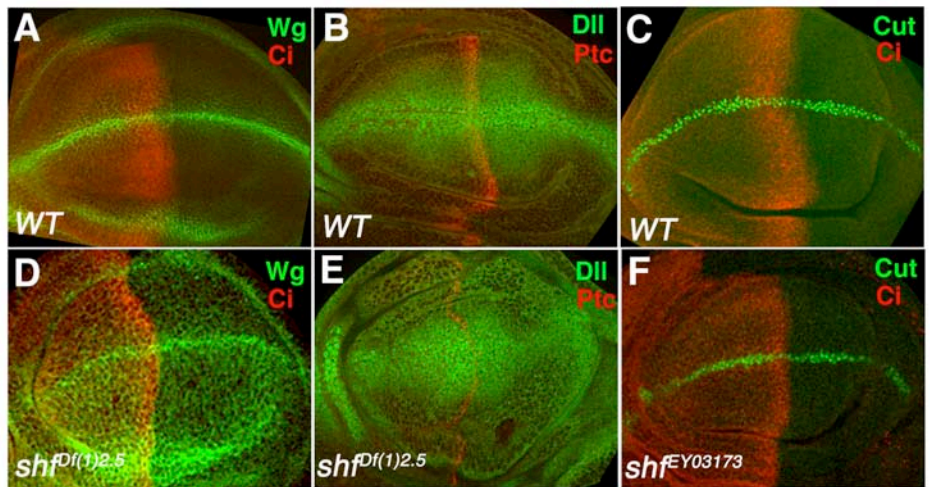


Figura 45: En *Drosophila*, WIF-1 es un antagonista de la vía de Wg.

(A) La sobreexpresión de HWIF-1 con la línea MD638-GAL4 da lugar a individuos con hendiduras en el margen del ala, fenotipo característico de una falta de función de Wg.

(B) Tinción con anticuerpo frente a Wg (verde) en un disco de ala *hh-GAL4/UAS-WIF1*. Se distingue una acumulación de Wg extracelular en el compartimento posterior (punta de flecha), así como una disminución de las vesículas de internalización. El corchete muestra el efecto no autónomo de HWIF-1 sobre la distribución de Wg. La línea discontinua indica el borde A/P de compartimento.

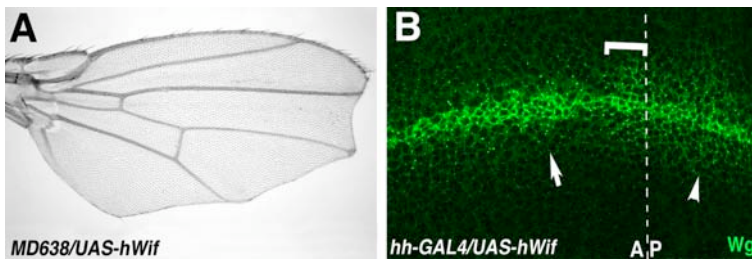
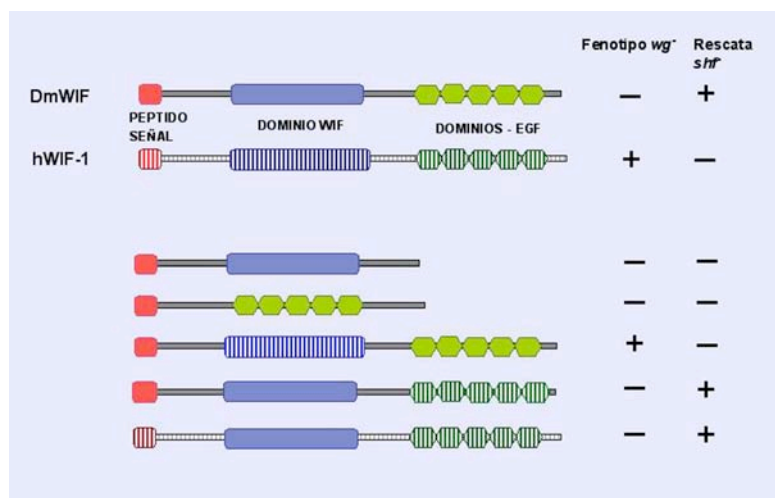


Figura 46: Análisis funcional de los dominios de DmWIF y de HWIF-1.

Esquema de las proteínas quimera generadas, intercambiando los dominios EGF y WIF entre la proteína de *Drosophila* y la humana, y fenotipos resultantes.



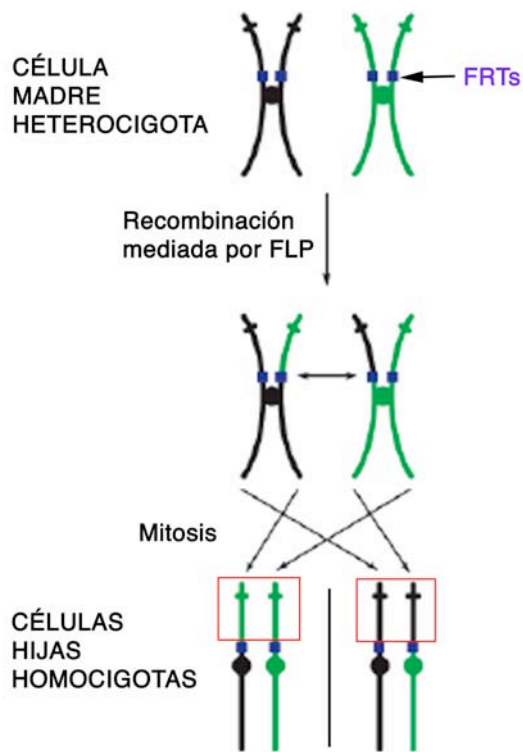


Figura 49: Esquema de la inducción de clones por recombinación mitótica, mediante el sistema FLP/FRT.

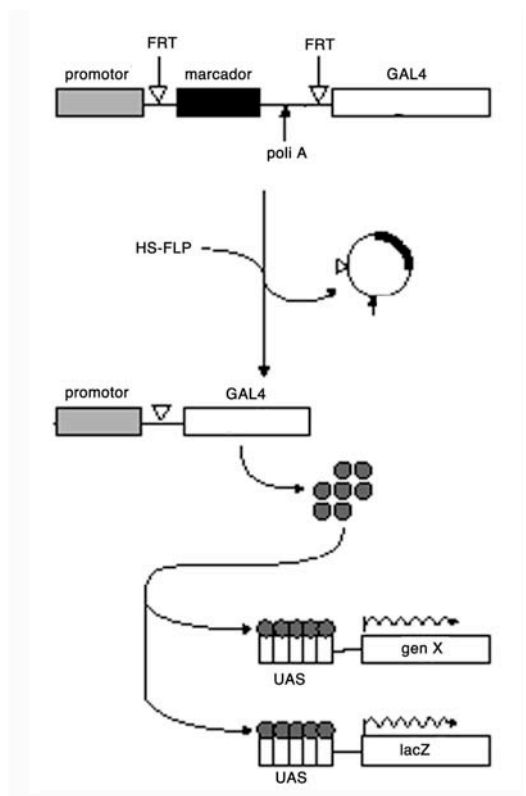


Figura 50: Esquema del sistema combinado FLP/FRT-GAL4/UAS para la inducción de clones de expresión ectópica.

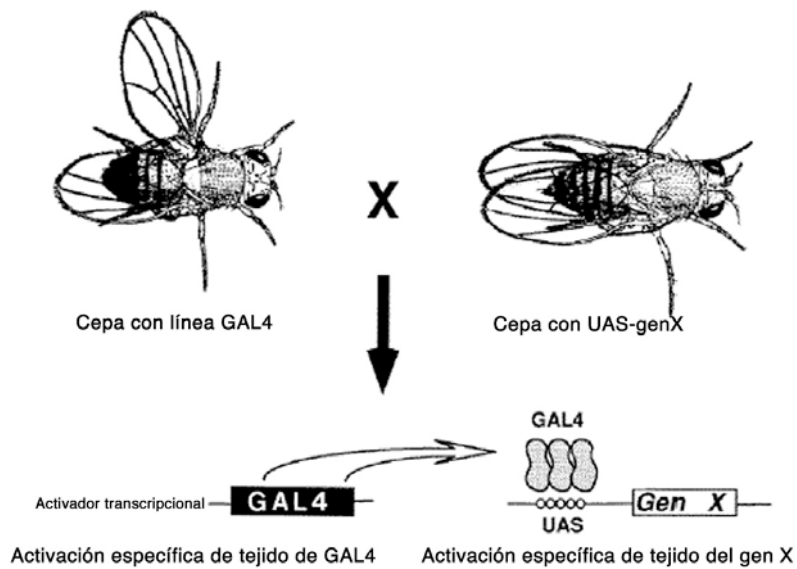


Figura 51: Esquema de la expresión ectópica de genes mediante el sistema GAL4/UAS.

Figura 52: Esquema de la generación de la quimera $DmWIF^{hWIF}$, mediante SOE-PCR.

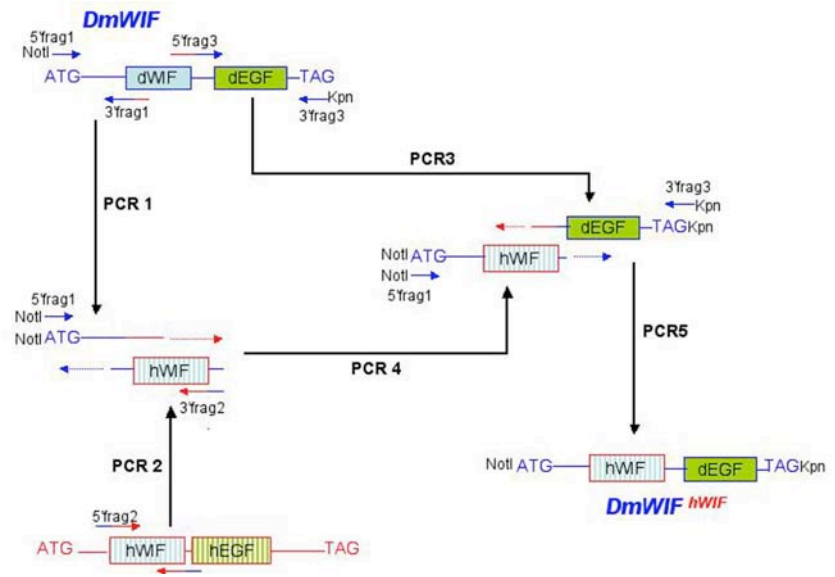


Figura 53: Esquema de la generación de la quimera $DmWIF^{hEGF}$, mediante SOE-PCR.

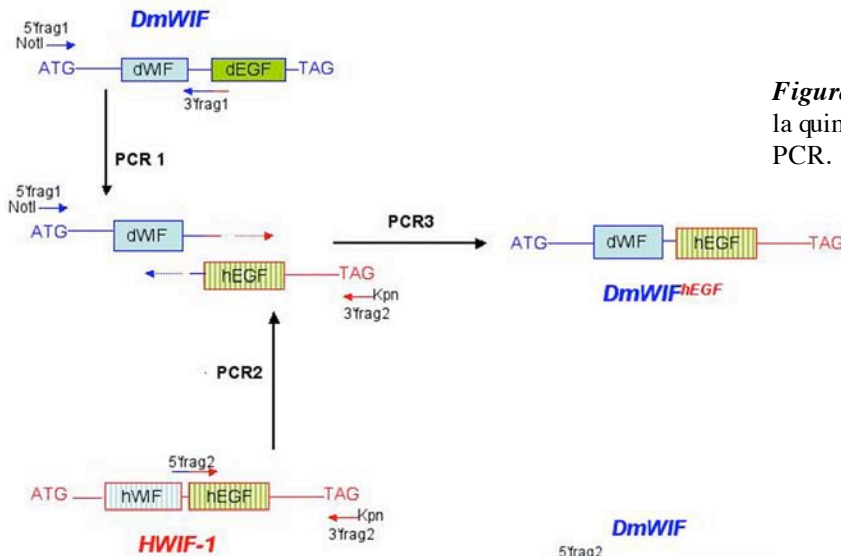


Figura 54: Esquema de la generación de la quimera $HWIF-1^{DmWIF}$, mediante SOE-PCR.

