



**La Proteína Pelado regula la polimerización de Actina durante la  
formación de tricomas en *Drosophila melanogaster***

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

Facultad de Ciencias

Por

**Claudia Macarena Molina Pelayo**

Abril, 2019

Director de Tesis Dr: Álvaro Glavic Maurer

Co-Director de Tesis Dr: Patricio Olgún

A mi amada familia...

## **Agradecimientos**

En primera instancia, quisiera agradecer a mis tutores Dr. Álvaro Glavic y Dr. Patricio Olgúin, por permitirme trabajar en sus respectivos laboratorios y aprender del modelo en que trabajan. También quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio, por su invaluable ayuda mientras me sumergí en el mundo de las moscas, en especial a Esteban Contreras, Cristian Eggers y Catalina Manieu. A Emiliano Molina le agradezco su ayuda enseñándome a trabajar con cultivos primarios de hemocitos.

Finalmente, agradezco la ayuda de Marek Mlodzik, por recibirme cordialmente en su laboratorio en Nueva York y también a Ursi y Yun por enseñarme a disectar alas pupales.

# Índice de Materias

Índice de Materias	iv
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	v
Lista de Símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura	vii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	37
Materiales	37
Métodos	46
RESULTADOS	71
DISCUSION	119
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFIA	136
ANEXOS	146

## Lista de Tablas

Tabla 1	41
Tabla 2	42
Tabla 3	43
Tabla 4	44-45
Tabla 5	58-59

## Lista de Figuras

Figura 1	6
Figura 2	7
Figura 3	12
Figura 4	14
Figura 5	16
Figura 6	17
Figura 7	18
Figura 8	25
Figura 9	32
Figura 10	34
Figura 11	53
Figura 12	73
Figura 13	74
Figura 14	77

Figura 15	80
Figura 16	82
Figura 17	86
Figura 18	87
Figura 19	89
Figura 20	92
Figura 21	93
Figura 22	97
Figura 23	99
Figura 24	101
Figura 25	103
Figura 26	107
Figura 27	108
Figura 28	110
Figura 29	112
Figura 30	113
Figura 31	115
Figura 32	116
Figura 33	118

## Lista de Símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura

Actina-F: Actina Filamentosa

Actina-G: monómero de Actina Glomerular.

APF: After Pupa Formation, término que se refiere al tiempo (generalmente en horas) que ha pasado luego de la formación de la pupa.

Arp2/3: Complejo multiproteico compuesto de 7 subunidades que induce la polimerización ramificada de Actina al ser activada por proteínas como Scar/WAVE.

ATP: Adenosín Trifosfato, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.

BC-box: dominio proteico que permite la interacción con Elonginas B y C y, como consecuencia, permite formar el complejo ubiquitin ligasa (Wang y cols., 2013).

DID: Diaphanous Inhibitory Domain.

DAD: Diaphanous Autoregulatory Domain.

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog, GTPasa pequeña perteneciente a la familia Rho, involucrada en la regulación del ciclo celular, así como en la regulación del citoesqueleto de Actina.

Cip4: Cdc42 Interacting Protein 4, miembro de la familia F-BAR, interactúa con Cdc42 y WASP. Juegan roles importantes en diversos procesos celulares al regular la dinámica de membranas y de Actina (Saengsawang, y cols., 2013).

CK-1/Gish: casein kinase 1, homólogo de Gilgamesh. Proteína que participa en la regulación de la formación del tricoma o pelo en *Drosophila melanogaster*. Se ha descrito que participa en el control espacial del tráfico vesicular polarizado (Gault y cols., 2012).

CK-666: compuesto comercial que se une a una hendidura en la interfase de Arp2 y Arp3 y de esta forma impide la actividad del complejo Arp2/3 (Hetrick y cols., 2013).

CRIB: Cdc42- and Rac- Interactive Binding, es un motivo que se une a las GTPasas de la familia Rho.

Cul2-box: dominio que permite la interacción con Cullin2 y formar el complejo ubiquitin ligasa (Wang y cols., 2013).

DAF-21: chaperona molecular, homóloga de Heat Shock Protein 90 (HSP90). Promueve la maduración, la mantención estructural y la regulación apropiada de proteínas blanco específicas involucradas en la transducción de señales. Colabora con SAX-3 para regular la guía axonal en *C. elegans* (Wang y cols., 2013).

EBAX-1: Elongin-B/C E3 Ligase in Axon Guidance, ortólogo de Pelado en *C. elegans*, descrita como una proteína que forma parte de un complejo ubiquitin ligasa, donde



Robo es su blanco para ser ubiquitinado y degradado por el proteasoma (Wang y cols., 2013).

FH1: Formin Homology 1, dominio de homología a formina, descrito como un dominio de interacción a Profilina.

FH2: Formin Homology 2, dominio de homología a formina, requerido para la autoasociación de proteínas forminas mediante este dominio. Posee la actividad nucleadora de Actina (Takeya y Sumimoto, 2003; Shimada y cols., 2004).

Ft/Ds/Fj: Fat/Dachsous/Four-jointed, vía necesaria para la correcta orientación de las células.

GBD: GTPase protein Binding Domain. Motivo pequeño presente en proteínas que se unen a GTPasas pequeñas como Cdc42 y Rac.

GTPasa: Guanosina Trifosfatasa, superfamilia de enzimas de tipo hidrolasa, que se unen e hidrolizan la molécula de Guanosín Trifosfato (GTP).

MARCM: Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker, técnica que se utiliza para generar mosaicos celulares donde sólo algunas células son mutantes homocigotas para determinado gen (Wu y Luo, 2006). Esta técnica se utiliza principalmente cuando el animal mutante homocigoto es inviable.

MG132: compuesto que inhibe la actividad del proteasoma, bloqueándolo.

Mwh: Multiple wing hair.

Myr: Miristoilación, modificación lipídica donde se añade un grupo miristoilo (derivado de un ácido graso) unido a un residuo de glicina. Esto permite unir a la proteína miristoilada a la membrana plasmática.

NPF: Nucleation Promoting Factor, proteínas que reclutan y se unen al complejo Arp2/3 e inducen un cambio conformacional en dicho complejo, lo que permite iniciar la polimerización de un nuevo filamento de Actina, con un ángulo de 70° respecto del filamento pre-existente. Así, se forman las estructuras de Actina ramificada.

Ovo/Svb: Ovo/Shavenbaby, es un factor de transcripción que regula los cambios en la forma celular epidermal. Svb es requerido para la formación de las extensiones apicales. Esto ocurre porque Svb gatilla la redistribución de los filamentos de Actina e inicia el remodelamiento del citoesqueleto (Delon y cols., 2003).

PCP: Planar Cell Polarity.

PIP2: Phosphatidylinositol biphosphate, es un componente de membrana celular. Está enriquecido en la membrana plasmática donde es sustrato de diversas proteínas de señalización. Regula la organización, polimerización y ramificación de los filamentos de Actina, mediante la interacción directa con proteínas reguladoras del citoesqueleto de Actina.

PIP3: Phosphatidylinositol (3, 4, 5) - triphosphate, fosfolípido que se encuentra en la membrana plasmática. Activa a componentes de señalización, como a la proteína kinasa Akt.

PRD: Proline-rich sequence Recognition Domain, dominio presente en diversas proteínas del grupo NPF I (Campellone y Welch, 2010). Es uno de los dominios de activación de dichas proteínas.

Rab11: proteína que pertenece a la superfamilia de GTPasas pequeñas Rab. Está asociado con vías secretorias y puede estar involucrada en el transporte de proteínas.

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate1, corresponde a una GTPasa pequeña, miembro de la familia Rho. Regula diversos eventos celulares como la reorganización del citoesqueleto.

Rho: familia de GTPasas pequeñas de señalización, subfamilia de la familia Ras. Los miembros de la familia de GTPasas Rho se han descrito como reguladores de la dinámica del citoesqueleto de Actina. Miembros de esta familia son Cdc42, Rac1 y RhoA.

RhoA: Ras homolog gene family member A, es una GTPasa pequeña de la familia Rho. Asociada con la regulación del citoesqueleto, principalmente las fibras de estrés de compuestas por filamentos de Actina.

Rock: Rho-associated protein kinase (ROCK), es una proteína kinasa que pertenece a la familia de serina-treonina kinasas. Involucrada en la regulación de la forma y movimiento celular actuando principalmente en el citoesqueleto de Actina. Es un efector río abajo de la familia de GTPasas Rho.

RNAi: RNA interferente, herramienta que se utiliza para disminuir los niveles de expresión de un gen en particular.

SAX-3: proteína homólogo del receptor Robo en *C. elegans*. Participa en la señal repelente de guía axonal (Wang y cols., 2013).

Scar/WAVE: Proteína reguladora del citoesqueleto de Actina. Recluta y activa al complejo Arp2/3, para inducir la polimerización ramificada de Actina. Activado por la unión de Rac al complejo WRC, o bien a fosfolípidos que se encuentran en la membrana plasmática.

SH3: Src Homology 3, dominio que se encuentra principalmente en proteínas que interactúan con otras proteínas, formando complejos protéicos y también está presente en proteínas que regulan el citoesqueleto.

SHD: Scar Homology Domain, es un elemento regulatorio que se encuentra en WAVE y une a múltiples componentes del complejo WAVE.

SWIM: denominado así en relación al factor transcripcional bacteriano SWI2/SNF2 y la transposasa MuDR. Está presente en un número relativamente pequeño de proteínas.

Es un dominio versátil que puede interactuar con el DNA o con otras proteínas (Makarova y cols., 2002).

WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, familia de proteínas que incluye a N-WASP, y a SCAR/WAVE, entre otras. La proteína WASP en su estado inactivo se encuentra en una conformación autoinhibida. Su activación depende de la unión a Cdc42 o PIP2, de esta forma se expone el dominio WCA.

WCA: Motivo que consiste de secuencias conservadas, presente en todos los NPFs, media las interacciones con Profilina, Actina y el complejo Arp2/3. La secuencia central ácida (CA) se une al complejo Arp2/3 y promueve un cambio conformacional requerido para la actividad nucleadora. Mientras que la secuencia WH2 (W) se une a los monómeros de Actina y promueve la formación de filamentos, entregando los monómeros al complejo Arp2/3 adyacente (Bieling y cols., 2018).

Wg: Wingless, proteína que se une a un ligando de la familia de receptores Frizzled, de 7 pasos transmembrana.

WH1: Dominio presente en las proteínas WASP, involucradas en la polimerización de Actina.

WH2: Wiskott-Aldrich syndrome Homology región 2, es un dominio de interacción a monómeros de Actina (Paunola y cols., 2002).

Wnt: grupo de proteínas que funcionan como moléculas de señalización. Su nombre hace referencia a una contracción de las proteínas Wingless e Integrated, las primeras identificadas de este grupo.

WRC: Wave Regulatory Complex, complejo multiproteico regulador de Scar/Wave. Está compuesto por 5 subunidades que mantienen en un estado inactivo a Scar/WAVE.

## RESUMEN

El citoesqueleto es un componente esencial en todas las células. En particular, el citoesqueleto de Actina cumple múltiples funciones, desde el desarrollo de un organismo, la migración celular, hasta la formación de distintas estructuras celulares, tales como pelos cuticulares o tricomas, que corresponden a una extensión de la membrana plasmática. En *Drosophila melanogaster*, las células epiteliales forman un único pelo o tricoma en la zona apico-distal de estas. Durante el desarrollo, esta estructura se forma por la acumulación polarizada de Actina y su subsecuente polimerización lineal, la que es finamente regulada. Sin embargo, aún no se tiene claro cuáles son los mecanismos moleculares que promueven la acumulación y polimerización de Actina para la formación de pelos en las células epiteliales de insectos como *Drosophila melanogaster*.

En nuestro laboratorio se encontró una mutación en un gen no caracterizado en *Drosophila melanogaster*. Dicha mutación en homocigosis genera la letalidad del animal en el periodo embrionario. Para analizar el fenotipo celular asociado a la mutación de dicho gen, utilizamos mosaicos celulares. Se observó que en células epiteliales mutantes para *pelado*, la formación de pelos es inhibida. Junto con esto, en células del sistema inmune de *Drosophila*, la pérdida de función de Pelado genera una alteración en la forma

celular, las que aparentemente no se adhieren bien a la superficie de contacto. Sin embargo, al inducir la ganancia de función en estas mismas células se observa la formación de filopodios. Estos datos en conjunto sugieren que Pelado promueve la polimerización lineal de Actina durante la formación del pelo.

El fenotipo en la formación de pelos o tricomas generado por la pérdida de función de Pelado es revertido con la ganancia de función de Diaphanous, que corresponde a una formina, que nuclea y polimeriza la Actina de manera lineal. Este fenotipo también es revertido por la pérdida de función de Scar/WAVE, proteína que induce la polimerización ramificada de Actina. En el caso de los hemocitos, la pérdida de función de Diaphanous revierte la formación de filopodios inducida por Pelado. Esto indica que la función de Pelado podría estar mediada por la regulación de la formina Diaphanous.

Se generó una mutante que carece del extremo C-terminal de Pelado con la intención de determinar si era suficiente para cumplir la función de la proteína completa. Al analizar el fenotipo de ganancia de función de esta mutante sobre los hemocitos, se observó que de todas maneras se induce la formación de filopodios. Sin embargo, esta mutante no es capaz de revertir el fenotipo de pérdida de función de Pelado en la formación del pelo. Indicando que el extremo N-terminal de Pelado cumple la función de inducir la polimerización lineal de Actina, pero no así en la formación del pelo.



Finalmente, el análisis de la distribución celular de ambas versiones de Pelado, muestra que la versión silvestre se localiza más periféricamente que la que carece del extremo C-terminal, sugiriendo que esta región es necesaria para su localización subcelular durante el proceso de formación del pelo.

## ABSTRACT

Cytoskeleton is an essential component in every cell. In particular, Actin cytoskeleton fulfill several functions, from development of an organism, cell migration, to different cell structures formation, such cellular as hairs or trichomes.

In *Drosophila melanogaster*, a single hair grows at the distal side of the apical cortex of every epithelial cell. During development, this structure is formed by the polarized accumulation of Actin and its subsequent linear polymerization, which is tightly regulated. However, it is still not clear what are the molecular mechanisms that promote the accumulation and polymerization of Actin for the hair formation in insects as *Drosophila melanogaster*.

In our lab, we found a mutation in an undescribed gene of *Drosophila*, which in homozygosity causes embryonic lethality. To analyze the cellular phenotype associated with this mutation, we use cell mosaics. We observed that in mutant epithelial cells, hair formation is inhibited. Moreover, loss of function of Pelado in immune cells generates cell shape defect and its gain of function promotes filopodia formation. All this data together, indicates that Pelado promotes linear actin polymerization during hair formation.

The hair formation phenotype generated by Pelado loss of function, is reversed by Diaphanous gain of function, which is a type of formin, that nucleates and polymerize Actin in a linearly. This phenotype is also reversed by the Scar/WAVE loss of function, a protein that induces the branched actin polymerization. In hemocyte cells case, the Diaphanous loss of function reversed the filopodia formation induced by Pelado gain of function. This indicates that Pelado function in Actin polymerization could be mediated by Diaphanous.

In order to start unveiling the role of the different domains of Pelado, we generated a new mutant, that lacks the C-terminal portion of Pelado. This mutant was generated to determine whether this region is enough to fulfill the entire protein function. This new mutant also induces the filopodia formation in hemocytes. However, this mutant is not able to revert the hair formation phenotype induced by Pelado loss of function, indicating that the amino portion of Pelado is sufficient to induce linear Actin polymerization, but not to induce hair formation.

Finally, analyses of cellular distribution of Pelado forms shows that wild type version has a more peripheral location than the mutant, suggesting that the C-terminal region is required for its localization.

# INTRODUCCION

## Citoesqueleto

El citoesqueleto es un componente esencial en todas las células, tanto eucariontes como procariontes. La principal función del citoesqueleto es proveer estabilidad estructural para la célula. Entre otras funciones también se pueden mencionar: contribuir al movimiento celular, mantención de las membranas plasmática y nuclear, y la organización del contenido de las células. Está compuesto por distintos filamentos proteicos que se caracterizan principalmente por su diámetro, las subunidades que lo conforman y su disposición (Lodish y col., 2005; Fletcher y Mullins, 2010).

En las células eucariontes, los componentes más conocidos del citoesqueleto son los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de Actina; sin embargo, existe un componente que se ha descrito recientemente, las septinas. Todos estos componentes del citoesqueleto conforman un polímero de subunidades proteicas (Beise and Trimble, 2011).

Debido a su relevancia funcional, las proteínas que constituyen el citoesqueleto han sido altamente conservadas durante la evolución; dicha conservación se observa tanto en la secuencia como en la estructura, y se explica por las múltiples funciones críticas que dependen del citoesqueleto. Sin embargo, sólo se han encontrado homólogos de Actina y tubulina en bacterias, lo que podría indicar que los filamentos intermedios y las septinas aparecieron más tarde en la evolución del sistema citoesquelético (Lodish y col., 2005).

La regulación de los distintos componentes del citoesqueleto aquí descritos permite la formación de las distintas estructuras celulares, así como también la mantención de la forma celular, y la migración, entre muchos otros procesos, que dependen finalmente de la diferenciación o especialización que posea cada célula. A continuación, se describirá la formación y regulación de los filamentos de Actina, ya que será el foco de estudio en la presente tesis.

### Filamentos de Actina

La Actina es la proteína más abundante de las células eucariontes, lo que se explica porque forma estructuras que cubren grandes espacios. La Actina existe como monómeros globulares (Actina-G) y como polímeros filamentosos (Actina-F), que corresponden a una cadena lineal de subunidades de Actina-G, cuya formación depende de la unión de Actina-G a ATP. La formación de dichos filamentos requiere de dos etapas,

la nucleación y la elongación, siendo la nucleación la etapa limitante del proceso, debido a que requiere de un centro nucleador compuesto por tres monómeros de Actina (Zobel y Bogdan, 2013). Los filamentos de Actina también se denominan microfilamentos, y corresponde al componente más dinámico del citoesqueleto. Además, de su organización depende la forma distintiva de una célula (Campellone y Welch, 2010; Lodish y cols., 2005).

Los filamentos de Actina se forman con dos hebras enrolladas entre sí, generando una estructura de unos 7 nm de diámetro. Todas las subunidades de un filamento de Actina apuntan hacia el mismo extremo del filamento, lo que indica que el filamento presenta polaridad, al igual que lo microtúbulos (Huxley, 1963; Woodrum y cols., 1975; Lodish y cols., 2005). Por convención, se denomina extremo (+) al extremo del filamento donde se adicionan los monómeros de Actina, y extremo (-) al extremo por donde se remueven los monómeros de Actina (Begg y cols., 1978). El citoesqueleto de Actina está organizado en varias estructuras de gran tamaño, que se extienden a lo largo de la célula y, debido a su tamaño, este componente del citoesqueleto puede cambiar con facilidad la morfología celular mediante su ensamblaje y desensamblaje constante, fenómeno conocido como *treadmilling*. Además, el largo de los filamentos puede variar enormemente y también se pueden entrecruzar para formar redes y haces, cuya estructura no se mantiene rígida. Esta flexibilidad les permite a las células adoptar muchas formas y transformarlas con facilidad. Esto es importante especialmente en las

células móviles donde el citoesqueleto debe desensamblarse con rapidez (Lodish y cols., 2005; Carlier y Shekhar, 2017; Clainche y Carlier, 2008).

Algo muy importante a considerar respecto de la polimerización de los filamentos de Actina es que está regulado por diversas proteínas que se unen a Actina-G. Hasta la fecha se han descrito más de 150 proteínas que contienen dominios de unión a Actina (Fletcher y Mullins, 2010); entre estas algunas pueden promover o inhibir su polimerización. Por ejemplo, la proteína Timosina es considerada la principal proteína secuestradora de Actina-G en la célula y bloquea el sitio de unión a ATP de la Actina-G y de esta forma inhibe su polimerización (Lodish y col., 2005). Mientras que la proteína Profilina también une monómeros de Actina, pero su principal función es promover el ensamble de filamentos de Actina en la célula (Kovar y cols., 2003). También hay otras proteínas que se unen a Actina-F y de esta forma controlan el largo de los filamentos. Por ejemplo, algunas de ellas cortan dichos filamentos y así se generan nuevos extremos disponibles para la polimerización; ejemplos de este grupo de proteínas son Gelsolina y Cofilina (Chou y cols., 2001; McGough y cols., 1997). Otro grupo de proteínas se unen a los extremos de los filamentos de Actina, pero sin cortarlos y de esta forma se impide la unión de nuevos monómeros en ese filamento, un ejemplo es Tropomodulina (Campellone y Welch, 2010; Lodish y col., 2005; Zobel y Bogdan, 2013; Carlier y Shekhar, 2017).

Ahora bien, entre las proteínas que regulan la polimerización de Actina y por ende su dinámica, son muy importantes aquellas proteínas o factores que son capaces de inducir la nucleación de los filamentos de Actina, que permitirá la posterior elongación de dichos filamentos. Su importancia radica en que este evento constituye la etapa limitante del proceso, debido a la inestabilidad de los dímeros y trímeros de Actina (Campellone y Welch, 2010; Jockusch, 2004).

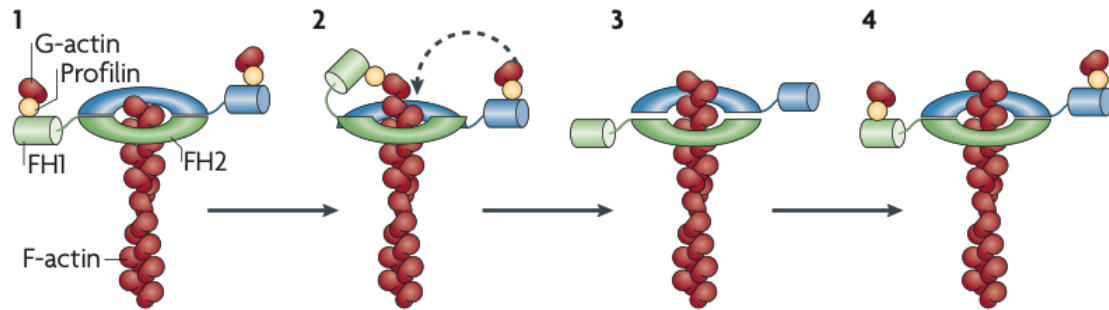
### Nucleación de Filamentos de Actina

El citoesqueleto de Actina tiene la particularidad de polimerizar tanto de manera lineal como ramificada, dependiendo de la actividad de las proteínas que conducirán cada uno de estos tipos de polimerización (Lodish y col., 2005; Suarez y Kovar, 2016; Campellone y Welch, 2010). A continuación, veremos cada uno de estas formas de polimerización:

- Polimerización lineal de Actina: este tipo de polimerización requiere de la participación de proteínas Forminas, que presentan el dominio FH2 (Campellone y Welch, 2010; Bogdan y cols., 2013). Dímeros del dominio FH2 nuclean la polimerización y se mantienen unidos al extremo creciente del filamento (Romero y cols., 2004). La presencia de Profilina acelera el proceso de elongación del filamento generado por las Forminas (Shimada y cols., 2004). Este proceso también está regulado por GTPasas de la familia Rho, que activan a las Forminas



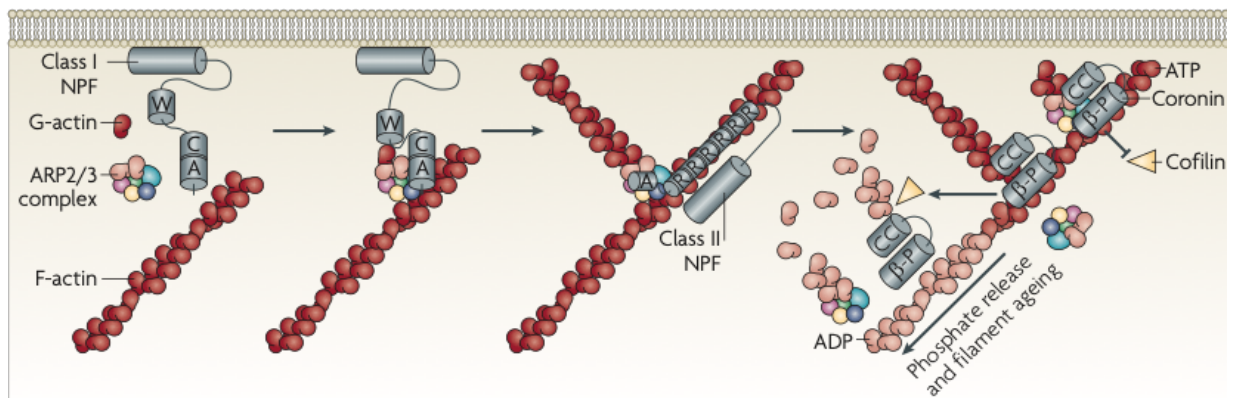
liberando el estado de autoinhibición que presentan (Campellone y Welch, 2010; Jockusch, 2004; Clainche y Carlier, 2008).



**Figura 1:** Mecanismo de polimerización lineal de filamentos de Actina. En esta imagen se observa cómo se produce la nucleación y elongación de los filamentos de Actina mediante la actividad de las forminas. Dicha actividad depende de los dominios FH1 y FH2 de las forminas. Al respecto, los dominios FH2 forman dímeros hasta formar una estructura que se asemeja a una dona y estas corresponden a las subunidades catalíticas de las forminas, mientras el dominio FH1 se une a Profilina, que a su vez une monómeros de Actina y de esta forma acelera el proceso de elongación del filamento. Modificado de Campellone y Welch, 2010.

- Polimerización ramificada de Actina: requiere de la participación del complejo Arp2/3. Este pertenece a la familia de Proteínas Relacionadas a Actina (Actin-related proteins, Arp), las que presentan alrededor de un 50% de similitud en la secuencia con Actina (Frankel y Mooseker, 1996). El complejo Arp2/3 se une a un filamento de Actina para nuclear un nuevo filamento, que crecerá formando un ángulo de 70° respecto del filamento original (Mullins y cols., 1998). La combinación de ambos filamentos genera una red ramificada donde el complejo

Arp2/3 se ubica en los puntos o vértices de ramificación (Campellone y Welch, 2010). Esta ramificación es a su vez estimulada por la familia de proteínas WASp, que está regulada por distintas GTPasas de la familia Rho. Esta red es estabilizada además por proteínas como filamina (Campellone y Welch, 2010; Jockusch, 2004; Lodish y col., 2005; Clainche y Carlier, 2008).



**Figura 2:** Mecanismo de polimerización ramificada de filamentos de Actina. Esta imagen ilustra la secuencia en que ocurre la nucleación ejercida por el complejo Arp2/3. Para ello se requiere de la presencia de un filamento de Actina preexistente al cual se va a unir el complejo Arp2/3 junto con algún factor NPF I, y los monómeros de Actina y así se genera la nucleación de un nuevo filamento de Actina (ramificado) que está a 70° del preexistente, generando así una red de filamentos de Actina. Modificado de Campellone y Welch, 2010.

Ahora bien, como se ha mencionado, cada tipo de nucleación de Actina requiere de la participación de proteínas específicas, las que a su vez también son reguladas por otras proteínas. A continuación, se detalla el funcionamiento de las principales proteínas nucleadoras de los filamentos de Actina.

Forminas: proteínas nucleadoras de Actina que inducen la polimerización lineal (no ramificada) de Actina. Su principal característica es que poseen los dominios de Homología a Formina FH1 y FH2 (Campellone y Welch, 2010; Bogdan y cols., 2013). Existen siete diferentes subclases: Diaphanous (Dia), Proteínas relacionadas a forminas en leucocitos (FRLs), Activadores de morfogénesis asociados a Dishevelled (DAAMs), Proteínas con dominios de homología a formina (FHOD), forminas (FMNs), Delfilina, y forminas invertidas (INFs) (Campellone y Welch, 2010; Higgs y Peterson, 2005). Los dominios FH2 son suficientes para gatillar la nucleación de Actina y se mantienen unidos al extremo creciente del filamento y allí compiten con otros factores para determinar el largo del filamento (Romero y cols., 2004). Dichos dominios FH2 funcionan como homodímeros (Figura 1) implicando que dicha nucleación involucra la estabilización de los dímeros de Actina (Harris y cols., 2004). Además, como se mencionó previamente, la unión a Profilina mediante el dominio FH1 acelera la elongación del filamento, debido a un incremento en la concentración de monómeros de Actina en dicho lugar. La formina mejor caracterizada es Diaphanous, y esta tiene una organización modular que puede ser dividida en tres regiones funcionales: la región N-terminal que incluye el dominio GBD y el Dominio inhibitorio de Diaphanous (DID) que participa en la autoinhibición, mientras que en el extremo C-terminal contiene los módulos FH1 y FH2 más el Dominio autorregulatorio de Diaphanous (DAD) que une los dominios GBD-DID inhibiendo la actividad polimerizadora del dominio FH2. Dicha interacción inhibitoria es liberada por

la unión de la GTPasa RhoA (Bogdan y cols., 2013; Campellone y Welch, 2010; Kovar, 2006; Clainche y Carlier, 2008; Faix y Grosse, 2006; Carlier y cols., 2013).

Complejo Arp2/3: Este complejo está constituido por siete polipéptidos asociados, que incluyen Arp2, Arp3 y otras cinco subunidades: Arpc1 a Arpc5. De la misma forma que la Actina, Arp2 y Arp3 también se unen a ATP. El complejo Arp2/3 por sí solo es un nucleador ineficiente, pero la unión a un filamento aumenta su actividad (Drenckhahn y Pollard, 1986; Mullins y cols., 1998). Dicha actividad también requiere de la fosforilación de Arp2 (LeClaire y cols., 2008). Un tercer contribuyente a la activación de Arp2/3, y el mejor caracterizado, involucra la unión a Factores Promotores de la Nucleación (Nucleation-promoting Factors, NPFs). La mayoría de estos NPFs usan el dominio WCA para activar el complejo Arp2/3, el que está compuesto por uno o más dominios WH2 (WASP homology 2) que unen monómeros de Actina (Paunola y cols., 2002; Carlier y cols., 2013), más una región conectora anfipática y un péptido ácido que colectivamente se unen a Arp2/3. El conector puede interactuar con el complejo Arp2/3 y con la Actina (Figura 2) (Machesky y cols., 1999; Campellone y Welch, 2010; Goley y Welch, 2006; Kang y cols., 2010; Rotty y cols., 2013; Clainche y Carlier, 2008).

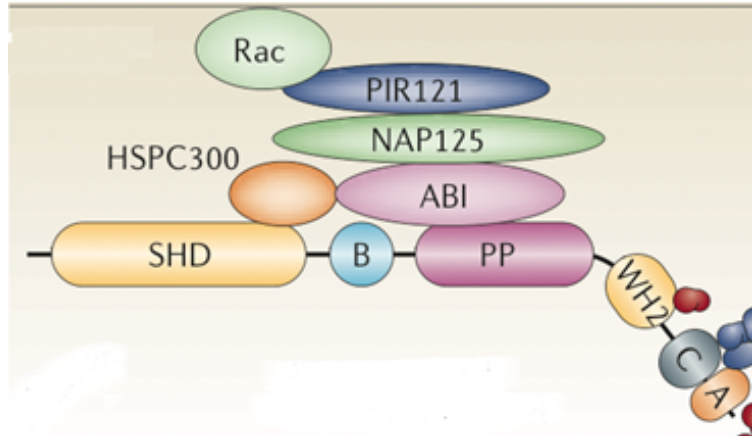
NPFs: existen dos grupos de NPFs, I y II. El grupo I es el más grande y estimula la nucleación mediada por el complejo Arp2/3. Entre los NPFs de clase I se encuentran N-WASP y Scar/WAVE. La actividad de los NPFs de clase I ocurre mediante el dominio WCA que se encuentra en el extremo carboxi-terminal, pero poseen diversos dominios en el

amino-terminal que permiten una regulación y función diferencial. En base a esto, se ha sugerido que WASP y Scar/WAVE controlan distintos procesos dependientes del complejo Arp2/3 durante el desarrollo animal. Por ejemplo, WASP es requerido específicamente para la ejecución apropiada de las divisiones asimétricas en los linajes neurales, mientras que Scar/WAVE tiene un rol importante en la regulación de la morfología del axón del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* (Zallen, 2002; Ben-Yaacov y cols., 2001), así como también es importante para la oogenesis normal en este modelo (Chen y cols., 2014). En el grupo II de NPFs se encuentra Cortactina. Las proteínas que componen este grupo, carecen del dominio WCA, pero poseen un dominio ácido (región A) en su extremo amino-terminal. Dicha región A se une al complejo Arp2/3. También presentan una región de dominios repetidos en tándem que se unen a F-Actina, que es requerido para la activación del complejo Arp2/3 (Campellone y Welch, 2010; Goley y Welch, 2006; Rotty y cols., 2012).

N-WASP: posee una organización modular que consiste de un dominio N terminal de homología a WASP (WH1), más un dominio de unión a Rac y Cdc42 (dominio CRIB), un dominio autoinhibitorio, llamado dominio de unión a GTPasa (GBD), y un dominio rico en Prolina (PRD) adyacente a su dominio WCA. Por sí solos, estas proteínas están en una conformación inactiva, y la unión de otras proteínas como la GTPasa pequeña Cdc42 cambia la conformación de N-WASP, liberando el dominio WCA, activándola, fenómeno que también puede ser producido por la unión de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>).

En respuesta a la activación, N-WASP dirige al complejo Arp2/3 para polimerizar Actina durante una multitud de funciones celulares (Campellone y Welch, 2010).

Scar/WAVE: a diferencia de WASPs, Scar/WAVE está completamente activada y no presenta autoinhibición. Sin embargo, su actividad está regulada por su inclusión en el complejo regulatorio WAVE (WRC, WAVE Regulatory Complex). Presenta el dominio de homología a Scar (SHD) en su extremo amino terminal, que se asocia con el complejo WRC compuesto por HSPC300, Abi1, Nap1, y Sra1. La remoción de cualquiera de las subunidades mencionadas altera la estabilidad y/o localización de las otras, lo que implica que el complejo se comporta como una unidad. Su activación requiere de la unión de moléculas que interactúan con parte del complejo WRC, como proteínas que contienen el dominio SH3, la unión a fosfoinositol 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>) y la GTPasa pequeña Rac. A diferencia de la versatilidad de N-WASP, la principal función de Scar/WAVE es activar al complejo Arp2/3 durante la protrusión de membrana y la movilidad celular (Campellone y Welch, 2010; Davidson e Insall, 2010; Clainche y Carlier, 2008; Davidson e Insall, 2013). Se ha descrito que en ausencia de cualquiera de los miembros del complejo WRC, Scar es degradado rápidamente por el proteasoma (Kunda y cols. 2003).



**Figura 3:** Estructura Complejo WRC. En esta imagen se ilustra las proteínas que componen el complejo WRC, entre las que se incluye Scar/WAVE. También se observa uno de los mecanismos posibles para su activación, que corresponde a la unión con la GTPasa Rac. Modificado de Goley y Welch, 2006.

### Competencia por los monómeros de Actina

Se ha descrito ampliamente que las células poseen una alta concentración de Actina monomérica, en exceso respecto de la concentración requerida para la formación de nuevos filamentos de Actina (Koestler y cols., 2009; Burke y cols., 2014; Lodish y cols., 2005; Pollitt e Insall, 2009). Sin embargo, la mayoría de dichos monómeros se encuentran unidos a proteínas, limitando así la cantidad disponible para generar nuevos filamentos y estableciendo una competencia por estos en los diferentes tipos de polimerización (Burke y cols., 2014; Heson y cols., 2014; Suarez, y cols., 2015; Suarez y Kovar, 2016).

Además, se ha descrito, en levadura, que esta competencia está inclinada hacia la polimerización ramificada de Actina, debido a que hay un mayor número de proteínas

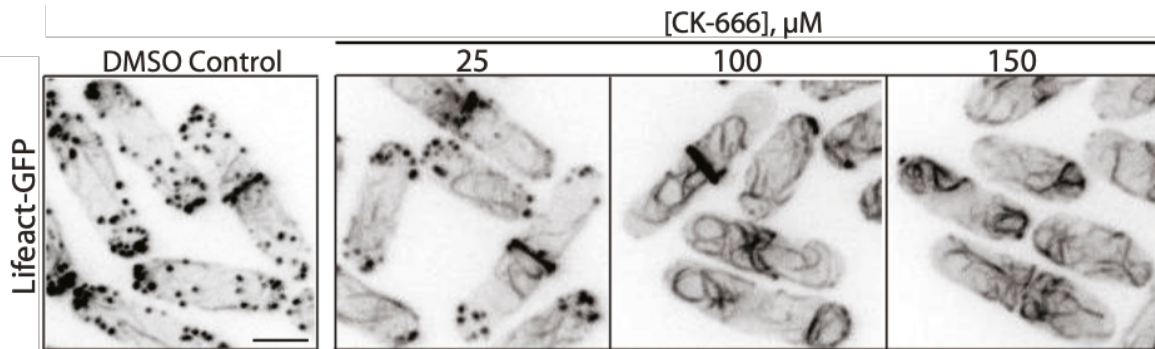
que favorecen este tipo de polimerización (Suárez y cols., 2015).

En particular, se ha descrito que evaluando la dinámica del citoesqueleto de Actina mediante el uso de Lifeact-GFP (Riedl y cols, 2008), al utilizar un inhibidor del complejo Arp2/3 como CK-666 (Hetrick y cols., 2013), se observa un aumento considerable en la formación de filamentos lineales de Actina (Figura 4), lo cual es inhibido al utilizar la droga Latrunculina A, que actúa secuestrando monómeros de Actina (Burke y cols., 2014).

La competencia por los monómeros de Actina se ha descrito para diversas proteínas que regulan la dinámica de Actina y que favorecen un tipo de polimerización en desmedro del otro. Por ejemplo, la proteína Profilina favorece la polimerización lineal de Actina, mediada por las forminas, inhibiendo al mismo tiempo la nucleación ramificada de Actina, mediada por el complejo Arp2/3, al inhibir la asociación de su activador (WCA) con los monómeros de Actina (Suarez, y cols., 2015).

Por el contrario, la proteína Cip4 (Cdc42-interacting protein 4) recluta y activa a proteínas activadoras del complejo Arp2/3 como WAVE y Wasp, induciendo así la polimerización ramificada de Actina. Respecto de Cip4, se ha confirmado recientemente que además es capaz de interactuar con la formina Diaphanous e inhibir su actividad, estimulando así la polimerización ramificada de Actina mediante dos mecanismos (Graziano y cols., 2014; Yan y cols., 2013).





**Figura 4: Competencia por monómeros de Actina.** Imagen que muestra el efecto dosis-dependiente de CK-666, droga que inhibe la actividad del complejo Arp2/3, en células de levadura. Mediante este ensayo se muestra que al reducir la actividad de dicho complejo y por ende, se reduce la polimerización ramificada de Actina, se activa o induce la polimerización lineal de Actina, lo que evidencia la competencia por los monómeros de Actina en la célula. Modificado de Burke y cols., 2014.

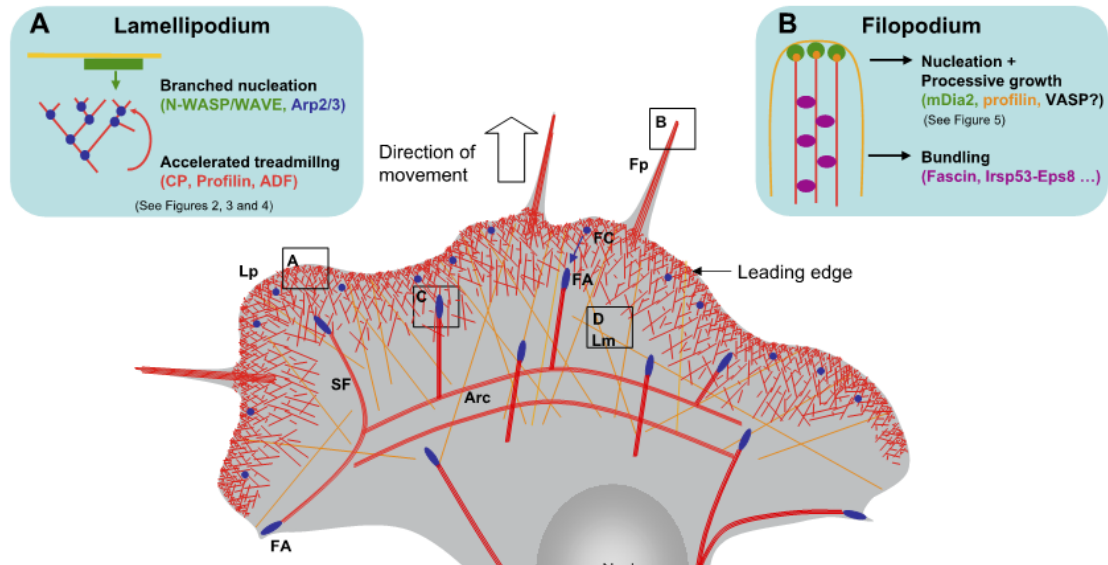
#### Estructuras celulares cuya formación dependen del citoesqueleto de Actina

Como se ha mencionado previamente, la integridad del citoesqueleto es esencial para que las células formen y mantengan su forma y estructura. Además, los distintos tipos celulares presentan características morfológicas que se traducen en una diferenciación específica a nivel de la superficie celular, la cual posee una base estructural, y se conocen como especializaciones celulares (Arendt, 2008). La diferenciación estructural subyace a diferencias en funcionalidad, lo que dependerá del tejido, órgano u organismo al que pertenezca. La formación de estas especializaciones requiere de una estructuración particular del citoesqueleto tanto de Actina como de microtúbulos (Lodish y col., 2005).

Se sabe que hay estructuras cuya formación dependen o requieren de la polimerización lineal o ramificada de Actina, dependiendo del caso. Así como también hay estructuras que requieren para su formación de ambos tipos de polimerización de Actina (Clainche y Carier, 2008). Por ejemplo, los lamelipodios son estructuras celulares que están compuestos por redes y manojos de filamentos de Actina (Zobel y Bogdan, 2013; Suarez y Kovar, 2016; Clainche y Carlier, 2008). Mientras que la formación de filopodios requiere de la polimerización lineal de Actina, mediante proteínas Forminas, y además requiere de la proteína Fascina para estabilizar dichas estructuras, entre otras funciones (Figura 5) (Zanet y cols., 2012; Suarez y Kovar, 2016; Clainche y Carlier, 2008). A su vez, cada una de estas estructuras requiere para su formación y estabilización de la participación de otras proteínas como WASP y WAVE, en el caso de la formación de lamelipodios y Profilina y Fascina, en la formación de filopodios (Campellone y Welch, 2010; Suarez y Kovar, 2016).

La polimerización de Actina mediada por Diaphanous es requerida para la formación de una notable variedad de estructuras celulares, ejemplos son fibras de estrés, filamentos dorsales que emergen desde las adhesiones focales en el frente migratorio y el anillo contráctil que se forma durante la citoquinesis, también se localiza en los filopodios, y participa en la formación de uniones de adhesión celular. Además, la polimerización de Actina gatillada por Diaphanous resulta en la translocación del coactivador transcripcional MAL hacia el núcleo, y por ende, en la activación de un programa de

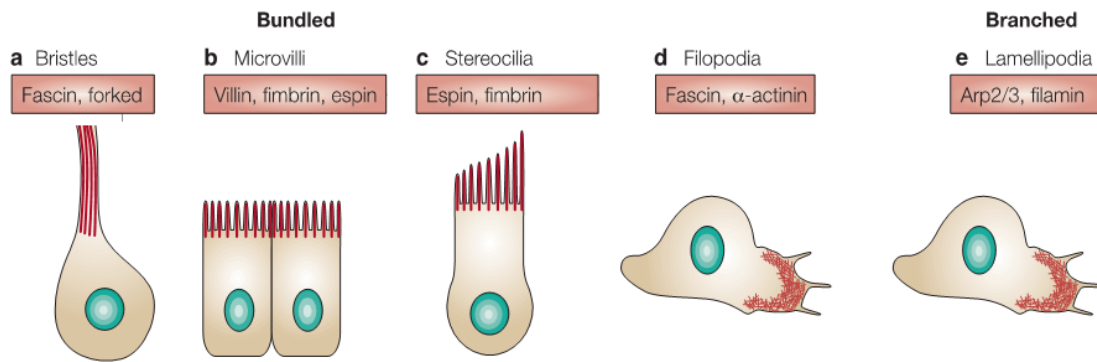
expresión génica que controla procesos del desarrollo que dependen de la migración celular, la contractilidad o la morfogénesis (Campellone y Welch, 2010; Faix y Grosse, 2006).



**Figura 5:** Principales estructuras formadas por distintos tipos de polimerización de Actina. En esta imagen se observan las principales estructuras celulares cuya formación depende del citoesqueleto de Actina, lamelipodios y filopodios. También se muestran las principales proteínas que participan en la formación y/o estabilización de dichas estructuras. Modificado de Clainche y Carlier, 2008.

Como se mencionó previamente, el citoesqueleto de Actina también es esencial para la formación de distintas estructuras que constituyen especializaciones celulares, y que otorgarán una función particular a la célula que la(s) contenga. Ejemplos de ellas son protrusiones de membrana como microvellosidades, estereocilios, pelos sensoriales, filopodios y lamelipodios (Revenu, 2004).

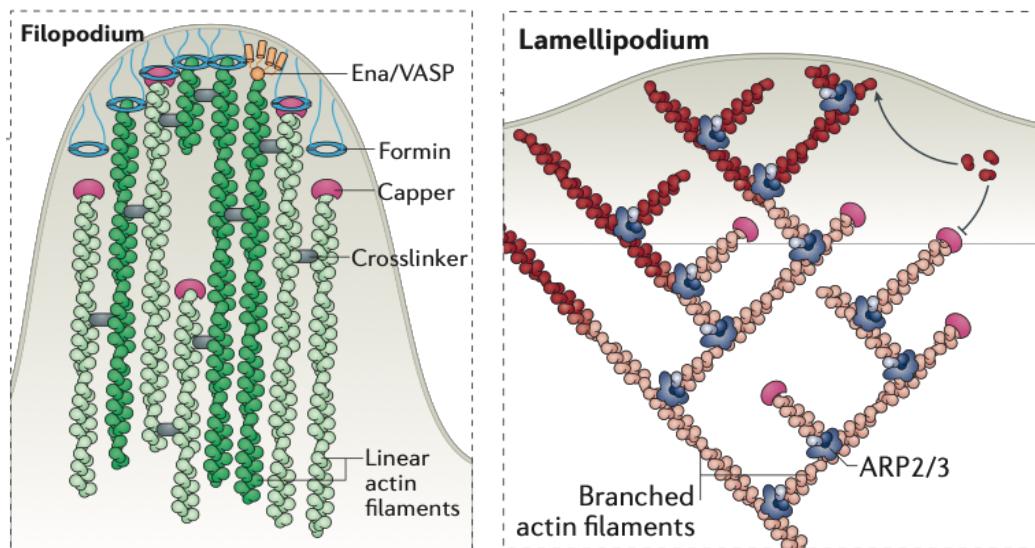
Por otro lado, también se ha descrito en particular que en el proceso de formación del axón en las células nerviosas es esencial la participación tanto de microtúbulos como de filamentos de Actina, siendo este último componente el que dirige los cambios estructurales durante el crecimiento de las neuritas y sirviendo al mismo tiempo como guía para el desarrollo del axón (Da Silva y Dotti, 2002; Koch y col., 2014; Lewis y cols., 2013; Sainath y Gallo, 2015; Tahirovic y cols., 2010; Pak y cols., 2008; Korobova y Svitkina, 2008; Bernadskaya y cols., 2012).



**Figura 6:** Estructuras formadas por la polimerización de Actina, lineal o ramificada. Se observan distintos ejemplos de estructuras, o especializaciones celulares, cuya formación depende del citoesqueleto de Actina. Modificado de Revenu y cols., 2004.

Como se ha mencionado previamente, existen distintas proteínas capaces de inducir la actividad del complejo Arp2/3 y como consecuencia de ello, la polimerización ramificada de Actina. Entre dichas proteínas, las más caracterizadas son Wasp y Scar/WAVE. Sin embargo, cada una de estas tiene distintas funciones dependiendo del tipo celular en que se encuentren.

Los componentes del complejo regulatorio de Scar/WAVE también tienen un rol en distintos procesos de desarrollo. Por ejemplo, se sabe que Abi activa a WASP para promover el desarrollo del órgano sensorial en *Drosophila melanogaster*. De esta forma, Abi funciona como un regulador central que dirige procesos del desarrollo dependientes de Wasp o Scar/WAVE (Bogdan y cols., 2005).



**Figura 7:** Formación de filopodios y lamelipodios. En esta imagen se muestra cómo están constituidos y las proteínas que participan o pueden participar en su formación y posterior estabilización. Modificado de Carlier y Shekhar, 2017.

La regulación del citoesqueleto de Actina también es esencial para distintos procesos celulares como la fagocitosis, y la quimiotaxis, específicamente en células del sistema inmune, como macrófagos (Rougerie y cols., 2013; Brüser y Bogdan, 2016). También se ha descrito la importancia del citoesqueleto de Actina (y sus proteínas reguladoras, como

Scar) en la formación de la fusión de mioblasto, en *Drosophila melanogaster* (Deng y cols., 2016; Gildor y cols., 2009).

Otro ejemplo de estructura que se forma gracias a la estricta regulación de la dinámica del citoesqueleto de Actina son los pelos cuticulares o tricomas, que se forman en las células epiteliales de *Drosophila melanogaster*, los que están constituidos principalmente por ese componente del citoesqueleto. A continuación, se detallará este proceso y la participación de las distintas proteínas que regulan el citoesqueleto de Actina en dicho contexto.

#### Formación de pelos cuticulares o tricomas en *Drosophila melanogaster*

Cada una de las células epiteliales que conforman a la mosca *Drosophila melanogaster* forman un único pelo ubicado en la zona apico-distal de esta. Su formación ocurre durante la etapa pupal, específicamente alrededor de 28 horas después de la formación de la pupa (APF, After Pupae Formation) y culmina alrededor de las 40 horas APF, a 25°C. Estos pelos están compuestos principalmente por filamentos de Actina y microtúbulos, y son una extensión de la membrana plasmática que posteriormente serán recubiertos por quitina (Mitchell y cols., 1983). Es por este motivo que son estructuras que al ser utilizadas como modelo de estudio, facilitan la identificación de mutaciones en genes que juegan roles importantes en la regulación del citoesqueleto de Actina.

El ala de *Drosophila melanogaster* posee una estructura plana y simple por lo que se puede utilizar para estudiar la función génica en la formación de tricomas en estadíos pupales, como sus efectos en adultos. Además, otras ventajas son que dicha formación ocurre de manera prácticamente sincrónica y que, durante ese proceso, no hay divisiones celulares que compliquen el proceso de análisis (Mitchell y cols., 1983; Ren y cols., 2005). Esto permite que la viabilidad celular no se vea afectada. Mientras que este modelo también permite identificar la identidad de los genes mutados.

Está ampliamente caracterizado que tanto el citoesqueleto de Actina, como el de microtúbulos son esenciales para la morfogénesis de los pelos epidermales o tricomas. Los microtúbulos participan determinando el posicionamiento del tricoma en la parte más distal de la célula, mientras que los filamentos de Actina son constituyentes fundamentales del tricoma y mantienen la integridad de éste (Turner y Adler, 1998). De acuerdo con lo anterior, se ha descrito que al inhibir la polimerización de microtúbulos utilizando Vinblastina, se induce la aparición de múltiples pelos, mientras que al inhibir la polimerización de Actina utilizando altas concentraciones de Citocalasina D en pupas (1 $\mu$ M), se impide completamente la formación de pelos; sin embargo, este tratamiento no alteró la formación de los pelos sensoriales lo que indicaría que la polimerización de Actina es esencial para la formación de un único pelo cuticular por célula (Turner y Adler, 1998).

Justo antes de la formación del tricoma, se observa la acumulación de Actina en la región distal de la célula, precisamente en el lugar donde se formará el pelo. También se ha determinado que las GTPasas Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) y Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) son necesarias para la apropiada formación y ubicación de los tricomas y tienen directa influencia en la polimerización de Actina. Esto se evidenció durante el desarrollo pupal de *Drosophila*, donde al expresar un dominante negativo para Rac1 se indujo la aparición de dos o tres pelos por célula, mientras que al utilizar un dominante negativo para Cdc42, las células carecieron de tricomas. Cabe destacar que Cdc42 y Rac1 ejercen su efecto sobre el citoesqueleto de Actina a través de la regulación de las proteínas de la familia Wasp/WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein), las que a su vez inducen la polimerización de Actina de manera ramificada mediante la activación del complejo Arp2/3. Es probable entonces que para la correcta formación del pelo sea necesaria también una polimerización ramificada de Actina en la zona distal de la célula. Aunque también se ha descrito que Cdc42 es capaz de inducir también la formación de filopodios, mediante la inducción de la polimerización lineal de Actina (Eaton y cols., 1996; Nobes y Hall, 1995).

Otra GTPasa pequeña que tiene relevancia en el contexto de formación de tricomas es Rho1, al respecto se sabe que es un regulador de la polimerización de Actina y además se ha determinado que estimula la polimerización de Actina mediante la activación de Rok (Rho Associated Kinase). Por otro lado, también es capaz de activar a la proteína



codificada por *multiple wing hair (mwh)* y promover su acumulación proximal y de esta forma inhibir la elongación de filamentos de Actina en dicha zona. Se observó que previo a la formación del tricoma, Rho se distribuye en todo el citoplasma, mientras que cuando comienza la formación del pelo se acumula específicamente en la zona de crecimiento (Yan y cols., 2009).

El mecanismo por el cual se forman los pelos o tricomas, en las células epiteliales, no está completamente dilucidado, pero se cree que el tiempo de iniciación de formación del pelo es regulado, al menos indirectamente, por la cascada de la hormona ecdisona (Ren y cols., 2005); por otro lado, se sabe que participan al menos 3 vías en paralelo y no está completamente claro de que haya una relación entre ellas. A continuación, analizaremos brevemente cada una de ellas.

#### 1.- Vía PCP (Fz/Stan)

La mayoría de los tipos celulares exhiben algún tipo de polaridad. Las células epiteliales están caracterizadas por polaridades apico-basales y en el plano del tejido, o polaridad celular planar (PCP). Los mecanismos globales que establecen la PCP respecto del eje corporal se mantienen desconocidos. Esto, dado que la señal Wnt que es transducida a las proteínas PCP es desconocida (Gao, 2012).

Hay tres estructuras adultas que han sido foco de estudio de PCP en *Drosophila*: pelos sensoriales, omatidios y pelos cuticulares. La más conocida es la formación de los pelos

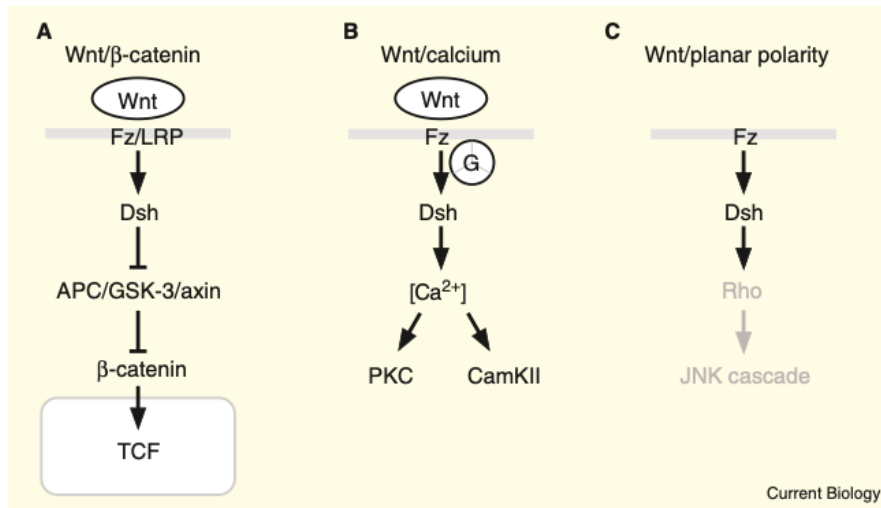
cuticulares. El ala, que es plana y cada célula forma un tricoma relativamente largo que apunta a distal ha sido el principal tejido para estudiar esta estructura (Adler, 2012; Carvajal-González y Mlodzik, 2014).

La vía Frizzled (Fz)/PCP controla la orientación distal de los tricomas en células epiteliales del ala y los genes que la componen están jerarquizados en tres grupos: i) genes PCP: Fz, Disheveled (Dsh), Prickle (Pk), Van Gogh (Vang), Flamingo (Fmi) y Diego (Dgo); ii) genes PPE (Planar Polarity Effector): Inturned (In), Fuzzy (Fy), y Fritz (Frtz) y iii) Multiple wing hair (Mwh) es el único miembro del tercer grupo. El grupo PCP estaría río arriba de PPE y Mwh, mientras PPE estaría río arriba de Mwh (Strutt y Strutt, 2009; Gao, 2012; Adler, 2012; Carvajal-González y Mlodzik, 2014).

La vía *fz* controla PCP restringiendo el sitio de iniciación del pelo a la parte más distal de las células del ala. La característica clave de estas proteínas es que exhiben una localización subcelular asimétrica próximo-distal una vez que se establece la polarización. Sin embargo, no se tiene claro cómo ocurre dicha distribución asimétrica de proteínas. Frizzled es una proteína receptora de siete dominios transmembrana y se localiza en la región apicolateral de las células del ala pupal y, previo a la formación del tricoma, adopta una distribución asimétrica en los extremos distales. Las proteínas Dsh y Dgo también se localizan distalmente. Mientras que Vang y Pk se localizan en los extremos proximales. Fmi se localiza en ambos extremos (Strutt y Strutt, 2009; Gao, 2012; Adler, 2012; Carvajal-González y Mlodzik, 2014).

Mwh se acumula en el la zona proximal,y se ha descrito una posible interacción con Inturned (Strutt y Warrington, 2008; Yan y cols., 2008; Lu y cols., 2010). Mutaciones en los genes de dicha vía llevan a la formación de pelos en ubicaciones subcelulares anormales y de anormal polaridad (Strutt y Warrington, 2008; Wong y Adler, 1993; Yan y cols., 2008). Respecto de Mwh, esta proteína inhibe la polimerización de Actina, actuando como una formina dominante negativa. Se sospecha que hay otros activadores del citoesqueleto de Actina que participan en el proceso de formación de pelo (Adler, 2012; Carvajal-González y Mlodzik, 2014).

La predicción en base a la secuencia de Mwh indica la presencia de un dominio FH3 y GBD (GTP asa Binding Domain), los que se encuentran frecuentemente en proteínas de la familia de las forminas (Faix y Grosse, 2006). Pero no contiene los dominios FH1 y FH2 característicos. Mientras que en Diaphanous, el dominio GBD se une a la GTPasa Rho y de esta forma se desplaza el dominio DAD C-terminal autoinhibitorio de DID. La vida media de Mwh es de 2-3 horas en alas pupales. Mwh se acumula en la periferia de las células entre 30 y 34 APF. Luego se localiza en la base de los pelos, alrededor de las 36 h APF. El fenotipo mutante de *mwh* es la formación de 3 a 5 pelos por célula. Mientras que la ganancia de función de Mwh genera la formación de pelos pequeños, células sin pelos, entre otros fenotipos. (Yan y cols., 2008; Lu y cols., 2015).



**Figura 8.** Vías Wnt. En esta imagen se muestran las distintas vías que participan en la señalización Wnt. Se sabe que PCP estaría involucrado en la vía Wnt/polaridad planar, independiente de Beta catenina. Se desconoce cuál sería el ligando activador de dicha vía, pero se cree que podría ser Wg. Modificado de Strutt, 2008.

Siendo Fz receptor de Wnt en diferentes contextos, aún no se ha encontrado evidencia de un ligando Wnt que active la vía de la polaridad planar (Strutt, 2008). Se ha propuesto que hay morfógenos actuando a este nivel, como Wingless (Wg), dado que su receptor es Fz, una de las proteínas centrales de PCP (Figura 8). Sin embargo, no se ha probado un rol para Wg en PCP en *Drosophila* (Gao, 2012).

## 2.- Vía Ds/Ft/Fj

Esta vía corresponde a la vía Fat y Dachous en conjunto con la proteína Four-jointed. Se ha propuesto que este sistema actuaría río arriba de la vía PCP, proveyendo una señal direccional para orientar la polaridad del pelo en el ala. Ft es una protocadherina

expresada proximalmente, Ds también es una protocadherina, mientras Fj es una kinasa residente del Golgi y expresada distalmente. Ft y Ds forman heterodímeros a través de la membrana celular, y Fj las fosforila para modular dicha unión. Aparentemente dicha modulación es dual: favorece la interacción entre Ft y Ds, pero inhibe la interacción de Ds y Ft (Simon y cols., 2010). La expresión graduada de DS y Fj resulta en la formación sesgada del heterodímero Ft/Ds a lo largo del eje proximo-distal en el ala. Respecto de la participación de esta vía, en la formación del pelo o tricoma se ha descrito que participaría en la generación de asimetría entre las proteínas que componen la vía PCP. Aparentemente, el tráfico de Fz hacia el extremo distal es dependiente de microtúbulos. Sin embargo, cómo se transmite la señal a la vía PCP, es completamente desconocido y se cree que ambas vías funcionan en paralelo (Strutt y Strutt, 2009; Sagner y cols., 2012; Gao, 2012).

No se sabe cómo la localización asimétrica de proteínas es regulado por el transporte a través de microtúbulos, a nivel molecular. Lo que sí se ha descrito, es que CK-1 /gish, una caseína kinasa, que coopera de manera independiente con Mwh para restringir la formación del tricoma a un solo sitio en la célula. CK-1 estaría regulando el tráfico de vesículas polarizado mediada por Rab11 (Gault y cols., 2012).

### 3.- Vía Ovo/Svb

Ovo/Shavenbaby (Svb) es un factor de transcripción que funciona río abajo de los genes de polaridad de segmento y la vía de señalización EGF para regular la formación de dentículos y pelos en etapas embrionarias y pupales, respectivamente (Andrew y Baker, 2008; Payre y cols., 1999; Ren y cols., 2005). También se ha propuesto que la activación de la vía Wg actúa a través de la vía  $\beta$ -catenina para inducir la transcripción de *svb* (Delon y cols., 2003).

La actividad de Svb es esencial y suficiente para modificar la organización del citoesqueleto de Actina y de esta forma, la formación de los pelos o tricomas en *Drosophila*, dado que la presencia de Svb mutado lleva a la aparición de células sin pelos (Delon y cols., 2003; Delon y Payre, 2004; Ren y cols., 2005). También se ha descrito que Svb activa la expresión de un subconjunto de genes que controlan la dinámica del citoesqueleto de Actina, cuya inactivación individual produce defectos en la morfología de las dentículas.

Entre los genes cuya expresión es dirigida por Svb podemos nombrar a *shavenoid/kojak* (*sha*), codificante para una proteína descrita como asociada con Actina (Chanut-Delalande y cols., 2006). Se sabe que *sha* es necesario, pero no suficiente para activar el citoesqueleto de Actina para conducir la formación del pelo y que actúa de manera autónoma celular. Al respecto, se ha descrito que Shavenoid se acumula en la cercanía

de la membrana plasmática en los pelos crecientes, y principalmente en proximal, más que en distal. Mutaciones en *sha* también generan el fenotipo más dramático que se observa en la formación del tricoma: la ausencia total de este (Ren y cols., 2006).

También se ha descrito que *Svb* induce la expresión de *miniature (m)*, codificante para una proteína que se ha descrito como requerida para la interacción membrana-cutícula. Sin embargo, la expresión de *m* es requerida, pero no suficiente para la correcta formación de dentículas. También se ha descrito la participación de otro gen como *grainy head*, que también codifica para un factor transcripcional esencial para el desarrollo normal del pelo y su polaridad, esto debido a que *Grh* es requerido para la localización preferencial de *Fz*, *Dsh*, y *Vang*, y para la expresión normal de *Stan*. Además, se determinó que participa en una vía independiente de *Fz* para el desarrollo del tricoma (Lee y Adler, 2004). De manera similar a *Grh*, la vía *Fz* actúa aparentemente en paralelo a *Sha* (Ren y cols., 2005).

Sin embargo, no se sabe cuáles son todos los blancos transcripcionales de *Svb* (aparte de *sha* y *m*), pero entre otros potenciales genes blanco de *Svb* se encuentran *Combover (Cmb)*, *Diaphanous*, *Cip4*, y *Sha*, entre otras. Respecto de *Cmb*, se sabe que promueve la formación de tricomas *in vivo*, pero no es esencial para dicha formación. Hasta ahora, *cmb* es el único gen reportado que suprime la actividad de *Mwh* (Fagan y cols., 2014).

Se ha determinado que la formina Diaphanous es la responsable de la polimerización de los filamentos de Actina que conformarán el pelo o tricoma en *Drosophila*. Además, se ha observado una función antagónica entre Mwh y Diaphanous. Dia se localiza en la periferia celular previo a la formación del pelo y luego, se localiza en los pelos crecientes. También se estableció que Mwh y Dia son capaces de interactuar *in vitro*, mediante ensayos de *pull down* e inmunoprecipitación (Lu y Adler, 2015). Mientras que se ha observado que la pérdida de función de Cip4 afecta la formación del pelo y la restricción del número de pelos en el ala depende de Arp2/3 y requiere de la función de WAVE, pero no de WASP (Fricke y cols., 2009).

Como se ha mencionado, la formación de este tipo de estructuras se ha utilizado ampliamente para estudiar o analizar los cambios dinámicos del citoesqueleto y los efectos sobre el tráfico de membranas que subyacen a la generación de este tipo de estructuras.

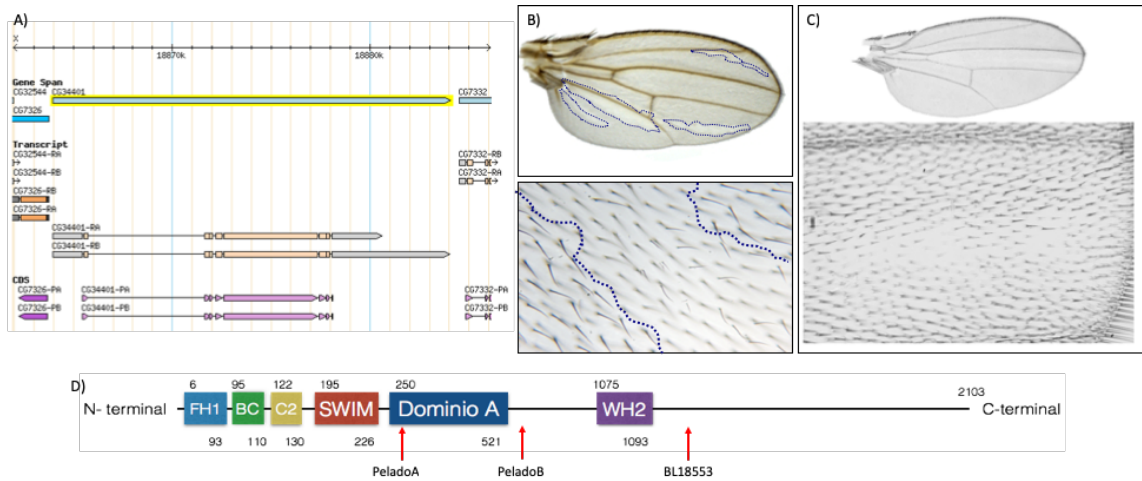
Ahora bien, en un *screen* genético de ganancia de función basado en elementos P, realizado por los tutores de la presente tesis, se buscaba identificar genes involucrados en la morfogénesis del ala. Se observó que el elemento EP631, en el cromosoma X, presenta un fenotipo bastante particular en el ala de *Drosophila melanogaster* (Anexo 16).



Así, se identificó el gen CG32556 como *chascon*, debido al fenotipo de alteración en la orientación de los pelos o tricomas (Olguín y cols., 2011). Entonces, se buscó la posible reversión de dicho fenotipo. En esa búsqueda, se encontró un alelo letal (EP631<sup>IE3</sup>) que revertía el fenotipo asociado con la activación de EP631. Sin embargo, posteriormente se evidenció que, curiosamente, existían dos mutaciones en distintas zonas del mismo cromosoma X. Al generar tejidos mosaico para la mutación EP631<sup>IE3</sup> se observa un fenotipo de células epidermales carentes de tricomas (Figura 9). Con el fin de identificar a qué gen correspondía dicha mutación, se realizaron ensayos de complementación utilizando distintas líneas con deficiencias en distinta zona del cromosoma X, disponibles comercialmente. Se determinó que Df(1) Exe 17465 no complementaba con el fenotipo observado. Por lo tanto, se analizaron los genes que estaban presentes en la zona de la mencionada deficiencia y se analizó mediante el uso de RNAs de interferencia cuál de ellos generaba el mismo fenotipo. De esta forma, se llegó al gen CG34401. Las características fenotípicas observadas en las células mutantes o que poseen un alelo mutante del gen, condujeron a denominar a este gen como *pelado*. Este es un gen escasamente estudiado por lo que no se conoce cuál podría ser su función en el desarrollo o el mecanismo por el cual participaría para la correcta formación de estas estructuras.

### Gen CG34401: *pelado*

Este gen se encuentra en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster* y codifica para una proteína predicha de unos 2100 aminoácidos. Análisis de su secuencia revela la presencia de múltiples dominios, ubicados principalmente en el extremo N-terminal (Figura 9). Entre estos, se destacan los dominios FH1 (Formin Homology 1), SWIM (en relación al factor transcripcional SWI2/SNF2 y la transposasa MuDR) (Makarova y cols., 2002), y WH2 (Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2). El dominio FH1 está presente principalmente en las forminas y estaría implicado en la interacción con Profilina (Faix y Grosse, 2006). El dominio SWIM, corresponde a un dominio de dedos de zinc y permitiría la interacción con otras proteínas e incluso con el DNA (Makarova y cols., 2002; Ko y cols., 2014; Godin y cols., 2015). Finalmente, el dominio WH2 le otorgaría la capacidad de unirse a monómeros de Actina (Paunola y cols., 2002). La presencia de estos dominios y el fenotipo asociado a la deficiencia de este gen, sugieren que esta proteína podría regular la polimerización de Actina durante el crecimiento del tricoma. Por otro lado, el extremo C-terminal se caracteriza por la presencia de regiones que no tienen una estructura clásica (alfa hélice o beta plegada) por lo que se ha descrito como una región “desorganizada”, lo que hace difícil predecir su función.



**Figura 9. Descripción general del gen CG34401/*pelado*.** A) Localización del gen en el cromosoma X de *Drosophila melanogaster*. También se muestran los transcritos y polipéptidos descritos y codificados por el gen CG34401 (*pelado*). Obtenido de [www.flybase.org](http://www.flybase.org). B) Fenotipo generado al producir parches de células que poseen mutado el gen *pelado*, mediante la técnica MARCM. C) Fenotipo generado al utilizar un RNA interferente contra el gen CG34401 expresado con el *driver* Patch Gal4. Esto genera un fenotipo de ausencia de tricomas en la zona de expresión del interferente (entre venas 2 y 3). D) Estructura predicha de la proteína Pelado, codificada por el gen CG34401, también se indican los sitios mutados en las moscas comerciales que se tienen disponibles (Pelado A y B), así como el sitio blanco del RNA interferente (BL18553).

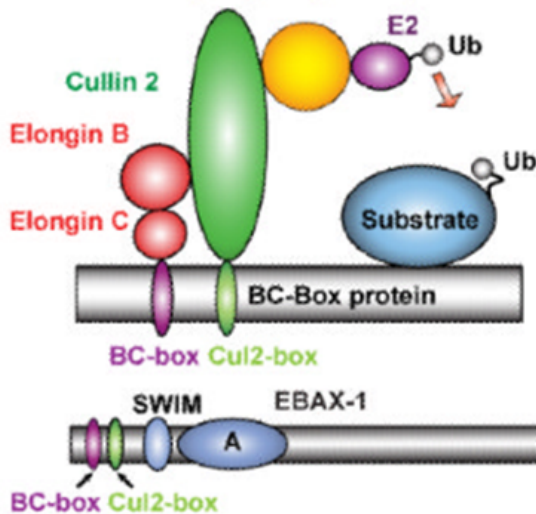
### EBAX-1, ortólogo de *pelado* en *C. elegans*

Recientemente se describió la función de EBAX-1 (Elongin BC-Binding Axon regulator 1), ortólogo del gen *pelado* en *C. elegans*. Se determinó que este gen es esencial para el proceso de guía axonal y, consecuentemente, el desarrollo del sistema nervioso. En dicho organismo, el mecanismo por el cual esta proteína regula el desarrollo nervioso,

es actuando como parte de un complejo ubiquitin ligasa, donde EBAX-1 asegura el correcto plegamiento de SAX-3 (homólogo de Robo, proteína que ejerce una señal repulsiva en la guía axonal) en el citoplasma, sensando su forma mal plegada o no plegada en condiciones de estrés térmico. En EBAX-1 los dominios descritos son BC-box, Cul2 box y Dominio A, además del dominio SWIM. Dichos dominios son sindicados, por los autores, como los responsables del mecanismo molecular. Al respecto, el dominio SWIM permitiría la interacción con DAF-21 (homólogo de heat shock protein 90, HSP90) facilitando el replegamiento de SAX-3 cuando está mal plegada, mientras que los dominios BC-box y Cul2 box permitirían la interacción con las proteínas Elonginas B/C y Culin 2, respectivamente; las que a su vez serían el nexo con el resto del complejo ubiquitin ligasa, para así ubiquitinar a SAX-3, y así enviarla a degradación por el proteasoma cuando no pudo ser replegada. Por otro lado, el dominio A aparentemente estaría involucrado en la regulación de la interacción del dominio SWIM con DAF-21. En dicha publicación los autores no discuten o analizan la presencia de los dominios FH1 y WH2, también identificados en EBAX-1 mediante nuestros análisis de secuencia, los que podrían estar directamente relacionados con la polimerización de Actina (Wang y cols., 2013).

Dado que EBAX-1 funciona en el sistema nervioso de *C. elegans* como un *buffer*, degradando a SAX-3 en condiciones de alta temperatura, es posible especular que la actividad de Pelado sobre la regulación de la polimerización de Actina pudiese ser

mediante un mecanismo análogo, degradando algún componente inhibidor de la polimerización de Actina responsable de su regulación durante la formación de tricomas.



**Figura 10:** Complejo ubiquitin ligasa formado por EBAX-1 (ortólogo de Pelado en *C. elegans*). En esta imagen se ilustra cómo estaría conformado el complejo ubiquitin ligasa descrito, así como los dominios de interacción con el resto del complejo. Modificado de Wang y cols., 2013.

De acuerdo con lo anterior, al disminuir la función de Pelado, mediante el alelo mutante o por expresión de un RNAi en el ala, se genera la ausencia o deficiencia en la formación de tricomas. Todo esto podría implicar que Pelado podría tener una función similar que su ortólogo en *C. elegans* enviando proteínas regulatorias de la dinámica del citoesqueleto de Actina a degradación mediante el proteasoma. Como, por ejemplo, podría estar enviando a degradación a una proteína que inhibe la formación del pelo como *mwh*, dado que inhibe la polimerización lineal mediada por Diaphanous, o bien podría enviar a degradación a una proteína que compita por los monómeros de Actina para inducir la polimerización ramificada de Actina como Scar o Wasp, dado que se sabe

que la formación del pelo requiere de la polimerización lineal de Actina mediante la formina Diaphanous (Lu y Adler, 2015).

Los antecedentes presentados aquí respecto de la formación del pelo en *Drosophila melanogaster* muestran que es necesaria una regulación estricta de la polimerización de Actina y que es posible que exista una competencia por los monómeros de Actina disponibles para producir los filamentos de Actina. Pelado sería necesario regulando una o varias etapas del proceso de formación del tricoma.

**Hipótesis:**

Pelado regula la dinámica del citoesqueleto de Actina, favoreciendo la polimerización lineal de actina en *Drosophila melanogaster*.

**Objetivo general:**

Determinar el mecanismo por el cual Pelado regula el citoesqueleto de Actina, y consecuentemente la formación de tricomas.

**Objetivos específicos:**

- 1.- Caracterizar el fenotipo de pérdida de función de Pelado. Determinar en qué momento se genera la alteración en la formación del pelo.
- 2.- Evaluar si la función de Pelado es homóloga a la función descrita como ubiquitin ligasa para EBAX-1 en *C. elegans* (ortólogo de Pelado).
- 3.- Analizar el efecto de la ganancia o pérdida de función de Pelado en células del sistema inmune de *Drosophila melanogaster* y así determinar si su efecto sobre el citoesqueleto de Actina es global o está enfocado exclusivamente a la formación del pelo.
- 4.- Estudiar qué dominios de Pelado son necesarios para su función sobre el citoesqueleto de Actina y por ende para la formación de tricomas en *Drosophila melanogaster*.

# MATERIALES Y METODOS

## Materiales

- Materiales cultivo *Drosophila melanogaster*

Harina sin polvos de hornear, Mont Blanc

Levadura fresca, Lefersa

Dextrosa monohidratada, Corns Products

Agar Agar, TCL

Ácido propiónico, Winkler 100895

Nipagin, Metilparabeno. Winkler 103890

CO<sub>2</sub>

- Materiales ensayos de disección de alas adultas

Etanol 100%, Labmed Ltda 1170

Ácido láctico, Merck 1.00366.2500



- Materiales ensayos de inmunofluorescencia

PFA 4%, Merck

Tritón X100, Sigma

BSA (Albúmina de Suero Bovino)1% en PBS o PBT, Winkler

PBS 10x (NaCl 1,3 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,07 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,03 M; pH 7)

PBT 0,1%

Rhodamine Phalloidin, Invitrogen R415

DAPI, Molecular probes D1306

Vectashield H-1000 Antifade Mounting Medium, VectorLabs (Prolab) CB-2000

- Materiales ensayos de western blot e inmunoprecipitación

*Buffer* extracción proteínas/lisis: Aprotinina 2mg/mL; Leupeptina 10 mg/mL; Pepstatina A 2 mg/mL; PMSF 0,5 M; EDTA 0,5 M; NaF 0,5 M; Pirofosfato de Sodio 0,1 M; β-Glicerolfosfato 0,1 M; Ortovanadato de Sodio 100 mM.

*Buffer* de carga proteínas 5x: Tris HCl pH 6,8 0,312 M; SDS 10%; β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05%

Agua bidestilada, Sanderson

kit IP: Pierce Classic Magnetic IP/CoIP Thermo Scientific, 88804

Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616.

*Buffer* de corrida: Tris HCl 25 mM pH 8,8; Glicina 192 mM; SDS 0,1%

*Buffer* de transferencia: Tris HCl 48 mM pH 7,4; Glicina 39 mM; Metanol 20%

Persulfato de Amonio 10%

Membrana de nitrocelulosa 0,2 µm; Life Science 10600001 Amersham Protran

Solución de bloqueo: leche descremada al 5% en PBT 0,1%

Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific 32106.

*Stripping buffer*: 0,2 M glicina; 3,5 mM SDS; 1% Tween 20, a pH 2,2

*Cocktail* de inhibidores de proteasas Halt, Pierce

Anticuerpos secundarios: HRP anti mouse (DC02L) y HRP anti rabbit (DC03L),

Calbiochem.

TEMED, Winkler

Acrilamida/Bisacrilamida, Winkler

Tris HCl 1M pH 8,8 y 6,8

- Materiales ensayos de Biología Molecular

pEntr™/D-TOPO Cloning kit, Invitrogen. REF 45 - 0218

Kit Gateway, Invitrogen 11791-020

Agua libre de nucleasas para Biología Molecular, Corning 46-000-CM

RBC Taq DNA Polymerase, RBC Bioscience, catálogo N°RTT11 (*Buffer* incluido)

Q5 High-Fidelity DNA polymerase, New England BioLabs, M0491S.

*Gene Ruler* 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific SM0311.

dNTPs, Glen Burnie

Bromuro de Etidio, Merck

MgCl<sub>2</sub>, Fermentas

Agarosa, Lafken Fer100A200

*Buffer* TAE 50x, Winkler BM0490

T4 DNA ligase, New England BioLabs, M0202S (*Buffer* incluido).

Bacterias competentes: DH5-α

LB, Life Science J106

E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit, Omega D6945-00

E.Z.N.A. Gel Extraction Kit, Omega D2500-00

Ampicilina, Sigma

Kanamicina, Sigma

<b>Nombre</b>	<b>Sitio de corte</b>
AgeI	A-CCGGT
EcoRI	G-AATTC
BglII	A-GATCT
XbaI	T-CTAGA
XhoI	C-TCGAG
HindIII	A-AGCTT
NcoI	C-CATGG

**Tabla 1:** Lista enzimas de restricción utilizadas.

Nombre	Fuente	Descripción
pTHW	The Vector Collection	Vector pUASt modificado con HA en N-terminal
pENTR/D-TOPO	Invitrogen	Vector de entrada para el sistema Gateway
pUASt HA-Pldo WT	P. Olguín Lab	Permite expresar Pldo con tag en N-terminal
pUASt Pldo-HA WT	P. Olguín Lab	Permite expresar Pldo con tag en C-terminal
pUASt HA-Pldo C	Generado en tesis	Permite expresar Pldo C con tag en N-terminal
pUASt Scar-GFP	s. Bogdan Lab	Permite expresar Scar con tag GFP
pUASt Jbug	P. Olguín Lab	Permite expresar Jbug con tag HA
Pdc12 Gal4	P. Olguín Lab	Permite expresar Gal4 y así también los vectores pUAS de interés

**Tabla 2:** Lista de plasmidios y vectores utilizados.

- Materiales cultivo células S2R+

Schneider *Drosophila* Medium, Grupo Bios 21720024

Effectene Transfection Reagent, Qiagen 1054250.

Fetal Bovine Serum, Gibco 11523387

MG132, amablemente regalado por el Laboratorio de Transducción de Señales

Moleculares del Dr. Lavandero.

<b>Nombre</b>	<b>Marca, catálogo</b>
Scar (Mouse)	Hybridoma
Diaphanous (Rabbit)	S. Wasserman Lab
HA (Rabbit)	Cell Signaling, C29F4
Wasp (Mouse)	Hybridoma
Fascin (Mouse)	Hybridoma
Elongin C (Rabbit)	Biolegend, 613101
beta Actin (Mouse)	Santa Cruz
IgG inespecífica	Invitrogen 10500C
GFP (rabbit)	Invitrogen A11122
Mwh (Rat y Rabbit)	P. Adler Lab

**Tabla 3:** Lista de anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpos secundarios: Invitrogen Alexa anti-Mouse 488 A11001; Alexa anti-Rabbit 633 A21086; Alexa anti-Rabbit 488 A11008, 633; Alexa anti-Rat 647 A21247

- Materiales Biológicos: se utilizaron adultos, pupas y larvas de tercer estadio

<b>Gen</b>	<b>Condición</b>	<b>Código</b>	<b>Fuente</b>
CG34401	RNAi	18553	Bloomington
CG34401	mutante nulo	52333	Bloomington
CG34401	mutante nulo	52334	Bloomington
Scar/WAVE	RNAi	21908	VDRC
Scar/WAVE	UAS-GFP	-	S. Bogdan Lab
Scar/WAVE	UAS-Myr	-	S. Bogdan Lab
CG4080	RNAi	9026	VDRC
Elongina B	RNAi	12953	VDRC
Elongina B	RNAi	101542	VDRC
Elongina C	RNAi	15303	VDRC
Elongina C	RNAi	105740	VDRC
Cullin 2	RNAi	19297	VDRC
Cullin 2	RNAi	105101	VDRC
Diaphanous	RNAi	1768-R3	P. Olguin Lab
Diaphanous	UAS-GFP	56751	Bloomington
Chickadee	RNAi	102759	VDRC
Chickadee	RNAi	34523	Bloomington
GFP	RNAi	41552	Bloomington
CD8 GFP	UAS	5137	Bloomington
Hml G4	Gal 4	30139	Bloomington
Patch G4	Gal 4	2017	Bloomington
Tug 19A	MARCM	-	B. Egger Lab

Nubbin G4	Gal 4		Bloomington
PtcG4, Dcr, PldoIR/Cyo	RNAi Gal 4	-	A. Glavic Lab
UAS Pldo; HmlG4	UAS Gal 4	-	A. Glavic Lab
w1118	control	5905	Bloomington
PtcG4;Dcr2	Gal 4	-	A. Glavic Lab
Mwh	IR	41514	VDRC
Elav	Gal 4	458	Bloomington
Quail	IR	27623	VDRC
WASP	IR	13759	VDRC
Dcr2	UAS	24651	Bloomington
if/Cyo; MKRS/TM6b	balancers	-	
Engrailed	Gal 4	30564	Bloomington
Rp55/FM7;; MKRS/TM6b	balancers	-	
Pldo IR; Dcr	IR	-	A. Glavic Lab
Pelado WT (X)	UAS	-	A. Glavic Lab
Pelado WT (II)	UAS	-	A. Glavic Lab
Pelado DeltaC (II)	UAS	-	A. Glavic Lab
Actin	UAS	7310	Bloomington
Tubulin	Gal 4	30029	Bloomington
Actin	IR	101438	VDRC
Cdc42 V12	UAS	4854	Bloomington
FRT19A		1709	Bloomington

**Tabla 4:** Lista de animales utilizados en esta tesis.



## Métodos

### 1.- *Drosophila melanogaster* como modelo genético

Este modelo de estudio posee el potencial de aproximaciones genéticas y moleculares para responder preguntas sobre la expresión y función de genes, en distintos ámbitos como la biología celular, biología del desarrollo, y neurobiología (Greenspan, 2004).

Dentro de sus ventajas están su corto ciclo de vida mantención, la posibilidad de obtener una prole numerosa y una apariencia externa altamente estereotipada, lo cual hace que cualquier diferencia sea fácilmente reconocible. Su genoma se encuentra secuenciado lo que evidenció que muchos de los genes presentes en *Drosophila* también se encuentran en vertebrados, permitiendo estudiar genes relacionados con el desarrollo, y extrapolar los hallazgos a otros organismos. Además presenta la posibilidad de generar fácilmente transgénicos y mutantes y combinarlos con herramientas genéticas, dentro de las cuales se encuentra el sistema Gal4/UAS, y la técnica MARCM utilizadas en esta tesis y detalladas más adelante (Greenspan, 2004).

#### 1.1. Cromosomas

*Drosophila melanogaster* posee 4 pares de cromosomas: X/Y, 2, 3 y 4. Cada cromosoma posee un brazo izquierdo (L, del inglés *left*) y uno derecho (R, del inglés *right*). El cromosoma X y el cromosoma 4 tienen un brazo izquierdo muy grande y casi no tienen

brazo derecho. El tamaño de los distintos brazos de cromosomas es bastante comparable, mientras el cromosoma 4 es alrededor de  $\frac{1}{5}$  del largo, respecto a los otros (Greenspan, 2004).

La determinación del sexo en *Drosophila* depende de la razón de los cromosomas X al conjunto de cromosomas autosomales. En los machos, un X con 2 autosomales da una razón de 0.5, mientras las hembras tienen una razón de 1.0. El cromosoma Y contiene pocos genes y no es requerido para la mayoría de los aspectos del desarrollo del macho, siendo necesario sólo para la motilidad apropiada de los espermatozoides (Greenspan, 2004).

Una característica importante de la genética de mosca es la ausencia total de recombinación en los machos, fenómeno que sí ocurre en las hembras. Dicha recombinación puede ser controlada mediante el uso de los cromosomas balanceadores, cuya secuencia está tan alterada (como resultado de múltiples inversiones y translocaciones inducidas por radiación), que no se pueden aparear o recombinar con su homólogo normal durante la profase meiótica. Además, su presencia en una mosca es fácilmente reconocible mediante una mutación marcadora dominante fácilmente reconocible y también contienen marcadores recesivos. Consecuentemente, su transmisión a la progenie también puede ser traqueada sin ambigüedad. Entonces, si la progenie no mantiene el cromosoma balanceador, entonces está en homocigosis. Existen balanceadores de los cromosomas X, 2 y 3 (Greenspan, 2004).

Entre los principales cromosomas marcadores existen mutaciones que van a afectar el color de ojos, la forma del ojo, la forma del ala, la morfología de las venas del ala, el color de los pelos, la forma de los pelos y la pigmentación de la cutícula y sirven para marcar los diversos brazos de los cromosomas (Greenspan, 2004).

## 1.2. Nomenclatura

Posiblemente, la forma más fácil de entender la nomenclatura de la genética de *Drosophila* es con un ejemplo:

*f; cn bw; TM2/tra*

Este ejemplo muestra distintos puntos:

- El genotipo de un cromosoma es indicado sólo si posee una mutación o alguna clase de variante en este, y los cromosomas siempre están indicados en el orden X/Y; 2; 3; y 4. En este ejemplo, *f; cn bw; TM2/tra* se refiere a los cromosomas X; 2; y 3, respectivamente. Si las mutaciones pertinentes están en el los cromosomas X y 3 solamente, entonces uno se saltaría cualquier designación para el cromosoma 2, como por ejemplo: *f; TM2/tra*.
- Los genotipos de la mosca siempre están en cursiva, así como los mutantes y los nombres de los genes.
- Los nombres mutantes pueden ser abreviados con pocas letras (usualmente 3); *f* es indicativo de *forked*, que afecta la morfología de los pelos, *cn* corresponde a

*cinnabar* y *bw* señala a *brown* (ambos afectando el color de ojos, por lo que al estar juntos producen el ojo blanco), TM2 indica al cromosoma balanceador "Third Multiple 2", y *tra* denota a *transformer*, un gen requerido para la determinación del sexo.

- Las abreviaturas en minúscula indican los fenotipos recesivos y aquellos en mayúscula indica a los fenotipos dominantes.
- El punto y coma separa los símbolos de genotipo para los distintos cromosomas.
- Las comas siguen el nombre de un rearreglo e indica mutaciones en ese mismo cromosoma.
- Si un genotipo cromosomal está escrito en una sola línea, indica que el stock está homocigoto para dicho fenotipo; la heterocigosidad se denota por un genotipo de 2 líneas (como por ejemplo, TM2/*tra*).
- Todo lo que no se muestra, se presume que es silvestre (o *wild type*), al igual que el signo (+).

Los nombres asignados a los genes en *Drosophila melanogaster*, corresponden al fenotipo que genera su mutación. Por ejemplo, el gen *white* corresponde al gen que codifica para el color de ojos en la mosca (rojo) y cuando este gen está mutado, la mosca presenta los ojos de color blanco.

Respecto de los cromosomas balanceadores sus nombres corresponden en primer lugar al cromosoma modificado del que se trate

Muchos de los transgénicos realizados en *Drosophila* llevan como marcador la mutación *white*, que da distintos tonos de color de ojos dependiendo del lugar de inserción.

### 1.3. Animales y su mantención

A 25°C el ciclo de vida de la mosca del vinagre (*D. melanogaster*) toma aproximadamente 10 días. La embriogénesis y los primeros dos estadíos larvarios demoran un día cada uno, el tercer estadío larvario, dos días y los estadíos pupales de 4 a 5 días. A los dos días de la eclosión, las hembras adultas comienzan a poner huevos fertilizados. Las cepas se mantienen a 17°C en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con 50 g/L de harina, 100 g/L de levadura fresca, agar-agar, 80 g/L azúcar (dextrosa monohidratada), 6 mL/L ácido propiónico y nipagin (bactericida). Todos los experimentos se realizaron a 25°C, a menos que se indique de otra forma.

### 1.4. Sistema Gal4/UAS

El sistema Gal4/UAS fue desarrollado a partir de levadura y consiste de dos componentes principales, el activador transcripcional Gal4 y un transgen bajo el control del promotor UAS (Upstream Activating Sequence). UAS corresponde al elemento enhancer esencial para la activación transcripcional de los genes blanco de Gal4, y es transcripcionalmente inactivo en ausencia de Gal4. Gal4 es una proteína de 881 aminoácidos, activadora de la transcripción en levadura, inducida por galactosa. Se expresa en un patrón específico (bajo el control de un promotor nativo) y produce la activación transcripcional de

cualquier transgen bajo el promotor UAS en las mismas células (Greenspan, 2004; Blair, 2003).

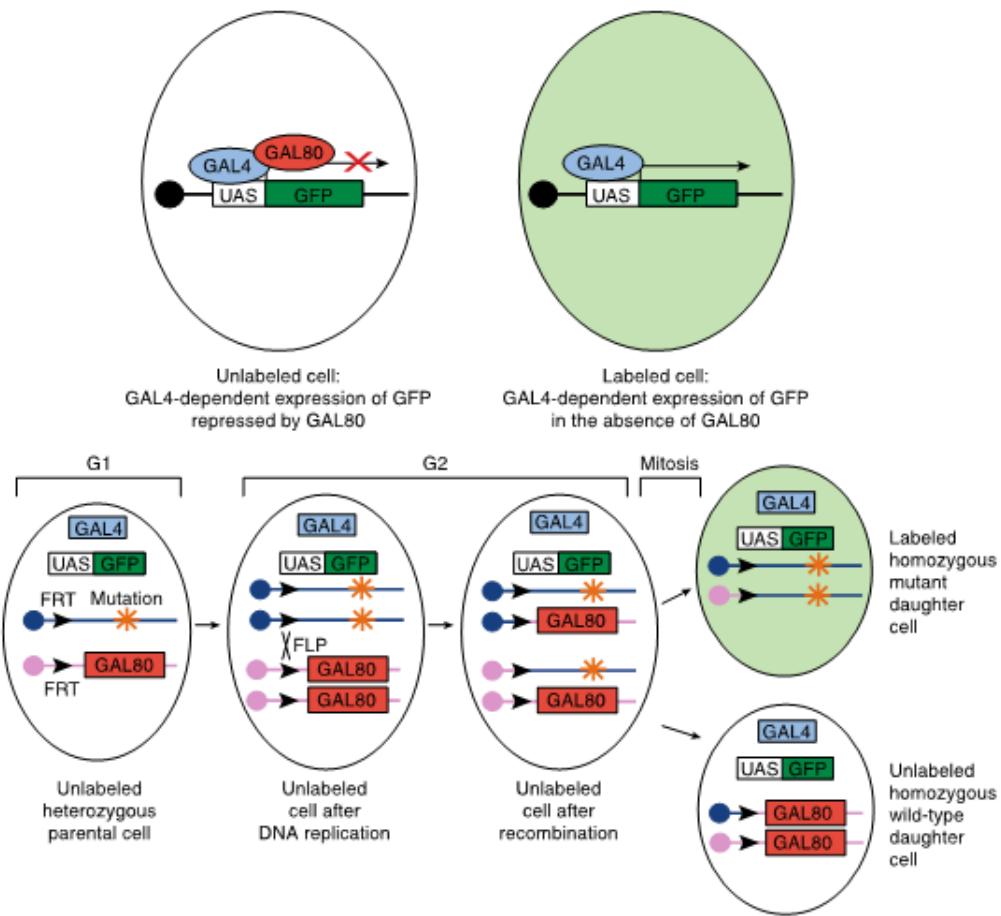
Moscas que poseen distintos constructos de interés están disponibles como recurso para la comunidad a través de distintos centros de stocks localizados en múltiples sitios del mundo (BDSC, Bloomington Drosophila Stock Center; VRDC, Vienna RNAi Center).

### 1.5. MARCM

Este sistema permite marcar positivamente una población de células mutantes o *wild type*. El análisis de mosaicos utilizando esta técnica consiste en la generación de células mutantes homocigotas desde un precursor heterocigoto a través de la recombinación mitótica. Esta técnica combina el represor transcripcional Gal80, con el sistema de expresión Gal4-UAS y el sistema generador de clones FLP/FRT. En la técnica MARCM, la actividad de Gal4 es reprimida por la proteína Gal80, produciendo células no marcadas que son heterocigotas para Gal80 y la mutación. Después de la recombinación mitótica dependiente de FLP/FRT, las células homocigotas para la mutación pierden el Gal80, activándose Gal4 y así el gen reportero, como UAS-GFP (Figura 11) y cualquier otra construcción UAS presente en el animal, por ejemplo las diferentes versiones truncas o mutantes de *pelado* (Greenspan, 2004; Wu y Luo, 2006).

La obtención de células mutantes, mientras el resto se mantiene heterocigota silvestre, se realiza mediante la inducción de recombinación activando la flipasa. Dicha activación

se realiza mediante un choque de calor en un tiempo determinado, que dependerá del momento en que se quiera analizar el fenotipo de las células mutantes. En el caso de las células del ala se generó la recombinación 96 horas después de la puesta de huevos. Mientras que en el caso de los hemocitos, se generaron 3 rondas de choques térmicos a las 48, 72 y 96 horas después de la puesta de huevos y cada una de estas rondas fue seguida por 1 hora a 18° C para mejorar la eficiencia del protocolo (Moreira y cols., 2013).



**Figura 11.** MARCM. Esquema que ilustra cómo funciona la técnica MARCM. En resumen, se tienen en células que poseen tanto el activador transcripcional Gal4, como el represor transcripcional Gal80, más el marcador, que en este caso es GFP, y la mutación que se desea evaluar en homocigosis. Además se tiene una flipasa que se expresa bajo un promotor de respuesta a estrés por calor. Entonces, al inducir el estrés térmico, se expresa la flipasa, la que permite la recombinación entre cromosomas homólogos, lo que posteriormente se traducirá en la presencia de células marcadas en verde (GFP) que presentan la mutación de interés y por otro lado células no marcadas, que corresponden a las células silvestre y que sirven de control interno al realizar cualquier tipo de análisis. (Wu y Luo, 2006).



## 1.6. Ensayos de epistasis

Los ensayos de epistasis se refieren a la evaluación de interacción entre dos genes. En otras palabras, se busca evaluar si dos productos génicos participan o no en la misma vía, y si uno de ellos está río arriba del otro. Para evaluar esto, en general se evalúa la pérdida de función de cada uno de los genes que se está analizando, luego la combinación de ambos y si la ganancia de función de uno de ellos es capaz de revertir el fenotipo de pérdida de función del otro y viceversa.

## 2. Ensayos de Biología Molecular

### 2.1. Digestión con enzimas de restricción

Los ensayos de digestión con enzimas de restricción se realizan principalmente para verificar la identidad de un vector que se está utilizando, o para chequear que algún constructo en construcción esté correcto. Cada ensayo de digestión se realizó de la misma manera: 1x buffer correspondiente, 1 a 2  $\mu\text{g}$  de DNA (vector de interés), agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final y 10% del volumen final corresponderá a la enzima de restricción que se utilizará. Se siguen las instrucciones de acuerdo a la enzima en uso, pero por lo general la incubación es de 1 hora a 37°C. Luego, se corre en un gel de agarosa, para evaluar si la digestión funcionó o no.

## 2.2. Construcción de mutantes

La mutante que carece del extremo C-terminal, se obtuvo mediante PCR utilizando los siguientes partidores:

Fw: 5' CACCATGGACCGCTTCAGCTTCG 3'

Rv 1: 5' CTCTCCTCGCGTCTTAAAGGTTCC 3'

Rv 2: 5' GAAAATAAACGTGGCCAGGTTAATAGGCAATAG 3'

Rv 3: 5' GCTGAGTGTAAGTGGCATCGAAAATAAACGTGGC 3'

Una vez obtenido el producto de PCR con el tamaño correspondiente, se purificó a partir del gen de agarosa (kit E.Z.N.A). Este fragmento de PCR se insertó posteriormente en el vector pENTR, para lo cual se utilizó el kit con el mismo nombre (kit pENTR). Con este vector se transformaron las bacterias DH5- $\alpha$ , y se seleccionaron aquellas colonias positivas en una placa de cultivo con kanamicina.

Una vez obtenidas las colonias positivas, se crecieron para purificar el vector pENTR con la fracción N-terminal de Pelado. Este vector se envió a secuenciar para asegurarnos que corresponde al fragmento de nuestro interés y que no se hayan generado mutaciones adicionales en su secuencia.

Una vez verificado que la secuencia está correcta, dicho fragmento se subclonó en el vector pUAS<sub>t</sub>, mediante el kit de Gateway, donde además se le adicionó la secuencia que

codifica para el tag HA en el extremo 5' del gen pelado. El uso de Gateway se basa en la actividad de la integrasa de fago lambda para recombinar el marco de lectura abierto del gen de interés, flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2 en el vector de entrada con los sitios attR1 y attR2 del vector de destino. Luego, se transformó en bacterias DH5alpha y se crecieron en placas con Ampicilina.

Posteriormente, se verificó que estuviera correcto, mediante PCR de colonias y cortes con enzimas de restricción, se amplificó dicho vector y se envió a la empresa Bestgene, para transformar la línea germinal de embriones y, finalmente, generar la mosca transgénica.

PCR de colonias: Para corroborar la transformación bacteriana, y la identidad del plasmidio transfectado, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) de colonias con el siguiente protocolo:

	Volumen (uL)
H2O dd	8
Tampón 10x	1
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,3
dNTPs 10 mM	0,2
Partidor Fw 100 mM	0,2
Partidor Rv 100 mM	0,2
Taq DNA polimerasa	0,1
Volumen total	10

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con bromuro de etidio, donde se corrieron junto a un marcador de peso molecular de 1 Kb. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador UV.

### 2.3. Secuenciación de la construcción

Una vez purificado el DNA plasmidial, se envió junto a los partidores respectivos (Tabla 5) y se enviaron a Macrogen (Seúl, Korea) para su secuenciación. La información obtenida se analizó con el programa SnapGene.

### 2.4. Mapeo construcción

Una vez que se envían a inyectar los constructos generados en el laboratorio, se obtienen distintas líneas en diferentes cromosomas (X, II o III), por lo que se requiere un mapeo para identificar en qué cromosoma se insertó dicho constructo. Este mapeo se realiza para cada línea generada por la empresa y consiste en cruzar machos de la línea transgénica de interés con hembras vírgenes con el genotipo *if/Cyo*; MKRS/TM6b. Luego de analizar la descendencia uno puede determinar en qué cromosoma se produjo la inserción del transgen de nuestro interés. Si sólo las hembras presentan los ojos coloreados, entonces la inserción está en el cromosoma X. Si machos y hembras poseen ojos coloreados, entonces se debe discernir si la inserción ocurrió en el cromosoma II o III. Si el transgen está en el cromosoma II, entonces se observan adultos homocigotos para el color de ojos más uno de los balanceadores del cromosoma III y sin balanceador

en el cromosoma II. De manera análoga ocurre si la inserción ocurrió en el cromosoma

III.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
Frag intermedio F	ATC AGC CCT CAC GGA GTC GGA T
Frag intermedio R	AAA TCA CCG GCC CTG TCG AGC T
pEpldo F1	CAC CAT GGA CCG CTT CAG CTT CGA CG
pEpldo R1	TTT GGA GTT GCT CTG CAG GGC
Pldoex5 frag inic F	ATC CTC ATC AAG TTC TGT TTG CCC G
Pldoex5 frag inic R	GGT CAA GAA TCT TTA GAT GCC AGG C
pldo exo S frag int F	ATC AGC CCT CAC GGA GTC GGA T
pldo exo S frag int R	AAA TCA CGG CCC TGT CGA GCT
pldo exo 5s 1F	TAC TAC TCG AGT AAC CCG CCT GTG A
pldo exo 5s 1R	GTT GTG CAG ACC GAG GGC ATA C
pldo exo 5s 2F	AAT GTG CTG ACC AAG GCC GG
pldo exo 5s 2R	ATA GCA CCT CCG GAT AGA CGC C
pldo exo 5s 3F	GCA AAG CGA TCT GAT GCT GGA G
pldo exo 5s 3R	TGC TGT TGC TGC GGA TTC GG
seq pldo cod 15 F	ACA ACT ACT GTC CAC CTG GAC
seq pldo cod 17 F	CTG ACG CCG GTG CCC AG
seq pldo cod 18 R	TAG GCA ATA GAG CCT CTC CTC
seq pldo cod 19 F	TGG GAT CCG CGG A
seq pldo cod 21 F	GCC TGT GAG GAC G
seq pldo cod 25 F	CAA CAG GCA GTG CAG C
seq pldo cod 26 R	CAC TCC AAC GCC GAC TCC

seq pldo cod 28 R	TGA TGG ATG CAT TGG ATG TAC C
Pldo 3F 2	TCG TCA TAG TTT TGC CAT TGG TTG C
Pldo 4 R2	AAG GTG ACG GCC ACA TTG AAA TAG G
Pldo 15 F2	AGT GCC AGC AGC GAG GGA TTC T
Pldo 16 R2	ATG CGC GGA TGA GGT GCA AG
Pldo 25 F2	CGG CGT CTA TCC GGA GGT GCT ATT
Pldo 26 R2	TGC TGG CGC ATT GGC ATC AC
Pldo 29 F	GTC CGT TCG TGC TGC ATG ACG T
Pldo 30 R	TTG CAC TCA GCT GTG GCC GAT GTC
pldo exo 6F	ACC CAC CCA GCT GCG ATA TCT G
pldo Exo 6R	GAT AGT GGG CGG ACT CAA TGG C
Nvo 1 F	CAT CCG CTT CGA GGA AGA CT
Nvo 1 R	CGG ATA CAC GTG CTC AAC CA
Nvo 2 F	TAC TCG CCG TTC ACT TGC TT
Nvo 2 R	AAC CTC TGC TTG AAG GCT CC
Nvo 3 F	GGT GGA AAC AGT CGA CCA CA
Nvo 3 R	TGT ACC GGC TTT CCT TGC TT
Nvo 4 F	TGA GCG CCC TCA TTG AGT C
Nvo 4 R	GTT GGA ATT GGG CCT GTG GA
Nvo 5 F	TTC GAT GCA GTG TCG CAT CA
Nvo 5 R	CCT GGT TGA ACT CGT CGC TA

**Tabla 5:** Lista de partidores usados para secuenciación.

## 2.5. Transformación bacterias y medios de cultivo

A 30  $\mu\text{L}$  de bacterias quimiocompetentes se agregó 0,2 a 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial. Se incubó 20 minutos en hielo y luego se realizó un *shock* térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias se recuperaron en medio LB a 37°C por una hora, con agitación a 200 rpm. Luego, se centrifugaron y plaquearon con antibióticos apropiados (Ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron por 12 a 16 horas a 37°C, en forma aeróbica.

## 2.6. Extracción DNA plasmidial

Se utilizó el sistema comercial E.Z.N.A. Plasmid Miniprep, siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes. En breve, se centrifugó el cultivo de bacterias y se resuspendió en 250  $\mu\text{L}$  de solución I, que contiene RNAsa A. Luego, se añadió la solución de lisis y de neutralización. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos. Finalmente, el lisado se transfirió a una columna de purificación, desde donde se eluyó el DNA plasmidial con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de nucleasas. Se cuantificó y guardó a -20°C.

## 2.7. Transcripción *in vitro* (generación de dsRNA)

- Mezclar: 2  $\mu\text{L}$  ATP + 2  $\mu\text{L}$  CTP + 2  $\mu\text{L}$  GTP + 2  $\mu\text{L}$  UTP + 2  $\mu\text{L}$  *buffer* 10x + 2  $\mu\text{L}$  mix enzima + 5  $\mu\text{L}$  DNA (producto PCR) + 3  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O
- Incubar a 37°C por 2 a 4 horas

- Purificar RNA, mediante precipitación con LiCl: Agregar 30  $\mu\text{L}$  de LiCl, mezclar y enfriar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, centrifugar a máxima velocidad a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, remover sobrenadante, lavar precipitado con etanol 70%, centrifugar nuevamente, remover etanol, resuspender en agua libre de nucleasas, cuantificar y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Se prepararon dsRNA contra Jitterbug, Relich, Diap, Pelado, Scar y Chascon.

### 3. Protocolos experimentales para *D. melanogaster*

#### 3.1. Inmunoprecipitación de extractos proteicos

Este protocolo se realizó a partir de los extractos de proteínas obtenidos a partir de la transfección de las células S2R+. Luego de las 48 horas post-transfección, se lisaron las células con 500  $\mu\text{L}$  de *buffer* de lisis. Primero se agrega el 10% del volumen, y luego el resto. Incubar en hielo por 5 minutos, mezclando periódicamente. Centrifugar a 13000 g por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Transferir sobrenadante a un tubo nuevo. Cuantificar proteínas, mediante el método de Bradford y utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. Se utilizaron entre 500 y 1000  $\mu\text{g}$  de proteínas, a las que se agregan 2 a 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpo. Luego, se diluyen las muestras de proteínas más el anticuerpo con *buffer* de lisis hasta 500  $\mu\text{L}$ . Incubar toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación constante.



Al día siguiente, lavar *beads* magnéticas: 25  $\mu$ L *beads* a un tubo de 1.5 mL y agregar 175  $\mu$ L de *buffer* de lisis. Realizar vórtex suave. Colectar *beads* y remover y descartar sobrenadante. Agregar 1 mL de *buffer* de lisis, invertir varias veces por 1 minuto o hacer vórtex suave. Colectar *beads*, remover y descartar sobrenadante. El último lavado se debe realizar con *buffer* de lisis más inhibidores de proteasas.

Agregar muestras incubadas la noche previa a las *beads* magnéticas ya lavadas. Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Colectar *beads*, remover sobrenadante y guardar (S1, sólo se evalúa si la IP no funciona). Agregar 500  $\mu$ L de *buffer* de lisis más inhibidores de proteínas y mezclar suavemente. Colectar *beads* y descartar sobrenadante. Repetir dos veces más el lavado. Agregar 500  $\mu$ L de agua ultra pura y mezclar suave. Colectar *beads* y descartar sobrenadante. Agregar 100  $\mu$ L de *buffer* de elución. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación constante. Colectar *beads* y guardar sobrenadante. Agregar 10  $\mu$ L de *buffer* de neutralización por 100  $\mu$ L de eluido.

Preparar *buffer* de carga. Mezclar 12.5  $\mu$ L de *buffer* de carga + 37.5  $\mu$ L de proteínas.

Cargar 25  $\mu$ L en WB.

Los anticuerpos utilizados son comerciales. En el caso de las inmunoprecipitaciones de Pelado, se utilizará el tag HA al que están unidas las distintas versiones de la proteína Pelado a analizar.

Vectores utilizados para la transfección: Cdc12 Gal4; pUASt Pldo-HA; pUASt HA-Pldo; pUASt Jitterbug-HA; pUASt HA-Pldo DeltaC.

### 3.2. Análisis de extractos proteicos mediante inmunoblot

Una vez obtenidas las proteínas y cuantificadas, o realizada la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron por 5 minutos a 95°C, luego se mantuvieron en hielo hasta ser cargadas en el gel. Se prepararon geles SDS-PAGE con concentraciones de poliacrilamida al 8 a 12%. El gel, con las muestras y estándar de peso molecular, fue sometido a electroforesis. Luego, se realizó la transferencia a 400 mA durante 2 horas utilizando membranas de nitrocelulosa. Luego, se lavaron las membranas con PBT 0,1%, 3 veces de 10 minutos cada una. Se bloquearon con leche al 5% por una hora, a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo de interés toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó con PBT 0,1%, 3 veces de 10 minutos cada vez y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (HRP anti rabbit o anti mouse) por 2 a 3 horas. Finalmente, se lavó con PBT 0,1%, 5 veces de 5 minutos cada vez y se reveló con ECL.

### 3.3. Cuantificación bandas gel de poliacrilamida, utilizando ImageJ

- Dejar imagen en escala de grises (8 bit)
- Dibujar rectángulo alrededor de banda de interés
- Utilizar el mismo rectángulo para las siguientes bandas
- Hacer gráfico de cada banda

- Dibujar línea desde la base del peak
- Destacar cada peak, aparecen las medidas
- Análisis: Muestra / Control, para cada banda

#### 3.4. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

La inmunofluorescencia se realizó de acuerdo a protocolos previamente estandarizados en el laboratorio. En resumen, las muestras son fijadas con PFA al 4%, lavadas y permeabilizadas con PBT 0,1%, bloqueadas con BSA al 1% en PBS. Luego se incuban con anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavan nuevamente y luego se incuban con el anticuerpo secundario 1:200, más faloidina 1:100 por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se agrega DAPI los últimos 15 minutos, se lavan 3 veces por 10 o 15 minutos cada una. Se montan en portaobjetos en vectashield, para proteger las muestras. Las imágenes fueron adquiridas con el Microscopio Confocal en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Carl Zeiss LSM 510 y LSM 710). Posteriormente, las imágenes se analizaron utilizando ImageJ y Adobe Photoshop.

#### 3.5. Obtención de hemocitos larvarios

Los hemocitos se extraen a partir de larvas de tercer estadio y se procede como sigue:

- Lavar larvas. En una placa plástica se pasan por agua destilada, luego 2 veces por PBS, una vez por etanol 70% (30 segundos) y nuevamente por PBS.

- Cubrir portaobjetos con Parafilm y poner 3 cubreobjetos estériles. En cada cubreobjeto agregar 120  $\mu$ L de medio Schneider.
- Poner 3 a 5 larvas por cubreobjeto y pinchar larvas en la parte posterior, bajo la lupa con una fibra de tungsteno. Precaución de no sacar cuerpo graso. Después de unos minutos, retirar las larvas
- Dejar incubando por 1 hora y 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Pasar cada uno de los cubreobjetos a una placa de 24 pocillos. Primero sacar el líquido, en este punto los hemocitos ya debieran estar adheridos.
- Comenzar inmunofluorescencia, si corresponde.

#### IF hemocitos

Fijar células con 300  $\mu$ L de PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con 500  $\mu$ L de PBS por 5 minutos, a temperatura ambiente.

Permeabilizar con 400  $\mu$ L de PBT 0.1% por 10 minutos, a temperatura ambiente.

Lavar con 2 mL de PBS por 10 minutos, a temperatura ambiente.

Bloquear al menos 1 hora con BSA 1% en PBS, temperatura ambiente.

Incubar con anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo, toda la noche a 4°C.

Lavar 3 veces con PBS, 5 minutos cada vez, a temperatura ambiente.

Incubar con anticuerpo secundario 1:200 más faloidina 1:100, 2 horas a temperatura en solución de bloqueo.

Opcional: Agregar DAPI o TOPRO los últimos 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavar 3 veces con PBS, 15 minutos cada vez, a temperatura ambiente.

Montar con vectashield, sellar con esmalte de uñas y guardar a 4°C.

### 3.6. Inmunofluorescencia alas pupales

- Datación pupas: Primero se seleccionan pupas blancas, que corresponderá al tiempo cero y luego se cuentan las horas posteriores a la formación de la pupa. Esto dependerá de la temperatura a la que se están creciendo dichos animales. Una vez que la pupa ha cumplido las horas deseadas para su análisis, se procede a fijar la pupa.
- Fijación pupa: Se secan las pupas con papel secante y luego se ubican sobre una cinta de doble contacto y se inmovilizan sobre esta, con la sección ventral hacia arriba. Luego, se abre la pupa por ambos extremos (anterior y posterior), se remueve el opérculo y luego se toma la pupa con la pinza por la cabeza y se deja en PFA 4% toda la noche a 4°C o bien 45 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez fijadas, las pupas se lavan con PBT 0,1% 3 veces de 10 a 15 minutos cada una y finalmente se dejan en PBS a 4°C hasta su disección.

- Una vez disectadas, se realiza la inmunofluorescencia de las alas pupales, de forma análoga a como se describió previamente (3.3).
- Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 disponible en la Facultad de Ciencias. Para analizar los filamentos de Actina se utilizó una tinción con Faloidina, reactivo ampliamente utilizado debido a su alta afinidad con los filamentos de Actina, que los estabiliza y además está conjugado a una molécula fluorescente, Rodamina.

### 3.7. Cuantificación número de pelos/área

Las imágenes fueron adquiridas con el Microscopio de campo claro, conectado a una cámara digital y utilizando el Software Infinity. Posteriormente, las imágenes se analizaron utilizando ImageJ y Adobe Photoshop. Utilizando el *software* ImageJ, se seleccionó un área del ala (en la zona de expresión de los transgenes, zona Patch) y en dicha zona se contó el número de pelos.

## 4. Cultivo celular S2R+

### 4.1. Mantención células S2R+

La línea celular S2R+ corresponde a una línea celular semiadherente proveniente de *Drosophila melanogaster*. El cultivo de estas células se mantiene con el medio Schneider suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Afortunadamente, esta línea celular no requiere de CO<sub>2</sub> para su crecimiento y sólo requiere alrededor de 23 a 25°C.

#### 4.2. Transfección células S2R+

Para transfectar estas células se sembraron 2 millones de células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Esperar aproximadamente 1 hora hasta que se peguen. Para cada condición se utilizan 3 pocillos con la finalidad de obtener la cantidad de proteínas necesaria. La transfección se realiza con el kit effectene y se siguió el siguiente protocolo:

- Mezclar 300  $\mu$ L de Buffer EC más el DNA correspondiente (1  $\mu$ g de cada plasmidio) más 16  $\mu$ L de enhancer
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- Agregar 40  $\mu$ L de effectene
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad
- Agregar 1 mL de medio y mezclar
- Agregar solución a células por goteo
- Dejar expresar por 48 horas, luego *pelletear* células y extraer proteínas

Extracción proteínas:

Células se lavan con PBS y luego se extraen las proteínas utilizando *buffer* de lisis más inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa. Luego se cuantifican.

### Uso de MG132

El stock de MG132 está a 1 mg/mL. La concentración que se utilizó para inhibir el proteasoma en las células S2R+ es 10  $\mu$ M. MG132 se agregó 36 horas después de la transfección y se dejó actuar por 6 horas. Luego se cambia el medio y se extraen las proteínas. Como control se evaluaron los niveles de p53, proteína descrita como regulada mediante degradación por el proteasoma.

Para realizar la inmunofluorescencia de las células transfectadas, previo a sembrar las células los cubreobjetos se tratan con Concanavalina A, para facilitar la adhesión de las células a estos vidrios. Una vez secos, estos vidrios son expuestos a radiación UV en la campana de cultivo para esterilizarlos. En este caso se utilizan placas de 12 pocillos y cubreobjetos redondos de 12mm de diámetro en cada pocillo. Luego de las 48 horas de transfección, se retira el medio y se agrega PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fijadas se lavan 3 veces con PBS, por 10 minutos cada vez. Una vez lavadas, se bloquean por al menos una hora con BSA 1%, y luego se incuban con anticuerpo primario en solución de bloqueo fresca, toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lava tres veces con PBS, por 10 minutos cada vez. Luego, se incuba por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente más faloidina conjugada a rodamina, para marcar los filamentos de Actina, en solución de bloqueo fresca. Los últimos 10 a 15 minutos de incubación con el anticuerpo secundario, se



agrega DAPI para marcar los núcleos. Finalmente, se lavan 3 veces con PBS, por 10 minutos cada vez y cada vidrio se monta con Vectashield.

#### 5. Análisis estadístico

En todos los casos, la mayoría de los análisis estadísticos se realizaron mediante el test ANOVA y post test de Tukey. En un caso excepcional se utilizó el t-test. El test utilizado se detalló en cada cuantificación.

# RESULTADOS

## 1.- Caracterización del fenotipo de pérdida de función de Pelado.

Los animales mutantes homocigotos para *pelado* son inviables, llegando sólo hasta la etapa embrionaria. Para evitar dicha letalidad, lo primero que se hizo fue evaluar el fenotipo de pérdida de función de Pelado, mediante el uso de un RNA interferente. Posteriormente, y con el objetivo de observar y analizar el fenotipo que presentan las células mutantes para *pelado*, se utiliza la técnica MARCM, detallada en la sección metodología.

Para comenzar a analizar la función de este gen en relación a la formación del pelo en *Drosophila melanogaster*, y en base a esto a su regulación sobre el citoesqueleto de Actina, se analizó en qué momento de la formación del tricoma se produce dicha alteración. Como se mencionó previamente, el tricoma comienza a formarse alrededor de las 28 horas después de la formación de la pupa (APF, del inglés After Pupa Formation), en este momento lo que ocurre es una acumulación de Actina en la zona apico-distal de cada una de las células epiteliales. Luego, alrededor de las 32 horas APF comienzan a elongarse los filamentos de Actina constituyendo lo que se denomina como “prehair” (Wong y Adler, 1993). Este proceso continúa hasta aproximadamente las 40 horas APF. En base a estos conocimientos, se quiso evaluar si la alteración generada por

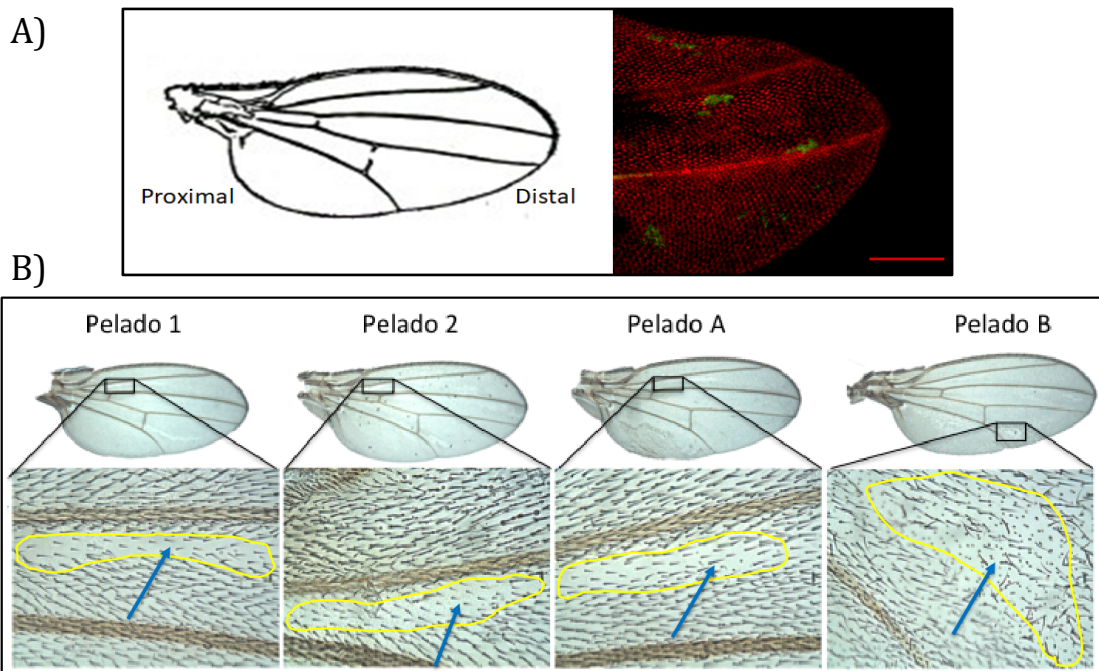
la pérdida de función de Pelado es por una deficiencia para acumular la Actina previa a la formación del pelo o bien a una deficiencia en la capacidad polimerizadora de este componente del citoesqueleto en ese momento en particular.

Para analizar esto, se evaluaron las células epiteliales del ala pupal en distintos tiempos durante su formación: 28, 32 y 36 hrs APF, para así determinar si había una alteración en particular en alguna de las etapas mencionadas.

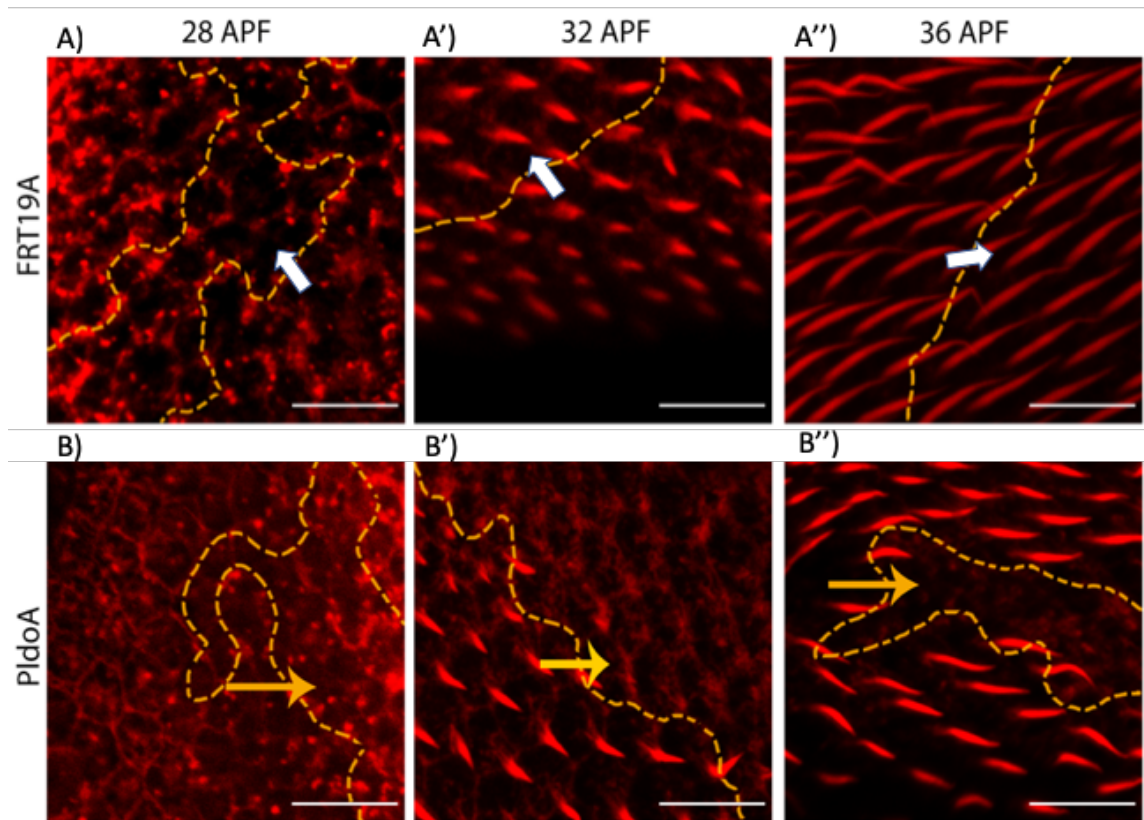
Cabe destacar en este punto, que como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio se había generado (por los Dres. Álvaro Gavic y Patricio Olguín) y mapeado una mosca mutante para *pelado*, pero no se tiene identificada la mutación; por lo mismo, posteriormente se adquirieron dos mutantes para este gen que estaban disponibles comercialmente en Bloomington Drosophila Stock Center con los códigos 52333 y 52334, que corresponden a isoformas PeladoA y Pelado B, respectivamente (Bloomington <https://bdsc.indiana.edu/Home/Search> y Bloomington <https://bdsc.indiana.edu/Home/Search#results>). Entonces, primero se evaluó si las distintas mutantes generaban el mismo fenotipo.

Se generaron moscas mosaico para estas mutantes mediante el uso de la técnica MARCM, la cual consiste, brevemente, en la activación de una flipasa (FLP) que inducirá la recombinación de los cromosomas que contienen los correspondientes sitios de recombinación (FRT19A) y de esta forma se obtienen tejidos mosaicos donde habrán

parches (o grupos de células) que contengan el gen mutante en homocigosis, otras células que posean el gen silvestre en homocigosis y el resto presentará ambos alelos (heterocigosis). Este protocolo está detallado en la sección de Metodología. Se observó que los diferentes mutantes presentan el mismo fenotipo, como se observa en la Figura 12.



**Figura 12.** MARCM *pelado*. A) Esquema de ala de *Drosophila melanogaster* donde se muestra la orientación Proximo-Distal; a la derecha se observa un ala con diversos clones, generados mediante MARCM y en la misma orientación indicada en el esquema. En esta misma orientación se expondrán todas las imágenes de alas en la presente tesis. B) En esta imagen se muestra el fenotipo que presentan sectores de células mutantes para *pelado* en alas adultas. Se utilizaron distintas mutantes del mismo gen y se evaluó el fenotipo de cada una de ellas, como se observa en la imagen, todas presentan un fenotipo similar, de ausencia de tricomas. Pelado 1 y 2 corresponden a la mutante generada en nuestro laboratorio, mientras Pelado A y B corresponden a moscas obtenidas de Bloomington (códigos 52333 y 52334, respectivamente).



**Figura 13:** Caracterización temporal del fenotipo mutante de *pelado*. En esta imagen se muestra la formación del pelo a distintos tiempos, utilizando la tinción con faloidina para observar los filamentos de Actina, durante la formación de los tricomas. A las 28 h APF comienza a acumularse la Actina en la zona apico-distal de cada una de las células (puntos rojos). A las 32 h APF, comienzan a elongarse los filamentos de Actina, a partir de los centros de nucleación previamente establecidos, se constituye el “*prehair*”. A las 36 h APF, el pelo está prácticamente formado. Aquellas células donde se produjo la recombinación están dentro de la zona delimitada por la línea punteada amarilla y en el caso de “*PldoA*”, corresponde a células mutantes para dicho gen (la zona también está indicada con flechas). Las imágenes están orientadas con la zona distal hacia la derecha. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

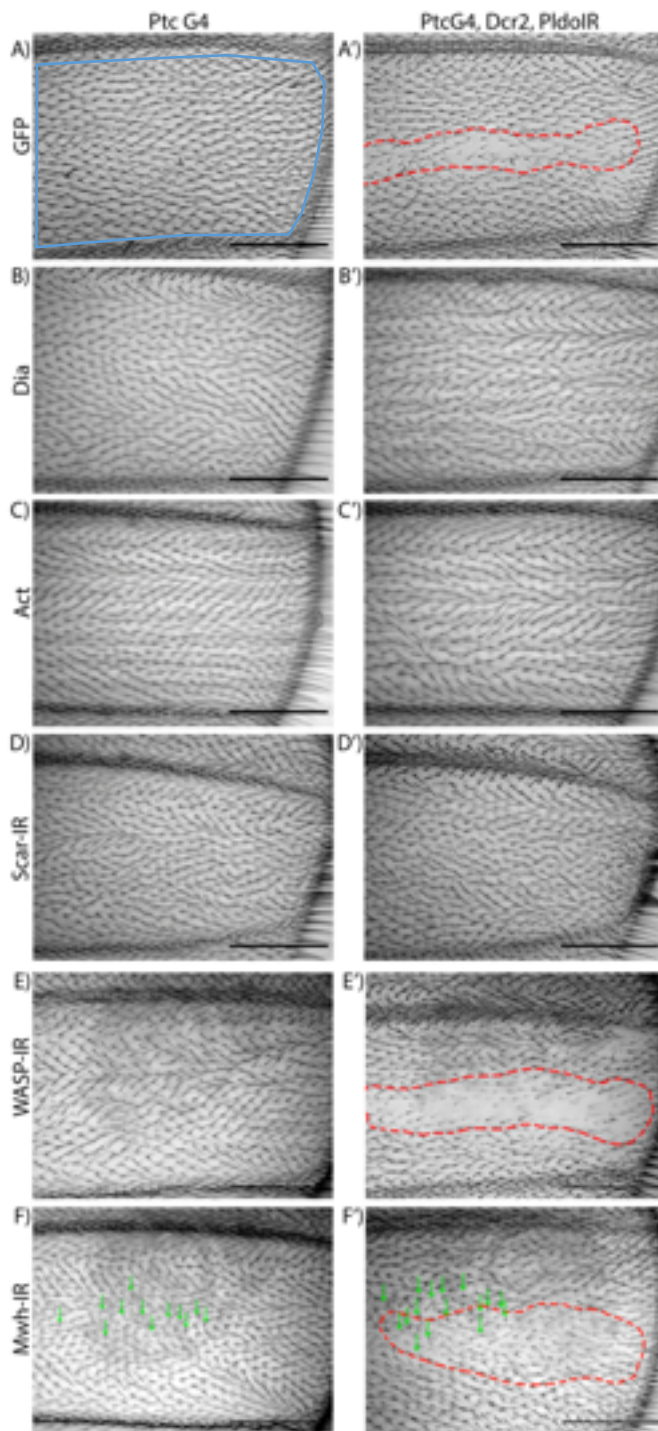
Además, cabe recordar que también se observó que la pérdida de función de Pelado mediante el uso de un RNA interferente generó el mismo fenotipo que las células mutantes para dicho gen. Esto estaría corroborando la identidad del gen y la especificidad del fenotipo observado en las células epiteliales de la mosca.

Como se observa en la Figura 13, en el caso del mutante de *pelado*, a las 28 horas después de la formación de la pupa se observa la acumulación de Actina que posteriormente elongará para constituir el tricoma, la cual es incluso más notorio que en el caso del mutante (Figura 13, A y B). Este fenotipo se observa en 3 de 4 alas analizadas para este mismo tiempo de desarrollo. Sin embargo, a las 32 horas, cuando ya se observa el “*prehair*”, en el caso del control FRT19A, en las células mutantes para *pelado* se observa una ausencia total de dicha estructura (Figura 13 B’). Fenotipo similar se observa posteriormente a las 36 horas APF (Figura 13 B’), momento en que el tricoma estaría prácticamente formado (Figura 13 A’). Esto estaría indicando que habría una alteración principalmente en elongación de los filamentos de Actina, lo que se traduciría posteriormente en la incapacidad de formar el tricoma.

Como se ha descrito previamente, la formación del tricoma depende fundamentalmente de la polimerización lineal de Actina, proceso mediado específicamente por la forma Diaphanous (Lu y Adler, 2015). Además, una alteración en la expresión de diversas proteínas que regulan el citoesqueleto de Actina genera una alteración en la formación de los tricomas, que incluyen la formación de tricomas más cortos, múltiples tricomas

por célula e incluso su ausencia total. Como se vio en los resultados previos, la pérdida de función de Pelado también genera alteraciones en la formación del pelo, que incluso llega al extremo de la ausencia de pelo en algunas de las células afectadas. Es por esto que se evaluó si era posible el fenotipo de pérdida de función de Pelado mediante cambios de la expresión de otras proteínas reguladoras del citoesqueleto de Actina. Para esto, se expresaron los distintos transgenes en la zona Patch del ala (Ptc Gal4), cuya zona de expresión se puede observar en el Anexo 15 y aparece delimitado por una línea celeste continua en la Figura 14 A. Corresponde a la misma zona en todas las alas adultas analizadas que expresan los transgenes analizados en la zona de expresión de Patch.

Como se muestra en la Figura 14, al inducir la ganancia de función de Diaphanous en simultáneo a la pérdida de función de Pelado, se observa la reversión del fenotipo de pérdida de función de Pelado (Figura 14 B', en comparación a A'). La pérdida de función de Scar por sí sola no genera un fenotipo evidente sobre los pelos del ala (Figura 14 D). Sin embargo, al combinar este interferente con la pérdida de función de Pelado en la misma zona se observa que sí se revierte el fenotipo (Figura 14 D'). Cabe destacar también, que al generar la pérdida de función de WASp (proteína que regula la actividad del complejo Arp2/3, al igual que Scar), junto a la pérdida de función de Pelado, no se observó la reversión del fenotipo (Figura 14 E'). Este resultado refuerza el antecedente que WASp y Scar/WAVE tienen distintas funciones dependiendo del contexto celular en que se encuentren (Zallen y cols., 2002).



**Figura 14:** Evaluación de reversión de fenotipo de pérdida de función de Pelado. En la esquina superior derecha se ve la zona de expresión del *driver* Patch Gal4 (Ptc). En la columna izquierda se muestra el fenotipo generado por los distintos transgenes expresados por sí solos (Ptc G4). La zona de expresión de Patch (Ptc) está indicada por una línea celeste continua en el caso del control y es la misma zona para todas las alas analizadas. En la columna de la derecha se muestra el fenotipo generado por la pérdida de función de Pelado, en combinación con los distintos componentes regulatorios analizados (PtcG4, Dcr, PldoIR). Con la línea punteada roja se delimitan los casos en que no hubo reversión del fenotipo,

mientras que el fenotipo de *mwh* está indicado con flechas verdes. Se analizaron al menos 10 individuos en cada caso, n = 3. La barra de tamaño corresponde a 100  $\mu$ m.



Esto estaría indicando que Pelado podría estar participando en una competencia por los monómeros de Actina en las células epiteliales que formarán los pelos o tricomas, donde favorecería la polimerización lineal de Actina, dado que Diaphanous induce la polimerización lineal, mientras Scar/WAVE induce la polimerización ramificada de Actina.

Para poder comparar de manera cuantitativa estos fenotipos, se realizó la cuantificación de número de pelos por área en cada caso; esta cuantificación se realizó para cada sexo y genotipo por separado y no se observaron mayores diferencias entre machos y hembras con los distintos transgenes (Anexos 13 y 14).

Dado que una de las posibilidades para explicar los fenotipos observados es una competencia por los monómeros de Actina, donde Pelado participaría favoreciendo la polimerización lineal (posiblemente mediante la forma Diaphanous), en desmedro de la ramificada (mediante Scar y Arp2/3), entonces se evaluó si aumentando únicamente los niveles de Actina monomérica era posible rescatar el fenotipo observado y efectivamente eso fue lo que ocurrió (Figura 14 C'). Es por esto mismo que el siguiente paso fue evaluar si al reducir parcial y transitoriamente los niveles de Actina en esta zona del ala también se genera una disminución en la formación de tricomas. Sin embargo, no se observó ninguna alteración en la formación de tricomas en dicha condición (Anexo 1). Todas las reversiones hasta aquí mencionadas, también se evaluaron en condiciones de

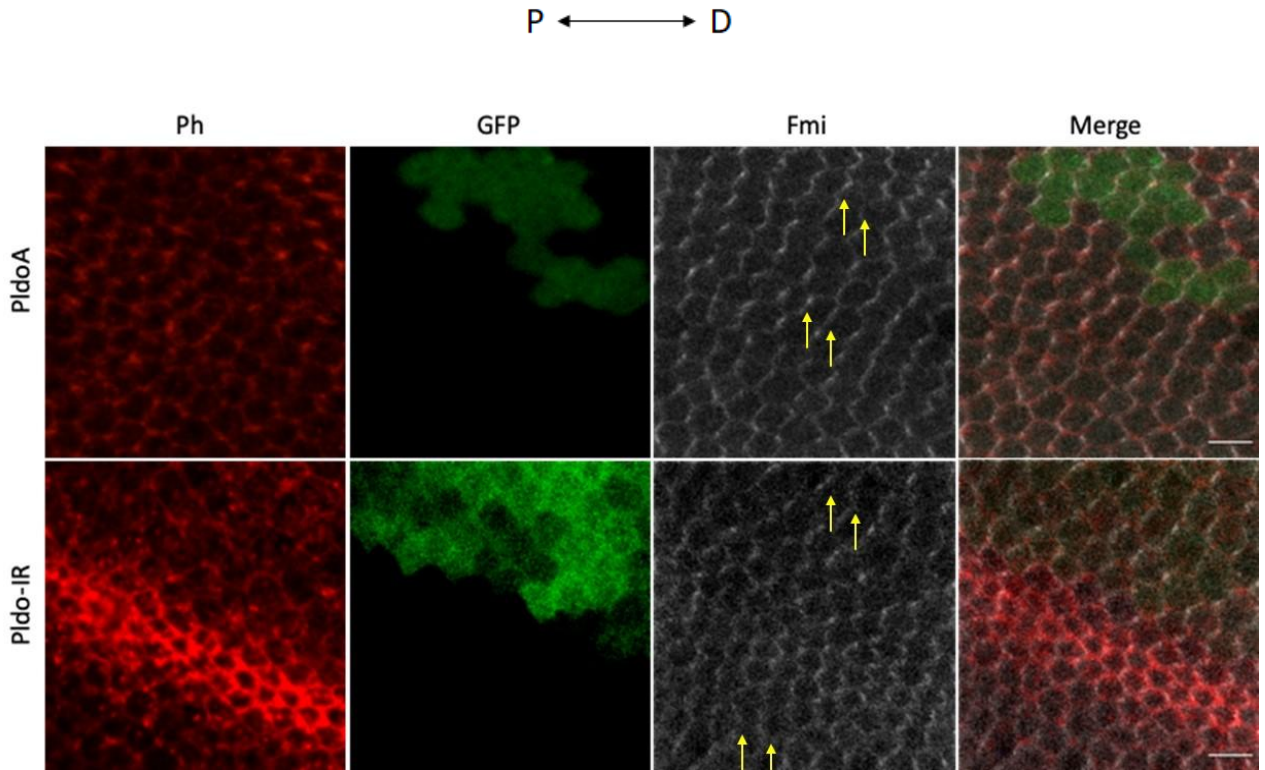
*pelado* mutante (en mosaicos celulares) y también se observó la reversión del fenotipo de ausencia de tricomas, pero de manera parcial (Anexo 10).

Por otro lado, la pérdida de función de *Mwh* en conjunto con la pérdida de función de *Pelado* también revierte el fenotipo de ausencia de tricomas (Figura 14 F'). Sin embargo, en este último caso lo que ocurre es que aparecen pelos donde antes no había, pero dichas células presentan el fenotipo *mwh* (Figura 14 F), que corresponde a la formación de más de un pelo por célula (Yan y cols., 2009).

Entonces, dado que *Mwh* pertenece a la vía PCP, nos preguntamos si la función de *Pelado* estaría ligada a dicha vía y para evaluar esto, evaluamos la localización celular de Flamingo (*Fmi*), proteína que tiene una distribución en las caras proximal y distal del tejido, dado que una posibilidad podría ser que *Pelado* esté regulando la formación del tricoma regulando la localización de *Mwh* en distal.

Como se muestra en la Figura 15, no se observaron diferencias en la localización de *Fmi*, lo que indicaría que *Pelado* no participa directamente en dicha vía, sino que podría estar actuando de forma paralela en el proceso de formación del pelo, o bien río debajo de los mecanismos de determinación de polaridad. Cabe destacar en este punto, que alteraciones de expresión en los distintos componentes conocidos de la vía PCP no generan un fenotipo tan dramático como la ausencia de tricomas, sino que se ve

afectado el número y la polaridad de estos (Strutt y Strutt, 2009; Gao, 2012; Adler, 2012; Carvajal-González y Mlodzik, 2014).

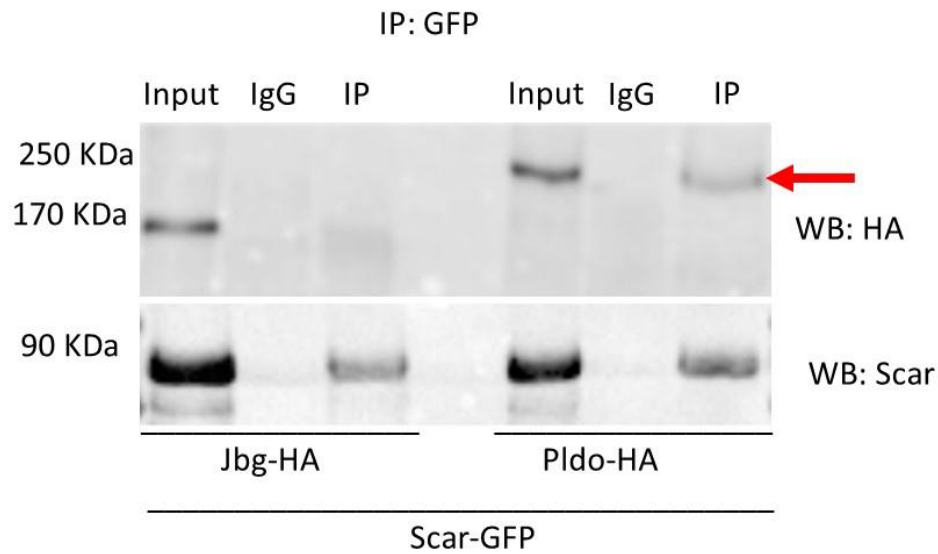


**Figura 15:** Evaluación de la distribución de Flamingo (Fmi) en condiciones de pérdida de función de Pelado. En este análisis se evaluó la localización de Fmi, tanto en condición de *pelado* mutante (células verdes en panel superior), obtenido mediante MARCM, o de pérdida de función (células verdes en panel inferior), en comparación con las células silvestres (no verdes), ver flechas amarillas. La barra de tamaño corresponde a 5  $\mu\text{m}$ .

**2.- Evaluar si la función de Pelado es homóloga a la función descrita para EBAX-1 en *C. elegans*.**

Como en el objetivo anterior se mostró que la pérdida de función de Scar revierte el fenotipo generado por la pérdida de función de Pelado, y también se ha descrito que Scar es degradado por el proteasoma cuando no está formando parte del complejo regulatorio (WRC) (Kunda y cols., 2003). Entonces, si Pelado cumple la misma función descrita en *C. elegans* para su ortólogo, se podría proponer o postular que Scar/WAVE es un blanco de Pelado, al menos en las células epiteliales del ala de *Drosophila* durante el proceso de crecimiento del tricoma. Para verificar si esto es así o no, primero se evaluó si ambas proteínas (Pelado y Scar/WAVE) forman parte del mismo complejo. Esto se realizó transfecando la línea celular S2R+, con ambos constructos (pUAS-Scar-GFP y pUAS-Pelado-HA) más el *driver* Gal 4. Esto permite que dichas células expresen ambas proteínas unidas a un tag para posteriormente inmunoprecipitar con un anticuerpo contra uno de dichos tags. Luego se evaluó, mediante *Western blot*, si ambas proteínas forman parte o no, del mismo complejo.

Como control se utilizó Jitterbug (Jbg), que también interactúa con el citoesqueleto de Actina y posee el mismo tag (HA) que Pelado para así descartar cualquier interacción inespecífica que pudiera alterar la interpretación de los resultados.



**Figura 16:** Evaluación de la posible interacción entre Pelado y Scar mediante inmunoprecipitación. Este ensayo se realizó en células S2R+ y se utilizó la proteína Pelado unida al tag HA y la proteína Scar unida al tag GFP; como control se utilizó la proteína Jitterbug (Jbg) unida al tag HA para así descartar una unión inespecífica de las proteínas analizadas. Se verificó que efectivamente Pelado y Scar forman parte del mismo complejo, lo que se aprecia en el carril IP a la derecha, donde se ve la banda de HA al precipitar con GFP, que no se ve en el caso de Jbg. n = 3.

Se observó que efectivamente Scar y Pelado forman parte del mismo complejo, lo que no ocurre con Jbug (Figura 16).

Como se describió previamente, el ortólogo de *pelado* en *C. elegans* denominado EBAX-1 se ha descrito como la proteína ligasa E3, constituyente de un complejo ubiquitin ligasa, que reconoce los sustratos a ubiquitinar para ser degradados por el proteasoma. En el análisis ya descrito, determinaron que EBAX-1 reconoce principalmente a Robo

como un blanco a ser ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteasoma (Wang y cols., 2013).

Además, los autores reconocieron distintos dominios dentro de esta proteína e identificaron los sitios de unión con los distintos componentes de este complejo. Tales dominios se encuentran conservados en *Drosophila melanogaster*, por lo que es probable que el mecanismo de acción de ambas proteínas pudiera estar conservado. Es por ello que se decidió evaluar si las condiciones de pérdida de función para los componentes disponibles de este complejo ubiquitin ligasa descrito en *C. elegans*, en que estaría participando EBAX-1, fenocopian el evocado por deficiencias en Pelado en el proceso de formación de tricomas en *D. melanogaster*.

Al analizar el efecto producido al silenciar dichas proteínas no se observaron fenotipos evidentes en la formación de tricomas (Figura 17). Sin embargo, en algunos de los casos al combinar las pérdidas de funciones para algunas de las proteínas (Elonginas B y C), junto a la pérdida de función de Pelado no se obtienen individuos adultos, indicando letalidad sintética, lo que sugiere una interacción funcional. Se utilizó más de un RNA interferente en la mayoría de los casos y en ninguno de ellos se observó un fenotipo evidente. Además, también se analizó el efecto de pérdida de función de CG4080, que corresponde a una ligasa E2 descrita como un potencial interactor de Pelado de acuerdo a la base de datos [www.flybase.org](http://www.flybase.org).

El hecho de que no se hayan obtenido individuos adultos en el caso de la combinación de pérdida de función de Pelado y de las Elonginas B y C, se puede deber a que dichas proteínas poseen funciones muy versátiles en la célula (Okumura y cols., 2012; Brower y cols., 1999; Aso y cols., 1996), por lo que su deficiencia, sumada a la deficiencia de Pelado, podría generar la inviabilidad observada. Cabe destacar en este punto, que en los complejos ubiquitin ligasa, la especificidad está dada por la ligasa E3 (Wang y cols., 2013), que sería Pelado en este caso. Esto significa que aunque toda la maquinaria que compone el complejo ubiquitin ligasa esté presente, si la ligasa E3 no está presente o disponible para reconocer el sustrato a ubiquitinar, entonces no se produciría dicha reacción. Además, se ha descrito que es posible que una ligasa E3 pueda unirse a distintos componentes para conformar un complejo ubiquitin ligasa y por ende, ubiquitinar el sustrato reconocido (Stewart y cols., 2016). Esto explicaría porqué la pérdida de función de otros componentes no presentan alteración en la formación del pelo, dado que no son esenciales para dicho proceso.

Si Pelado induce la degradación de Scar/WAVE, y si ninguna de las otras proteínas del complejo es limitante, entonces en condiciones de ganancia de función de Pelado uno esperaría una reducción en los niveles de Scar, dado que su degradación se estaría viendo incrementada bajo dichas condiciones.

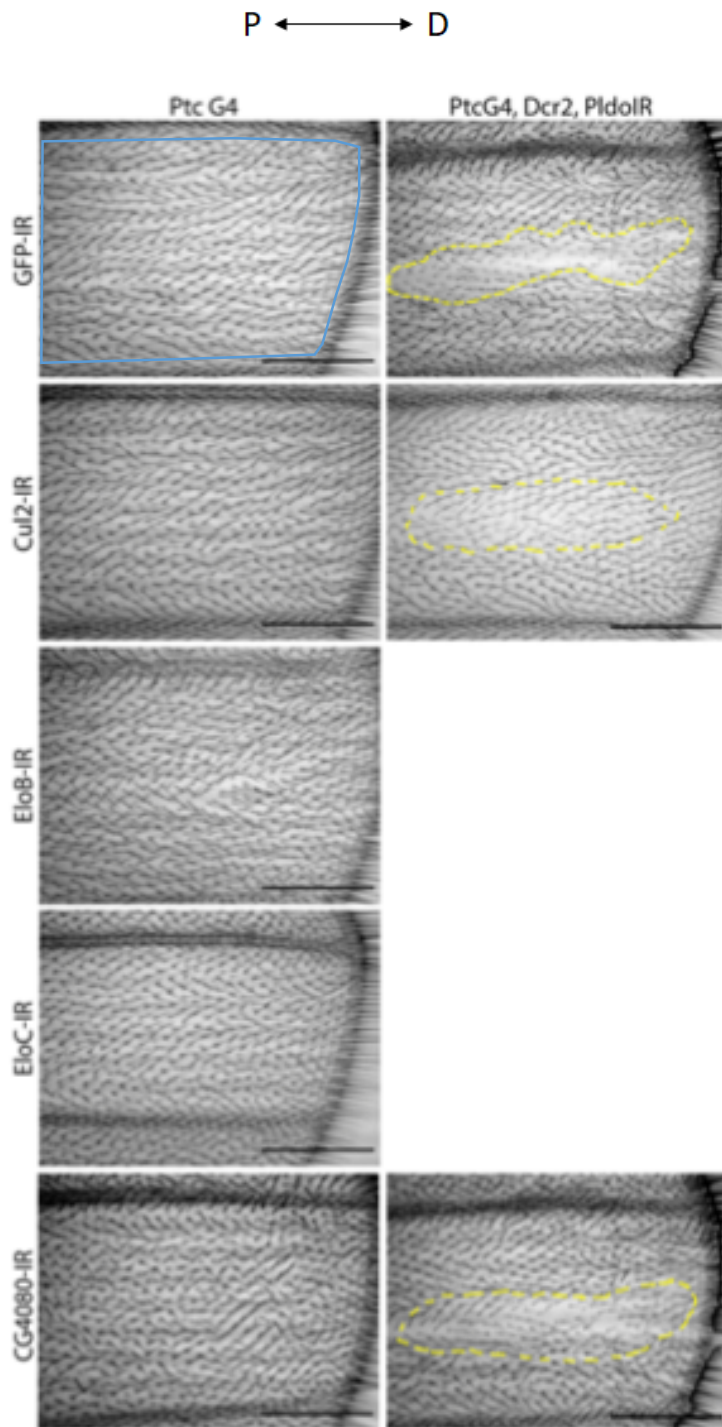
Entonces, para evaluar si efectivamente Pelado es capaz de inducir la degradación de Scar, se analizaron los niveles de Scar en condiciones de ganancia de función de Pelado

en la misma línea celular S2R+ y, nuevamente se utilizó como control, Jbug. Mediante *western blot*, a partir de extractos proteicos obtenidos de dichas células transfectadas para generar la ganancia de función de Pelado, no se observaron cambios significativos en los niveles de Scar en condiciones de ganancia de función de Pelado respecto del control sin tratar o respecto de la ganancia de función de Jbug (Figura 18). Sin embargo, estos resultados pueden deberse a que sólo se están incrementando los niveles de Pelado y no del resto de las proteínas que constituyen el complejo ubiquitin ligasa descrito en *C elegans*, las que podrían ser limitantes.

Debido a esto, evaluamos qué ocurre en condiciones de pérdida de función de Pelado. Para ello primero se evaluó de manera *ex vivo*, utilizando un cultivo primario de hemocitos, donde se obtuvieron, mediante la herramienta MARCM, células mutantes para *pelado* (marcadas en verde) y células heterocigotas silvestres (no marcadas). Si efectivamente Pelado es requerido para degradar a Scar, entonces en aquellas células mutantes que carecen de Pelado se observaría un aumento en los niveles de Scar.

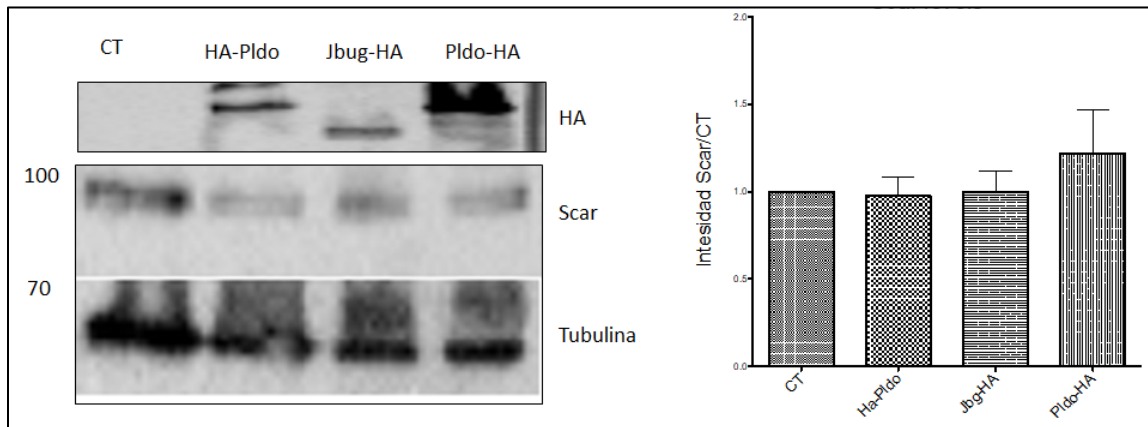
Sin embargo, mediante inmunocitoquímica, se evaluaron los niveles de Scar en ambas condiciones, pero no se observaron alteraciones significativas en los niveles de Scar en las células mutantes respecto de las silvestres (Figura 19). Para confirmar la especificidad del anticuerpo anti-Scar, se evaluó mediante inmunofluorescencia, la señal generada al utilizar un RNA interferente contra dicha proteína (Figura 22).





**Figura 17:** Participación de componentes del complejo ubiquitin ligasa descrito en *C. elegans* en la formación del tricoma de *Drosophila melanogaster*. La zona de expresión de Patch (Ptc) está indicada por una línea celeste continua en el caso del control y es la misma zona para todas las alas analizadas; mientras que el fenotipo se observa dentro de la zona delimitada por una línea punteada amarilla. Se analizó el efecto que presenta la pérdida de función de los ortólogos disponibles para Cullin 2, Elonginas B y C y la ligasa E2 CG4080. No se observó alteración en el fenotipo de pérdida de función de la pérdida de función de los distintos componentes por sí solos, y tampoco en condiciones de pérdida de función de Pelado con la pérdida de función de los distintos componentes analizados. No se obtuvieron individuos adultos en el caso de la pérdida de función de las

Elonginas B y C al combinarlas con la pérdida de función de Pelado. Se analizaron al menos 10 individuos en cada caso, n = 3. La barra de tamaño corresponde a 100 µm.



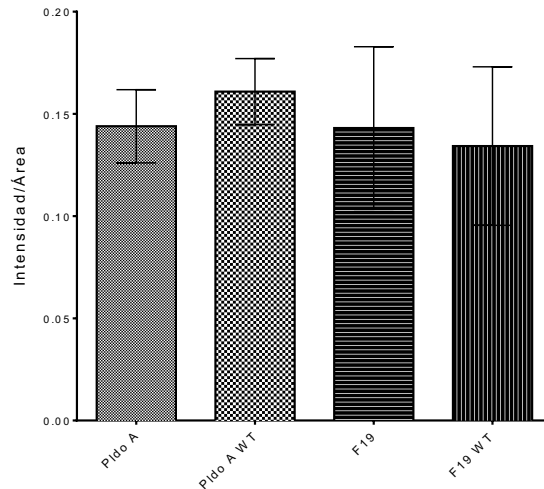
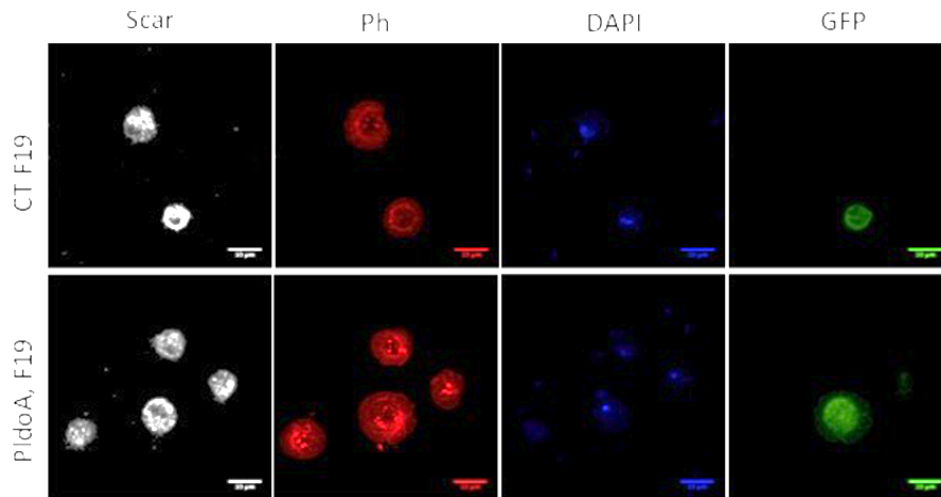
**Figura 18:** Evaluación de los niveles de Scar. Se indujo la expresión de Pelado en la línea celular S2R+ y se evaluaron los niveles de Scar mediante *western blot*. Se utilizaron dos versiones de Pelado, una con el tag HA en el extremo N-terminal, y otra con el tag HA en el extremo C-terminal, para así descartar una alteración en la funcionalidad de alguna de estas versiones, debido a la presencia del tag. Nuevamente, se utilizó como control la expresión de Jbg y células sin transfectar. Cuantificación realizada mediante Test ANOVA y Tukey's post test, n = 3.

El análisis descrito se realizó en primera instancia en hemocitos debido a la relativamente rápida y sencilla manipulación y obtención de este tipo celular. Sin embargo, este no es el mejor modelo de estudio, dado que en este tipo celular no se forman tricomas, por lo que no se puede correlacionar ambos fenotipos directamente, considerando también que no podemos asegurar que los componentes que participan en la formación del tricoma también están presentes en este tipo celular y que por ende, estarían participando en el proceso de regulación de los niveles de Scar. Es por esto que también

se evaluó en los discos imaginales de ala, para determinar si habría algún cambio en dicho contexto, donde tampoco se observaron diferencias en los niveles de Scar (Anexo 3).

Por otro lado, también se debe considerar que Pelado podría tener una función especial específicamente en las células epiteliales de la epidermis durante el proceso de formación del pelo o tricoma, y regular los niveles de Scar, pero de manera localizada en la zona apico-distal de las células del ala, que es donde se requeriría el aumento de polimerización lineal de Actina para permitir la formación del tricoma, por lo que se evaluó los niveles de Scar, mediante inmunofluorescencia, en alas pupales durante la formación del tricoma. Nuevamente, no observamos cambios significativos en los niveles de Scar al modificar los niveles de Pelado (Figura 20).

Respecto de los resultados obtenidos hasta aquí, vimos que en el ensayo de inmunoprecipitación Pelado y Scar forman parte de un mismo complejo molecular, lo que favorece la posibilidad que Pelado tenga la misma función que en *C. elegans*. Sin embargo, no se observaron alteraciones en los niveles de Scar, al alterar de distintas formas los niveles de Pelado (ganancia o pérdida de función). Entonces, una alternativa para explicar dichas observaciones sería que Pelado podría estar inhibiendo la actividad de Scar en lugar de regular sus niveles, lo que explicaría su potencial interacción y el efecto observado en los tricomas del ala de la mosca.

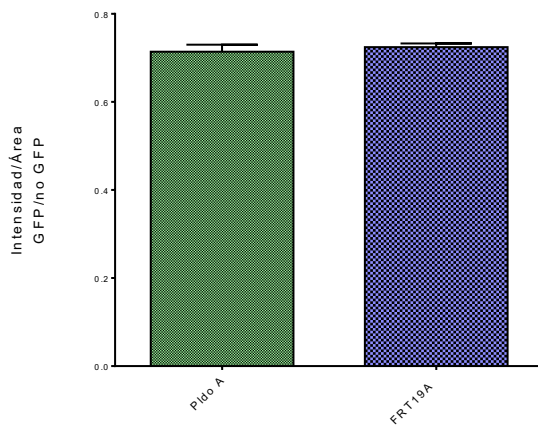
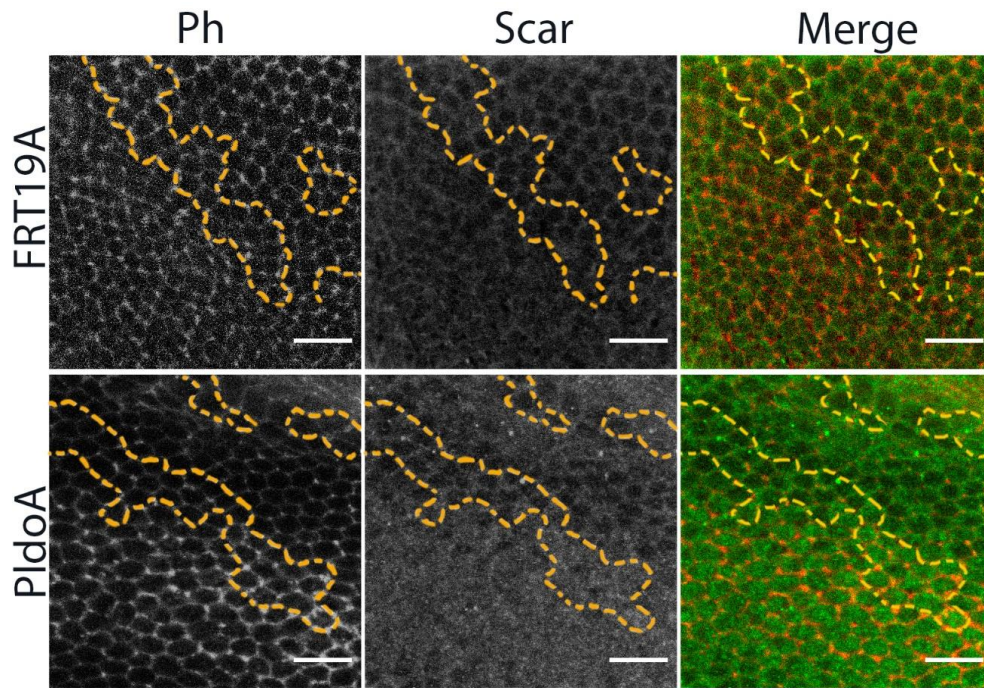


**Figura 19.** Evaluación de los niveles de Scar en hemocitos mutantes para *pelado*. Se analizaron los niveles de Scar en células mutantes para *pelado* (verdes) y se compararon con las células vecinas silvestres (no GFP). Como control, se utilizó el FRT19A para hacer la recombinación. En gris está la marca de Scar, en rojo la marca de faloidina (filamentos de Actina) y en azul se marcan los núcleos con DAPI (DNA). Para la cuantificación se consideraron al menos 25 células por fenotipo, obtenidos de 27 larvas distintas y se midió la intensidad de fluorescencia y el área celular en cada caso. Estas fotografías se tomaron con un aumento de 63x y se realizó un zoom computacional de 2x. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Cuantificación realizada mediante Test ANOVA y Tukey's post test,  $n = 3$ .

Ahora bien, como en los resultados obtenidos en el Objetivo 1, se vio que la pérdida de función de Scar, de manera simultánea a la pérdida de función de Pelado, hubo una reversión del fenotipo previamente caracterizado. Entonces, a partir de dicha observación, nos preguntamos si la ganancia de función de Scar tendría un fenotipo análogo al generado por la pérdida de función de Pelado. Esto, dado que, aparentemente, Scar y Pelado participarían en la regulación de la polimerización de Actina, pero mientras Scar induce la polimerización ramificada, Pelado induciría la polimerización lineal. Basándonos en el fenómeno de competencia por los monómeros de Actina (Burke y cols., 2014; Heson y cols., 2014; Suarez y cols., 2015; Suarez y Kovar, 2016), evaluamos entonces la morfología de los pelos en condiciones de ganancia de función de Scar.

Si Scar y Pelado están en la misma vía, donde Pelado estaría río arriba de Scar, se esperaba que una ganancia de función de esta proteína podría inducir un fenotipo similar al fenotipo *pelado*. Sin embargo, cuando se analizaron estas opciones, no se observó la epistasis esperada (Figura 21), así la ganancia de función de Scar no indujo el fenotipo característico del silenciamiento de Pelado. Cabe destacar que también se utilizó una versión miristoilada de Scar, lo que mantiene a esta proteína unida a la membrana celular (Bogdan y cols., 2011), por lo que se mantendría activa de manera constitutiva y en esta condición tampoco se observó el fenotipo de ausencia de tricomas.

Entonces, la ganancia de función de Scar no es capaz de fenocopiar lo observado con la pérdida de función de Pelado, pero al utilizar la ganancia de función de una versión miristoilada de Scar, se observa una disminución en el número de pelos por área, manteniéndose algunas áreas del ala sin pelos. Sin embargo, el fenotipo no es exactamente el mismo al producido con la pérdida de función de Pelado. Esto último podría deberse a que se pierde la regulación o la dinámica del citoesqueleto de Actina en la cercanía de la membrana plasmática, que es donde se forman los tricomas y, al mismo tiempo, se estaría incrementando la competencia por los monómeros de Actina en dicha zona, donde es esencial que se vea favorecida la polimerización lineal de Actina, para así permitir la formación del tricoma. Además, se ha descrito que Scar es una proteína que también participa en el proceso de citoquinesis (King y cols., 2010) y esta activación constitutiva podría inducir defectos en dicho proceso, generándose así células más grandes, lo que explicaría la disminución de pelos por área, debido a que también habrían menos células por área, debido al problema de división celular ya mencionado.

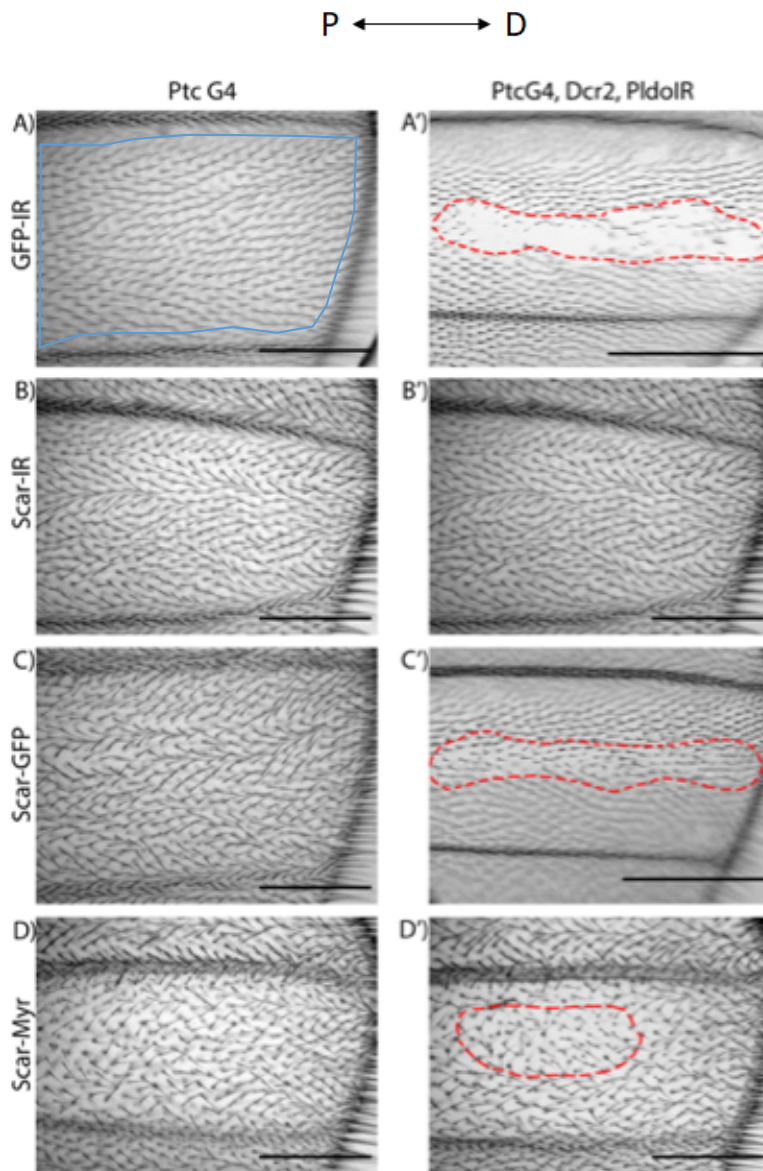


**Figura 20.** Evaluación de los niveles de Scar en células del ala pupal en condiciones de *pelado* mutante. Los niveles de Scar en el ala pupal se evaluaron durante el periodo de formación de tricomas, mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se compararon las células

mutantes para *pelado* (delineadas por línea punteada amarilla) con aquellas silvestre (fuera de dicha zona). La cuantificación se realizó en cada uno de los cortes ópticos fotográficos, donde se seleccionó el área correspondiente al clon y se cuantificó un área similar en el tejido heterocigoto.

Para cada n se consideraron al menos 5 clones, n = 3. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m.

El análisis estadístico utilizado fue t test, P < 0,0001.



**Figura 21:** Evaluación de la participación de Scar en la formación del pelo. Se evaluó la posible epistasis entre Scar y Pelado. En la imagen se presentan los fenotipos generados por la ganancia y pérdida de función de Scar, por sí solos en la zona de expresión de *patch* (columna izquierda, Ptc G4) o en combinación con el interferente de Pelado en la misma zona (columna derecha, PtcG4, Dcr2, PldoIR). La zona de expresión de Patch (Ptc) está indicada por una

línea celeste continua en el caso del control y es la misma zona para todas las alas analizadas; mientras que el fenotipo se observa dentro de la zona delimitada por una línea punteada roja. Se observa claramente que sólo la pérdida de función de Scar es capaz de revertir el fenotipo de pérdida de función de Pelado. Sin embargo la ganancia de función de Scar no induce el mismo fenotipo que la pérdida de función de Pelado. Las fotos fueron tomadas con un aumento de 40x. La barra de tamaño corresponde a 100  $\mu$ m. Se analizaron al menos 10 individuos en cada caso, n = 3.



En resumen, y considerando las explicaciones alternativas antes descritas, es posible proponer que la pérdida de función de Scar es capaz de revertir el fenotipo de ausencia de tricomas generado por la pérdida de función de Pelado debido a que en este caso habría una menor competencia por los monómeros de Actina. Así, al reducir los niveles de Scar habría menor actividad del complejo Arp2/3 y mayor disponibilidad de monómeros de Actina, favoreciendo de esta forma la polimerización lineal.

**3.- Analizar el efecto de la ganancia o pérdida de función de Pelado en células del sistema inmune de *Drosophila melanogaster* y así determinar si su efecto sobre el citoesqueleto de Actina es tipo celular específico.**

Como se ha mencionado previamente, el citoesqueleto de Actina es uno de los componentes claves que regulan y mantienen la forma de las células en general, tanto de las que forman parte de una estructura organizada como epitelios, como también de células aisladas, como por ejemplo de las que forman parte del sistema circulatorio. Así, se evaluaron los hemocitos, células que forman parte del sistema inmune de *D. melanogaster*. Esto, dado que son un tipo celular que no está “atrapado” en un epitelio, entonces se podría observar de manera más evidente cuál podría ser el efecto de Pelado en este contexto celular. Se esperaba una alteración notoria fenotípicamente si es que Pelado efectivamente regula el citoesqueleto de Actina, esto dado que como se ha

descrito ampliamente, de este componente del citoesqueleto depende la formación de diversas estructuras celulares como filopodios y lamelipodios en este y otros tipos celulares (Zanet y cols., 2012; Suárez y Kovar, 2016; Clainche y Carlier, 2008). La formación de dichas estructuras también requiere de distintos tipos de polimerización de Actina (lineal o ramificada), lo que también nos permitiría discriminar si Pelado favorece o no uno de ellos. Entonces, si Pelado efectivamente induce o favorece la polimerización lineal de Actina, deberíamos observar un aumento en la formación de filopodios.

Primero se utilizó la línea celular S2R+, las cuales fueron transfectadas para generar la ganancia de función de diversos transgenes. Después de 48 horas de la transfección, las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia para evaluar la morfología celular. Por otro lado, estas células también fueron sometidas a la acción de RNA interferentes contra los mensajeros de interés, pero en este caso la incubación se realizó por 4 días (Bogdan y cols., 2005 ).

Se observó que aquellas células que fueron transfectadas con pUAS<sub>t</sub> Pelado HA presentan un mayor porcentaje de células con más de 3 protrusiones, de manera análoga a lo observado con la disminución de Scar mediante dsRNA que es justamente el resultado esperado en este punto (Anexo 2). De hecho, este es el tipo de fenotipo previamente descrito para la pérdida de función de Scar (Bogdan y cols., 2005; Kunda y cols., 2003). Como se describió en los resultados presentados en el Objetivo 1, la pérdida

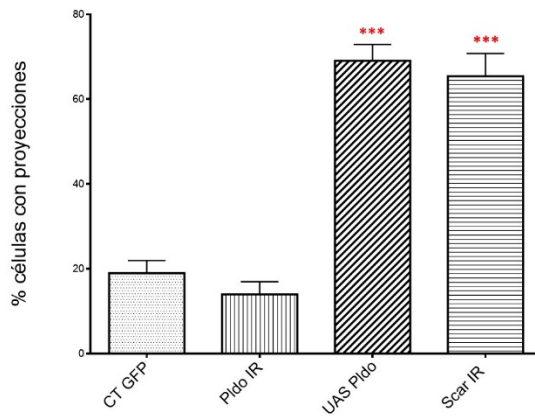
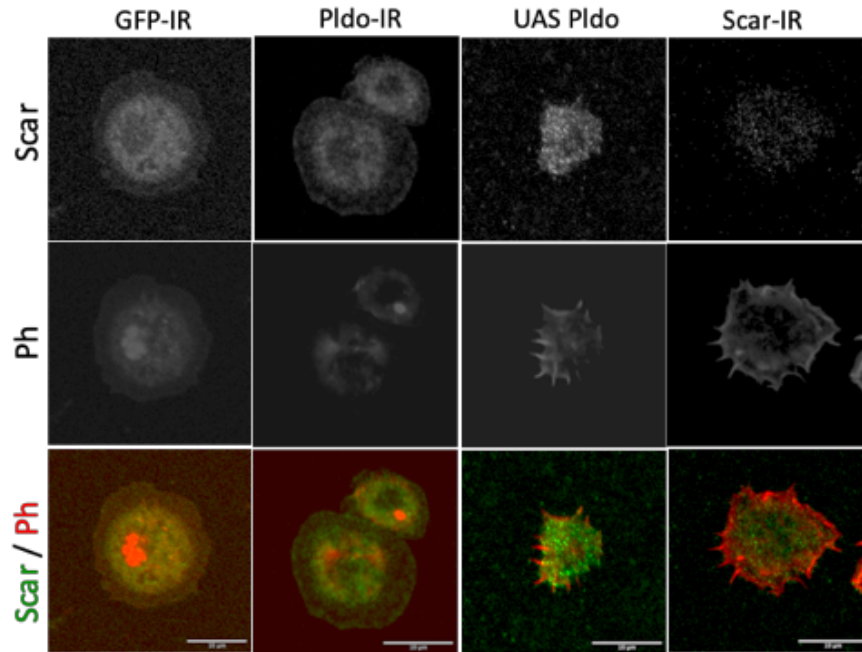
de función de Pelado es rescatada con la pérdida de función de Scar indicando que estas proteínas tendrían roles opuestos en la regulación de la dinámica de Actina. De manera análoga, al disminuir Pelado y aumentar Scar de manera simultánea, no se observan fenotipos evidentes en la morfología de esta línea celular (Anexo 2).

Dado que fue difícil determinar efectivamente cuáles eran las células transfectadas o afectadas con el RNA de interferencia debido a la ausencia de un anticuerpo contra Pelado, y a que el anticuerpo anti-HA no funcionó de la mejor manera, se decidió realizar este ensayo utilizando hemocitos, que corresponden al componente celular del sistema inmune de *Drosophila melanogaster*, análogos a nuestros macrófagos.

En este caso, lo que se realizó fue inducir la expresión de los distintos transgenes de interés exclusivamente en los hemocitos mediante el *driver* Hml-Gal4. Luego de hacer la cruce para generar la ganancia y/o pérdida de función de los genes a analizar en estas células, se esperó que los descendientes de la cruce (F1) llegasen al estadio de larva 3, momento en que se toman aproximadamente 9 a 12 larvas por genotipo y se pinchan con una fibra de tungsteno en la parte posterior. Esto permite que la hemolinfa, y en consecuencia los hemocitos sean liberados al medio.

Con los resultados obtenidos a partir de cultivos primarios de hemocitos (Figura 22), se corrobora lo observado en las células S2R+, donde la ganancia de función de Pelado

genera un aumento en el porcentaje de células con más de tres protrusiones, asimismo la pérdida de función de Scar genera un fenotipo comparable.



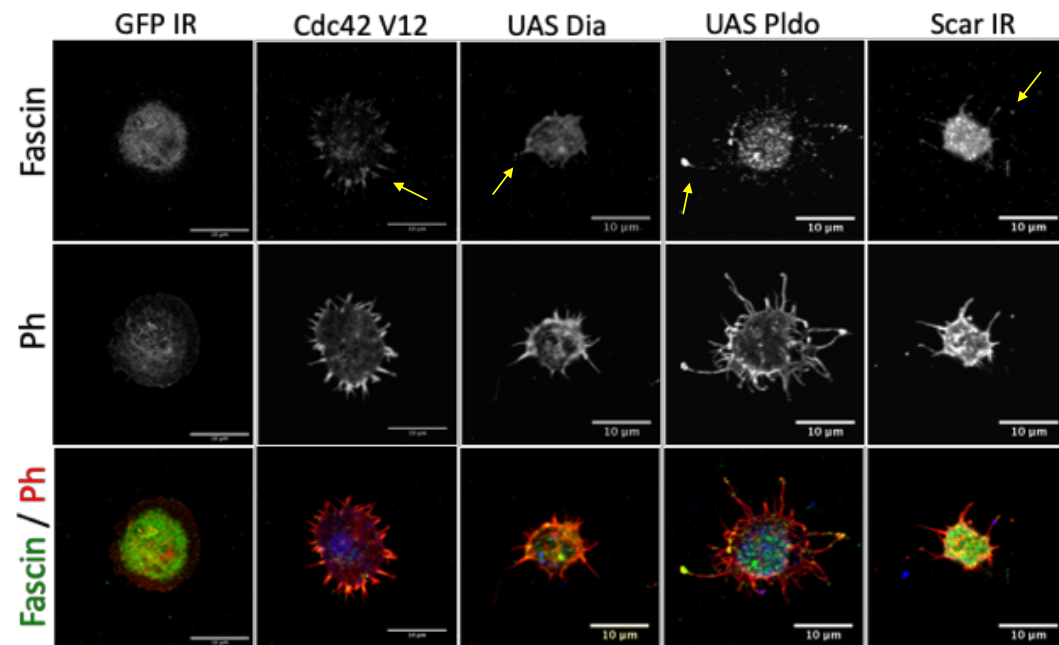
**Figura 22:** Evaluación de la morfología celular en distintas condiciones genéticas en hemocitos. Se indujo la expresión de distintos transgenes utilizando el *driver* HmlG4, que permite la expresión de sus genes blanco exclusivamente en los hemocitos de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente, se evaluó tanto los niveles de

Scar, como la forma celular. Para la cuantificación se evaluaron al menos 20 células por fenotipo, n = 3. La barra de tamaño corresponde a 5  $\mu$ m. 1-Way ANOVA, Tukey Post test P < 0,0001.

Luego, se evaluó si estas protrusiones corresponden o no a filopodios. Para ello se analizó si la proteína Fascina, una reconocida estabilizadora de filopodios (Vignjevic y cols., 2006), se encuentra en estas protrusiones. Se observó, efectivamente, que las protrusiones observadas en los casos de ganancia de función de Pelado y pérdida de función de Scar corresponden a filopodios, evidenciado a través de la presencia del estabilizador Fascina (Figura 23).

Dado que en el ala se observó que la pérdida de función de Pelado es rescatada por la pérdida de función de Scar, y por las ganancias de función de Diaphanous y Actina, entonces se trató de realizar un rescate similar en los hemocitos, pero esta vez generando la ganancia de función de Pelado junto a la ganancia de función de Scar. Para ello se generó una mosca que exprese tanto el *driver* Gal 4 en hemocitos (Hml) como la ganancia de función de Pelado (UAS Pelado). Este animal (UAS Pelado; Hml-Gal4) entonces se cruzó con transgénicos que permite la expresión inducible de posibles supresores del fenotipo (el principal candidato era la ganancia de función de Scar). Con esto se esperaba aumentar la competencia por los monómeros de Actina y disminuir o eliminar así la aparición de células con más de tres protrusiones.

De manera análoga se evaluó el posible rescate con la pérdida de función de Diaphanous y Profilina (Chickadee en *Drosophila melanogaster*), mediante constructos que expresan RNAs de interferencia, Dia-IR y Chic-IR, respectivamente.



**Figura 23:** Evaluación de la identidad de las proyecciones observadas previamente, generadas por la ganancia de función de Pelado en hemocitos. Se evaluó si dichas proyecciones de Actina corresponden o no a filopodios. Para ello se analizó la presencia de Fascina, dado que está descrito que es una proteína estabilizadora de filopodios, cuya presencia está bastante caracterizada en dichas estructuras maduras (Vignjevic y cols., 2006). Se determinó que efectivamente, las protrusiones observadas corresponden a filopodios. Como control, se utilizó Cdc42 V12, que corresponde a la forma activada de la GTPasa monomérica y que está descrita como inductora de la formación de filopodios, así como la ganancia de función de Diaphanous. Estas fotografías se tomaron con un aumento de 63x y se realizó un zoom de 4x. Se evaluaron al menos 10 células en cada caso. La barra de tamaño corresponde a 10 μm.

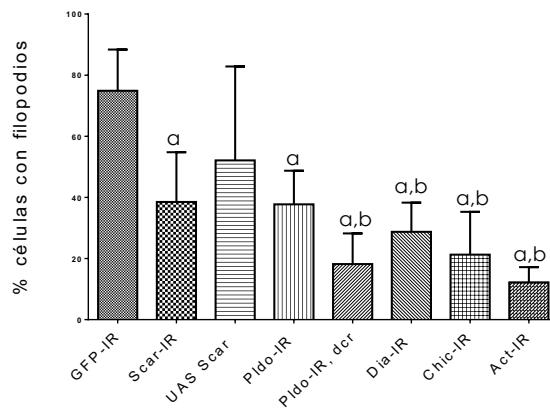
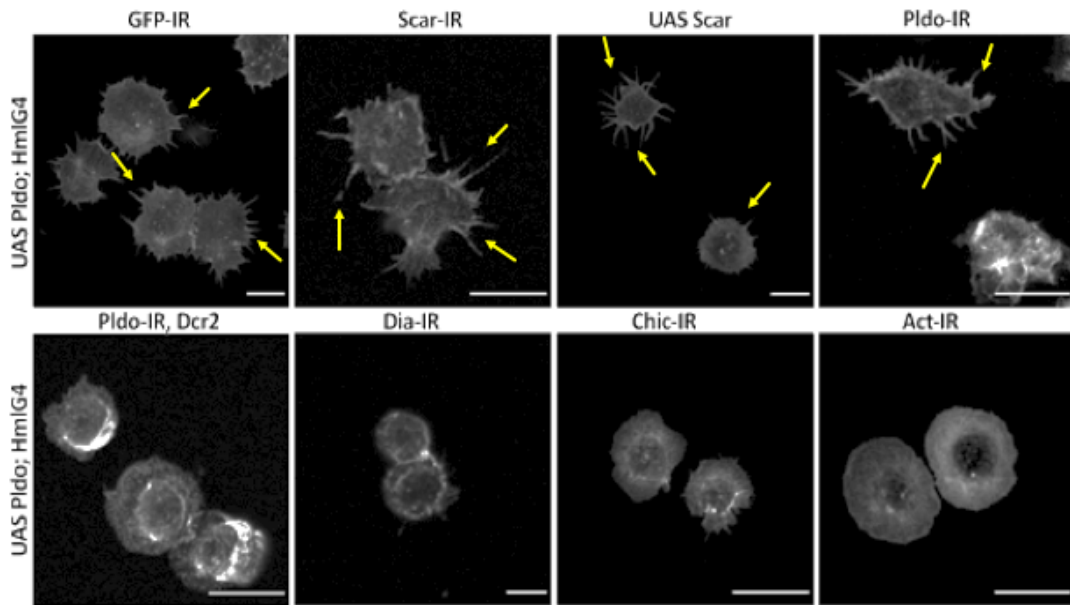
Como se observa en la Figura 24, la ganancia de función de Scar no es capaz de rescatar el fenotipo, lo que podría explicarse ya que el aumento en los niveles de Scar no implica un aumento en su actividad. Además, la actividad de Scar depende también del cambio

estructural que ocurre dentro del complejo WRC (WAVE Regulatory Complex, o complejo regulatorio de Scar/WAVE), donde se encuentra inactivo normalmente y será activado mediante la unión de la GTPasa monomérica Rac1, pero también puede ser activado por otras moléculas, como fosfolípidos que se encuentran en la membrana plasmática (Campellone y cols., 2010). Es por esto, que también se evaluó el rescate con una versión constitutivamente activa de Scar. Sin embargo, en estas condiciones tampoco se observó la reversión del fenotipo.

No obstante, la pérdida de función de Diaphanous y de Profilina sí revierten el fenotipo de ganancia de función de Pelado. Hay que señalar que al disminuir los niveles de Pelado (en una condición de sobreexpresión de Pelado) no se revierte el fenotipo (no mostrado), posiblemente debido a que el silenciamiento no es tan efectivo. Efectivamente, la supresión del fenotipo sí ocurre al disminuir los niveles de Pelado, expresando la construcción Pelado-IR, junto a la proteína Dicer2, que media el procesamiento del dsRNA producido desde la construcción Pelado-IR aumentando así la eficiencia del fenómeno de interferencia mediado por dsRNA (Dietzl y cols., 2007).

Asimismo, también se quiso evaluar qué ocurría con la forma celular en condiciones de pérdida de función de Pelado y para ello se utilizó nuevamente RNA interferente y la técnica MARCM. Se evaluó la distribución de la Actina filamentosa, para lo cual se tiñeron las células con faloidina. Cuando se analiza el fenotipo de las células mutantes respecto de aquellas células control, observando la tinción con faloidina para evaluar los

filamentos de Actina, se evidencia que las células mutantes se extienden menos en el sustrato y, por ende, se ven más pequeñas y redondas (Figuras 22 y 25).



**Figura 24.** Evaluación de la reversión del fenotipo observado en hemocitos. Se analizó la posible reversión la formación de filopodios inducida por la ganancia de función de Pelado en hemocitos. Para ello, se generó una mosca que expresa el *driver* HmlG4, junto con la ganancia de función de Pelado y esta se cruzó con moscas que expresan

distintos transgenes que codifican para proteínas que regulan el citoesqueleto de Actina (Scar, Dia, Chic y Act). Se observa que la pérdida de función de Dia, Chic y Act impiden la formación de filopodios inducida por la ganancia de función de Pelado. En cada caso se analizaron al menos 20 células,  $n = 3$ . La barra de tamaño corresponde a  $5 \mu\text{m}$ . 1-Way ANOVA, Tukey Post test  $P < 0,0001$ . Las diferencias significativas corresponden a: a, respecto de la expresión de GFP-IR; b, respecto de la expresión de UAS Scar.

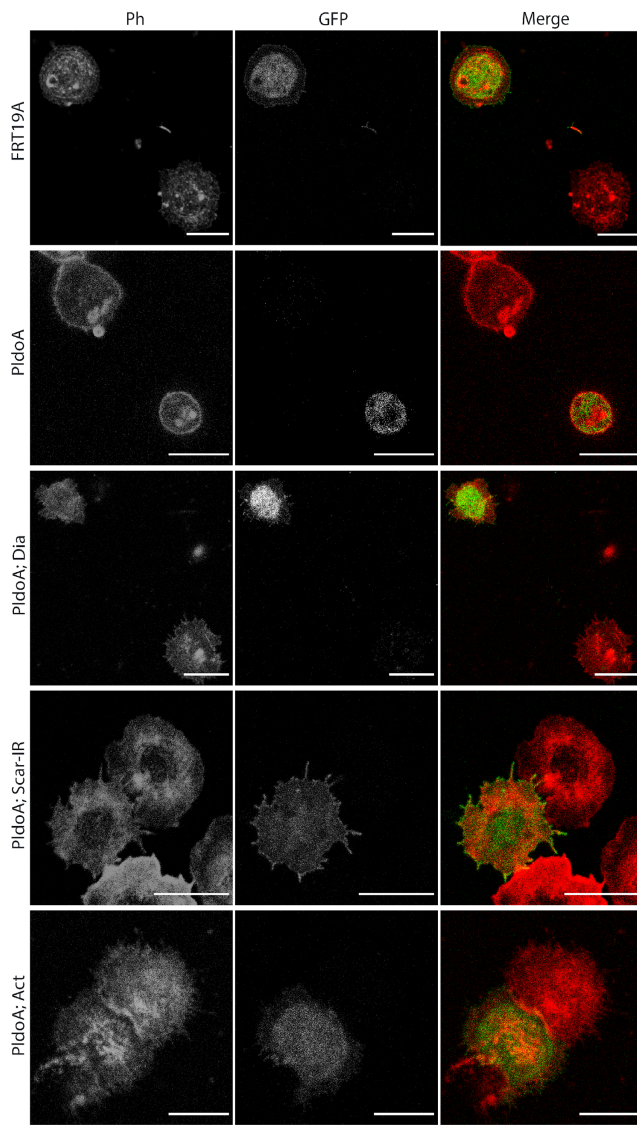


Mientras que al evaluar en condiciones de pérdida de función de Pelado se observa un aumento en el porcentaje de *ruffles* que presenta, respecto de las células silvestres (Anexo 7).

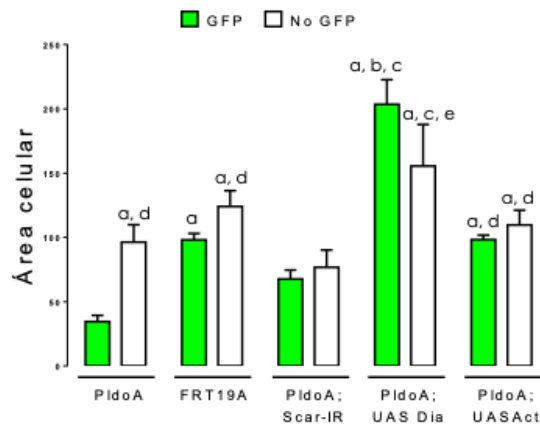
Luego, se evaluó si es posible revertir el fenotipo de *pelado* mutante en hemocitos, expresando distintas proteínas reguladoras del citoesqueleto de Actina. Efectivamente, se pudo revertir el fenotipo al inducir la expresión de Diaphanous y Actina, y lo mismo ocurre al disminuir la expresión de Scar. Esto estaría indicando que el área de adhesión celular depende de un correcto balance entre las distintas formas de polimerización de Actina (Figura 25).

Para cuantificar dicho fenotipo se midió el área celular, donde se observó que las células mutantes para *pelado* presentan un área celular significativamente menor que las células silvestres (Figura 25). Esto se podría interpretar como una disminución en el área celular adherida a la superficie.

Al evaluar qué ocurre en condiciones de pérdida de función de Pelado, se observa un aumento en el porcentaje de *ruffles* respecto de las células silvestres (Anexo 7). Esto es concordante con la idea de la competencia por los monómeros de Actina, dado que la ganancia de función de Pelado favorece la formación de filopodios, mediante la polimerización lineal de Actina, mientras que la pérdida de función de Pelado favorece la formación de *ruffles*, estructuras que dependen de la polimerización ramificada de Actina.



**Figura 25.** Evaluación de la posible reversión del fenotipo mutante de *pelado* en hemocitos. Para evaluar la posible reversión del fenotipo mutante se cuantificó el área celular utilizando la marca de faloidina. Las células mutantes se identificaron con la marca de GFP, en verde. En este caso, se generaron moscas que contienen la mutación (*pldoA*) junto con la ganancia o pérdida de función de cada uno de los componentes del citoesqueleto analizados (Diaphanous, Actina e Interferente de Scar). FRT19A se utilizó como control. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Para la cuantificación se utilizaron al menos 10 células por condición,  $n = 3$ . Se utilizó el



test 2-Way ANOVA y Tukey post test,  $P < 0,0001$ . Las diferencias significativas corresponde a: a, respecto de PldoA GFP; b, respecto de FRT19A GFP; c, respecto de Scar-IR GFP; y d, respecto de Dia GFP.

Luego, se evaluó si es posible revertir el fenotipo de *pelado* mutante en hemocitos, expresando distintas proteínas reguladoras del citoesqueleto de Actina. Efectivamente, se pudo revertir el fenotipo al inducir la expresión de Diaphanous y Actina, y lo mismo ocurre al disminuir la expresión de Scar. Esto estaría indicando que el área de adhesión celular depende de la polimerización lineal de Actina (Figura 25).

De acuerdo a los resultados aquí presentados, proponemos que Pelado participa en la competencia por monómeros de Actina y de esta forma estaría favoreciendo la polimerización lineal de Actina, posiblemente mediante el reclutamiento de Profilina, en lugar de enviar a degradación a Scar como se propuso originalmente en esta tesis. Este reclutamiento podría estar dado mediante el dominio FH1 presente en Pelado y así, Profilina incrementaría la polimerización lineal mediada por la formina Diaphanous. Para confirmar esta hipótesis se realizaron análisis de interacción entre Pelado y Profilina, mediante ensayos de inmunoprecipitación, pero dichos resultados no fueron concluyentes (Figura 29). Esto se debió a que en los distintos análisis que se realizaron, los resultados fueron variables entre sí.

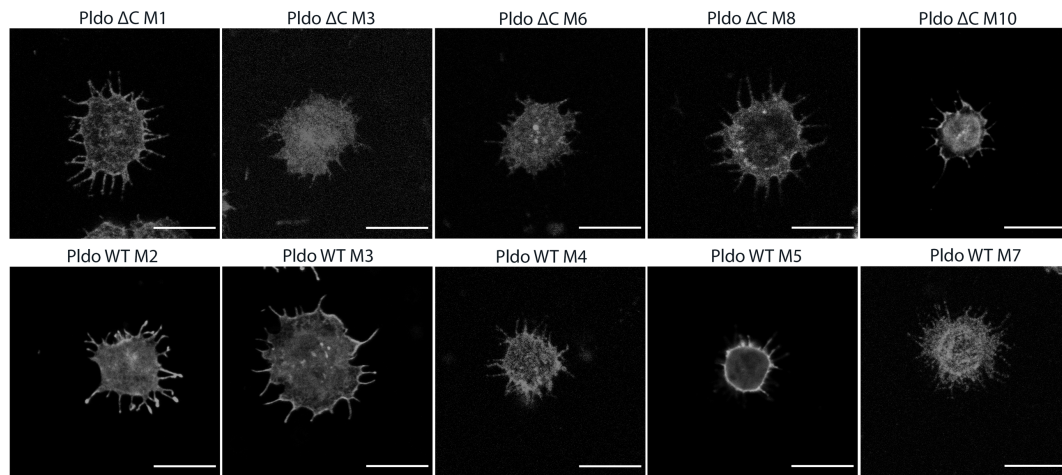
**4.- Estudiar qué dominios de Pelado son necesarios para su función sobre el citoesqueleto de Actina y por ende para la formación de tricomas en *Drosophila melanogaster*.**

Dado que Pelado es una proteína bastante grande y posee diversos dominios identificados y caracterizados con alguna función en particular. Por ende, al conocer el o los dominios necesarios para que Pelado cumpla su función sobre la polimerización de Actina, entonces podríamos dilucidar o al menos proponer un mecanismo por el cual Pelado ejerce su efecto en dicho proceso.

Para abordar este objetivo, primero se diseñó una mutante que carece del dominio C-terminal de la proteína Pelado (Pelado  $\Delta$ C). Esta elección se basa en que el dominio C-terminal carece de dominios reconocidos y se ha caracterizado *in silico* como una región que carece de estructuración clásica (alfa hélice o sábana beta), por lo que se ha denominado como “desestructurada”, mientras que el extremo N-terminal contiene diversos dominios, descritos previamente (Figura 9D). Dos de esos dominios son característicos de proteínas reguladoras del citoesqueleto de Actina como: FH1, dominio presente en forminas y caracterizado como un dominio de interacción con Profilina (Faix y cols., 2006) y WH2, dominio de interacción con Actina monomérica (Paunola y cols., 2002). En base a esto, se esperaba que la mutante Pelado  $\Delta$ C cumpla las funciones sobre el citoesqueleto de Actina.

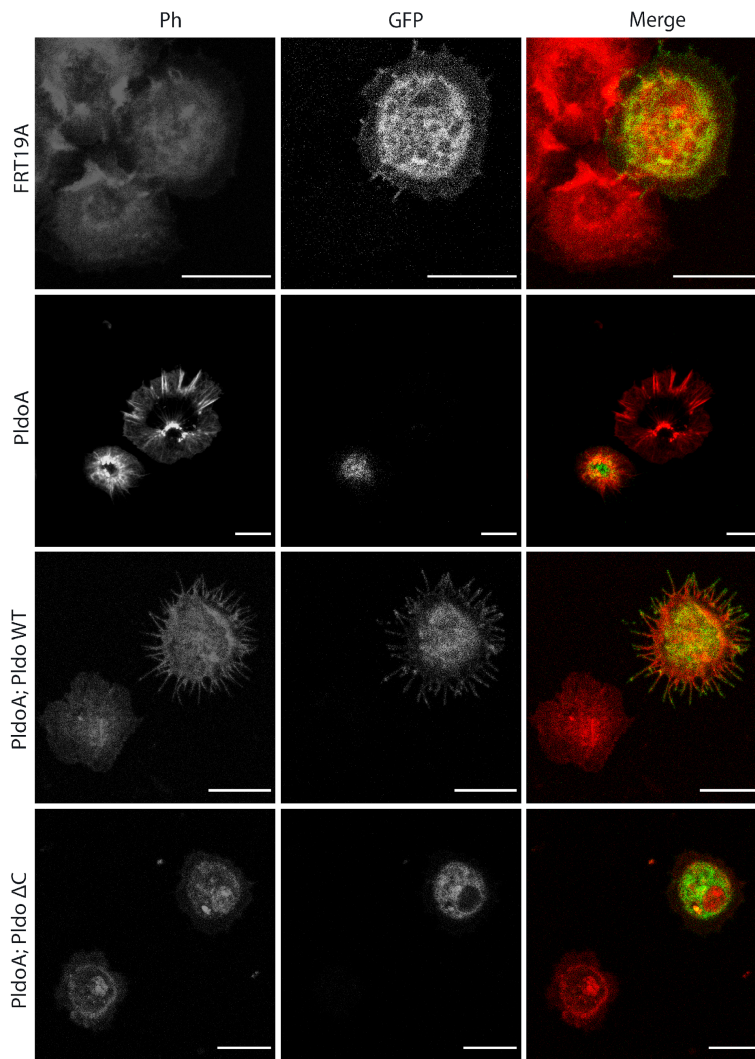
Primero se determinó la distribución celular de ambos constructos en los hemocitos, mediante una inmunofluorescencia contra el tag HA que poseen ambas proteínas (Anexo 6). Esta expresión se realizó utilizando el *driver* Hml Gal4 a 18°C, para que los niveles de expresión fueran los más bajos posibles. Se observó que ambas versiones de Pelado poseen una distribución bastante similar (citoplasmática). Cabe destacar que aún con estos niveles de expresión igualmente se observa la aparición de filopodios, tanto en la versión silvestre como en la mutante, pero este fenotipo era menos fuerte que el observado al tener las células a 25°C. Además, en ambos casos, se observa la presencia de la señal del tag HA en dichos filopodios (Anexo 9).

Luego, se evaluó si Pelado  $\Delta C$  tiene el mismo fenotipo observado con Pelado silvestre (aparición de filopodios). Efectivamente, ambos inducen la formación de filopodios, lo que indica que el extremo N-terminal de Pelado es suficiente para inducir la polimerización lineal de Actina (Figura 26). La cuantificación de estos resultados se encuentra en Anexo 12.

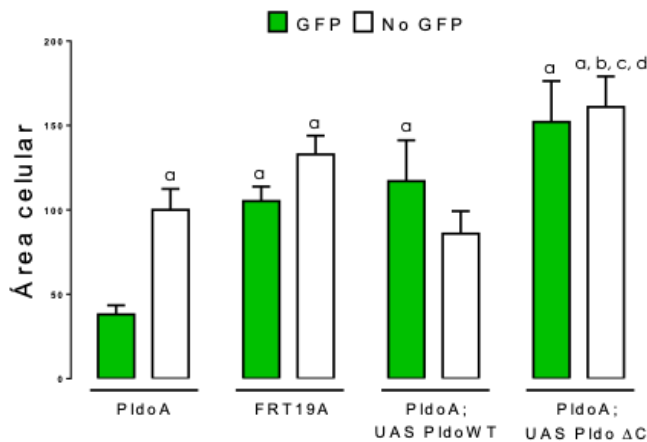


**Figura 26:** Evaluación del efecto de la expresión en hemocitos de las distintas líneas de expresión de Pelado, tanto silvestres como carentes del extremo C-terminal de Pelado ( $\Delta$ C). Se evaluó la capacidad de inducir o no la formación de filopodios en este tipo celular mediante la expresión de las distintas versiones de Pelado. Ello se analizó mediante la tinción con Faloidina para observar los filamentos de Actina. En la fila superior se observan distintas líneas de la mutante que carece del extremo C-terminal ( $\Delta$ C), mientras en la fila inferior se observan las distintas líneas disponibles de la versión silvestre de Pelado (WT). Se analizaron al menos 20 células en cada caso,  $n = 3$ . La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m.

Luego se evaluó la potencial reversión del fenotipo generado por *pelado* mutante en hemocitos, de manera análoga a lo observado en la Figura 25, pero esta vez evaluando el efecto de ambas versiones de Pelado (Pldo WT y Pldo  $\Delta$ C). Nuevamente, se observó que ambas versiones de Pelado son capaces de rescatar el fenotipo de disminución de área de adhesión en dichas células (Figura 27). Podemos concluir entonces, que la versión Pelado  $\Delta$ C cumple las funciones de Pelado silvestre (WT) en hemocitos.



**Figura 27:** Evaluación de la posible reversión del fenotipo mutante de *pelado* en hemocitos. Para evaluar la posible reversión del fenotipo mutante se cuantificó el área celular utilizando la marca de Faloidina; nuevamente, las células mutantes están marcadas en verde (GFP). También se generaron moscas que contienen la mutación (PldoA) junto con la ganancia de función de las dos versiones de Pelado (Pelado silvestre, WT y Pelado que carece del extremo C-terminal, ΔC); se utilizó FRT19A como control. Para la cuantificación, en cada n se utilizaron al menos 10 células por

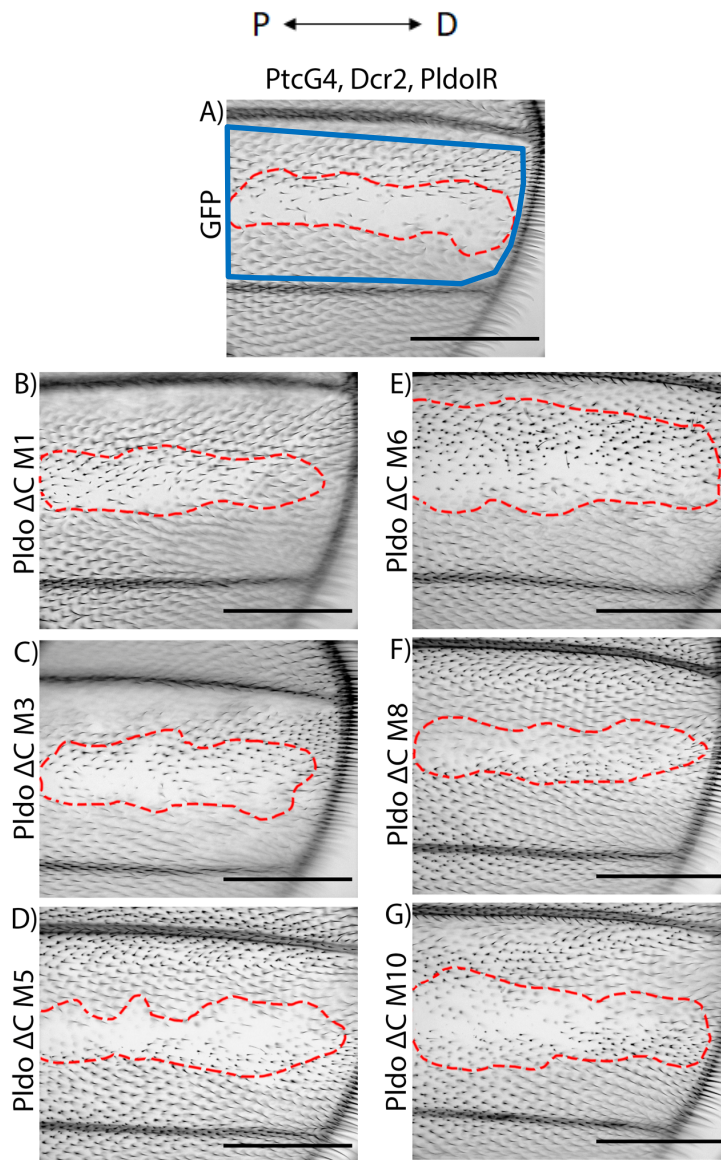


condición, n = 3. La barra de tamaño corresponde a 10 μm. Se utilizó el test 2-Way ANOVA y Tukey post test, P < 0,0001. Las diferencias significativas corresponde a: a, respecto de PldoA GFP; b, respecto de FRT19A GFP; c, respecto de PldoA no GFP; y d, respecto de PldoA; UAS PldoWT no GFP.

Por otra parte, se analizó el potencial rescate de esta mutante sobre la pérdida de función de Pelado, dado que esta mutante no es blanco del interferente utilizado. Como se muestra en la Figura 27, la mutante que carece de la porción C-terminal no es capaz de rescatar el fenotipo. Esto estaría indicando que dicha porción (o al menos una parte de ella) es esencial para ejercer su función en la formación del tricoma.

En base a los resultados descritos con Pelado  $\Delta C$ , podemos sugerir que probablemente los dominios FH1 y WH2 serían suficientes para inducir la formación de filopodios, pero no son suficientes para cumplir la función que esta proteína tendría sobre el citoesqueleto de Actina para formar el tricoma. Si bien es probable que también sean necesarios para la función de Pelado (por ejemplo, mediando la interacción con Profilina), su presencia sin el dominio desestructurado C-terminal no es suficiente para ejercer su función, al menos durante la formación del tricoma. Una posibilidad es que Pelado funcione como una proteína *scaffold* que reclute y mantenga en cercanía diversas proteínas que en conjunto inducirían o favorecerían la polimerización lineal de Actina. Dichas interacciones estarían dadas probablemente por los diferentes dominios de la proteína Pelado.



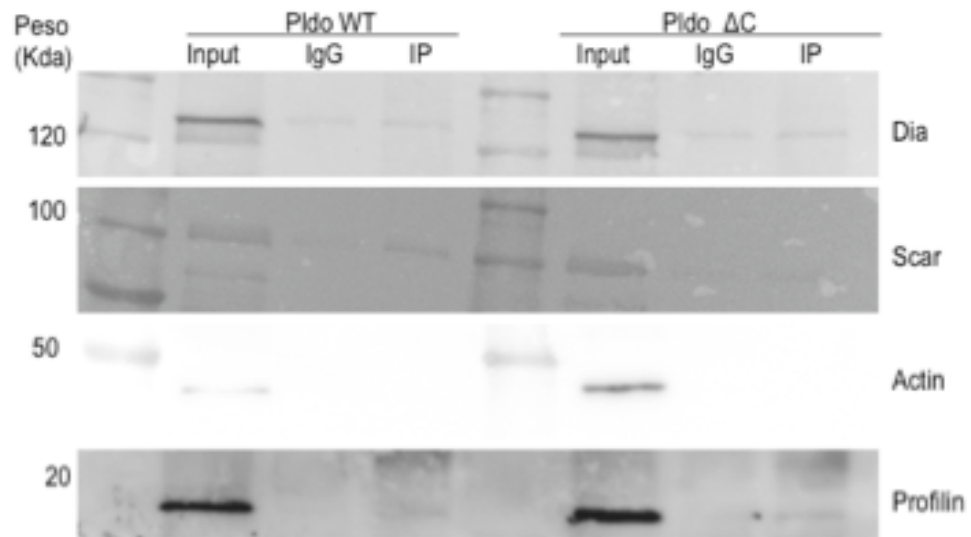


**Figura 28.** Evaluación de la reversión del fenotipo de pérdida de función de Pelado utilizando las distintas líneas de la versión de Pelado que carece del extremo C-terminal ( $\Delta C$ ). En todos los casos se utilizó una mosca que expresa el interferente de Pelado en combinación con el *driver* Patch Gal4 y Dcr (Ptc G4, Dcr, Pldo-IR) y se cruzó con las distintas líneas que carecen del extremo C-terminal ( $\Delta C$ ), y como control se utilizó la expresión de GFP. La zona de expresión de Patch (Ptc) está indicada por una línea celeste

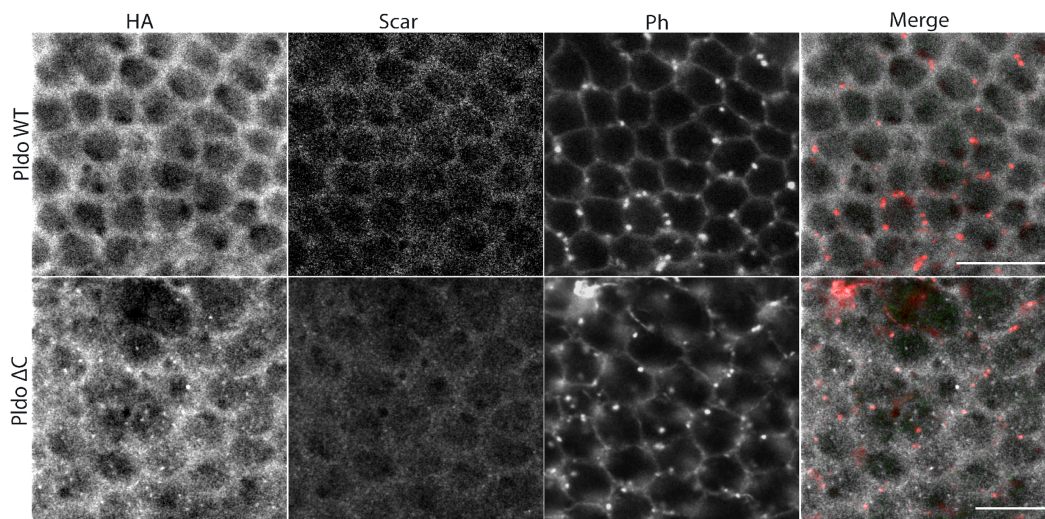
continua en el caso del control y es la misma zona para todas las alas analizadas; mientras que el fenotipo se observa dentro de la zona delimitada por una línea punteada roja. Estas imágenes son representativas de al menos 10 alas por genotipo, y fueron tomadas con un aumento de 40x; n = 3. La barra de tamaño corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Esto último se evaluó mediante ensayos de inmunoprecipitación, utilizando ambas versiones de Pelado (Pldo WT y Pldo  $\Delta$ C) evaluando en principio la interacción con proteínas como: Profilina, Diaphanous y Actina (Figura 29). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes dado que al repetir 3 veces el mismo experimento, la única interacción que se mantuvo en todas las oportunidades fue entre las dos versiones de Pelado y Scar. Mientras que las interacción con Diaphanous y Profilina se observó sólo en 2 y 1 oportunidad, respectivamente. Esto podría indicar que hay alguna interacción transiente y por ello no se observó en todas las oportunidades ensayadas, o que la proteína Pelado requiere de algún tipo de activación que no conocemos.

Luego, se analizó ambos constructos en el ala pupal y determinar si había alguna localización diferencial entre las dos versiones de Pelado que diera cuenta de la función de la región C-terminal, en la formación del pelo. Esto se realizó a distintos tiempos durante la formación del tricoma y a 18°C para reducir los niveles de expresión de las proteínas a analizar y así evitar una saturación del sistema. Al mismo tiempo, se quiso evaluar si había alguna alteración en la localización de la proteína Mwh, dado que también se observó que una disminución en Mwh junto a la pérdida de función de Pelado permitía revertir el fenotipo de ausencia de tricomas (Figura 14), para así determinar si esto es lo que se ve afectado en el caso de la mutante Pelado  $\Delta$ C.



**Figura 29:** Evaluación la posible interacción entre las distintas versiones de Pelado y diversas proteínas que regulan el citoesqueleto de Actina. Este ensayo se realizó en células S2R+ y se utilizó ambas versiones de Pelado unidas al tag HA en su extremo N-terminal. Pldo WT corresponde a la versión silvestre de Pelado y Pldo ΔC corresponde al mutante de Pelado que carece del extremo C-terminal. Como control se utilizó la proteína Jitterbug (Jbg) unida al tag HA para así descartar una unión inespecífica de las proteínas analizadas. Se verificó que efectivamente ambas versiones de Pelado son capaces de formar parte del mismo complejo con Scar. También se observó en ambos casos la interacción con Diaphanous y Profilina, no así con Actina. Sin embargo, estos últimos resultados no se observaron nuevamente. n = 3.



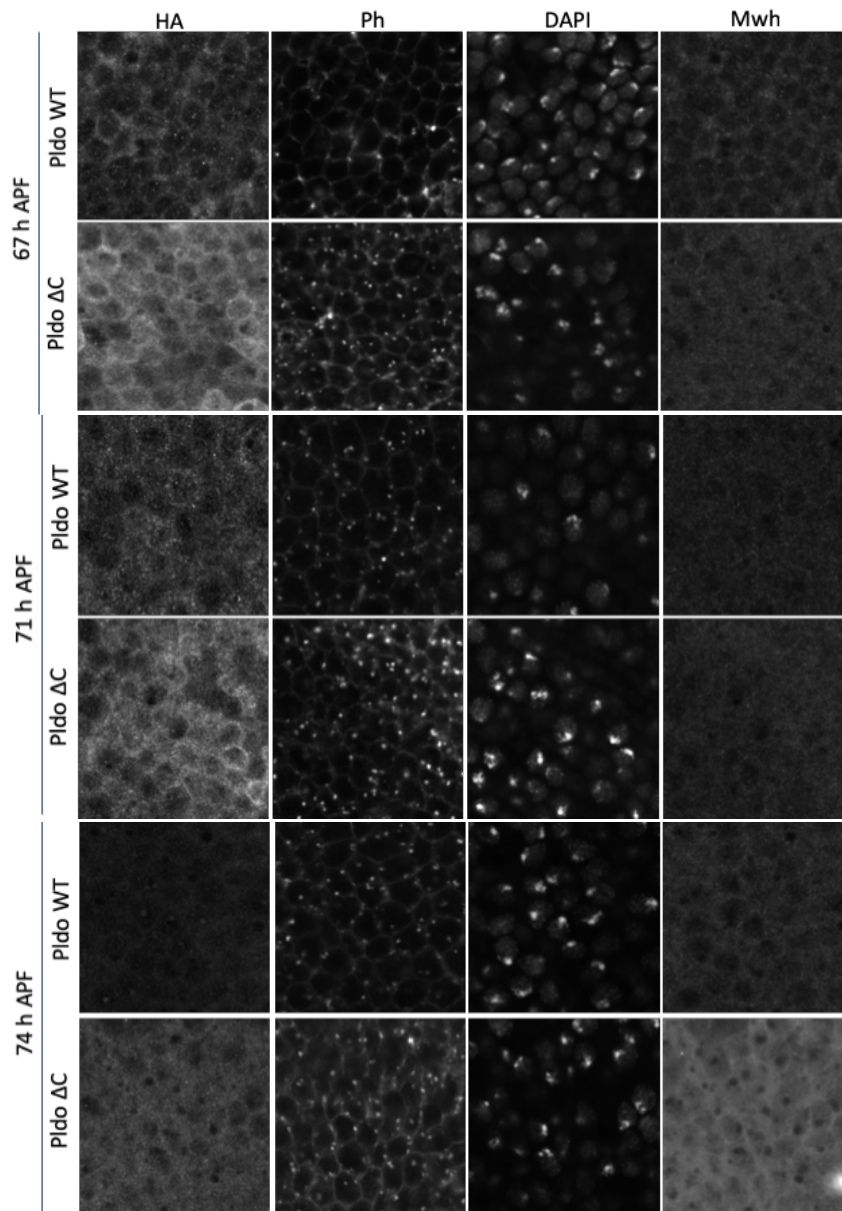
**Figura 30.** Evaluación de la localización de distintas versiones de Pelado, 61 h APF a 18°C; a dicha temperatura, este momento corresponde al momento en que comienza la acumulación de Actina en la zona apico-distal de cada una de las células epiteliales del ala de la mosca. Para evaluar la localización de Pelado se utilizó el tag HA. La expresión de los distintos transgenes, tanto en Pelado WT, como  $\Delta C$ , se realizó utilizando el *driver nubbin Gal4*, que permite la expresión de dichos transgenes en todas las células del ala. Dicha expresión se realiza en un *background* que tiene la expresión endógena de Pelado. Los individuos fueron mantenidos a 18°C, para que los niveles de expresión sean lo más bajo posible. En este análisis se evaluaron al menos 3 individuos. La barra de tamaño corresponde a 5  $\mu m$ . La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu m$ .

En el tiempo 61 horas APF, que corresponde aproximadamente a 28 horas APF, momento en que los centros de nucleación de Actina comienzan a acumularse en la zona apico-distal de cada célula (Classen y cols., 2008), se observa una menor intensidad en la señal de HA, en el caso del mutante  $\Delta C$ . Una posible explicación es que la mutante podría estar siendo degradada y por ello no logra cumplir su función sobre el citoesqueleto de

Actina. Sin embargo, esto no se observa en los tiempos posteriores de análisis y tampoco se ha evaluado su expresión a nivel transcripcional. No fue posible evaluar la localización de Mwh en este tiempo de desarrollo del ala pupal.

Curiosamente, a las 67 horas APF se observa lo contrario a la figura anterior, respecto de la señal de HA, ya que esta tendría mayor intensidad en el caso de la mutante. Cabe destacar que estos análisis se hicieron en paralelo y utilizando los mismos reactivos para cada caso, por lo que se puede descartar que haya habido diferencias de permeabilización al menos. Notablemente, la localización de Mwh también se ve alterada, ya que en el caso WT, Mwh tiene una localización marcada hacia la periferia celular mientras en el mutante se ve principalmente por toda la célula. Sin embargo, cuando se analiza la localización con mayor detalle en condiciones de *pelado* mutante, no se observan mayores diferencias respecto de las células vecinas (Anexo 11).

Luego, a las 71 horas APF se repite lo observado en la imagen anterior, respecto de la marca de HA. Sin embargo, ahora la señal de Mwh se aprecia bastante similar entre ambas versiones de Pelado.

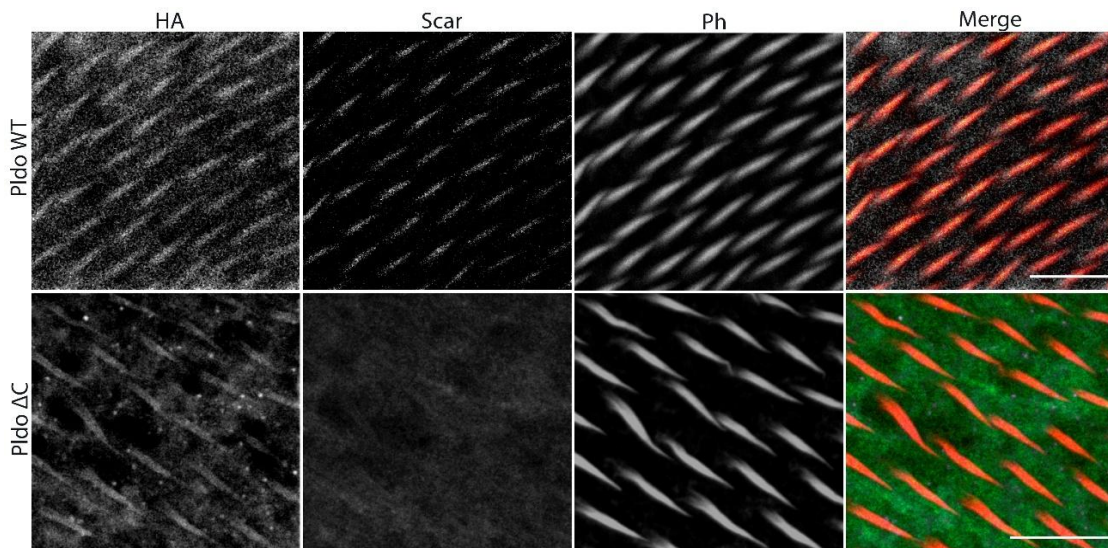


**Figura 31:** Evaluación de la localización de distintas versiones de Pelado, y de Mwh, a 67, 71, y 74 h APF. Para evaluar la localización de Pelado se utilizó el tag HA. Para esto se indujo la expresión de los distintos transgenes, tanto en Pelado WT, como ΔC, con el *driver nubbin Gal4*, que permite la expresión de dichos transgenes en todas las células del ala. Estas expresiones se realizaron en un *background* silvestre (que tienen la expresión

endógena de la proteína Pelado). Los individuos fueron mantenidos a 18°C, para que los niveles de expresión sean lo más bajo posible. En este análisis se evaluaron al menos 3 individuos. La barra de tamaño corresponde a 5 μm.

Nuevamente, a las 74 horas APF, la señal de HA se mantiene de acuerdo a lo observado

previamente, pero habría un aumento considerable en la señal de Mwh en el caso de la mutante, señal que esta vez, además se ve más marcada hacia la periferia celular. Sin embargo, este caso también requiere mayor análisis, por ejemplo respecto de los niveles de expresión de cada una de las versiones de Pelado. Esto debe ser considerado en todos los casos analizados.



**Figura 32:** Evaluación de la localización de las distintas versiones de Pelado, utilizando el tag HA para evidenciarlo, 80 h APF. Para esto se indujo la expresión de los distintos transgenes, tanto en Pelado WT, como  $\Delta C$ , con el *driver nubbin* Gal4, que permite la expresión de dichos transgenes en todas las células del ala. Estas expresiones se realizaron en un *background* silvestre, lo que significa que en todas estas células se mantiene la expresión endógena de Pelado. En la fila superior se observa la distribución del tag HA que corresponde al tag de Pelado silvestre (Pido WT) y en la fila inferior corresponde al tag de Pelado carente del extremo C-terminal (Pido  $\Delta C$ ). En todos los casos se analizó también la distribución de Scar y de los filamentos de Actina (Ph). Los individuos fueron mantenidos a 18°C, para que los niveles de expresión sean lo más bajo posible. En este análisis se evaluaron al menos 3 individuos. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu m$ .

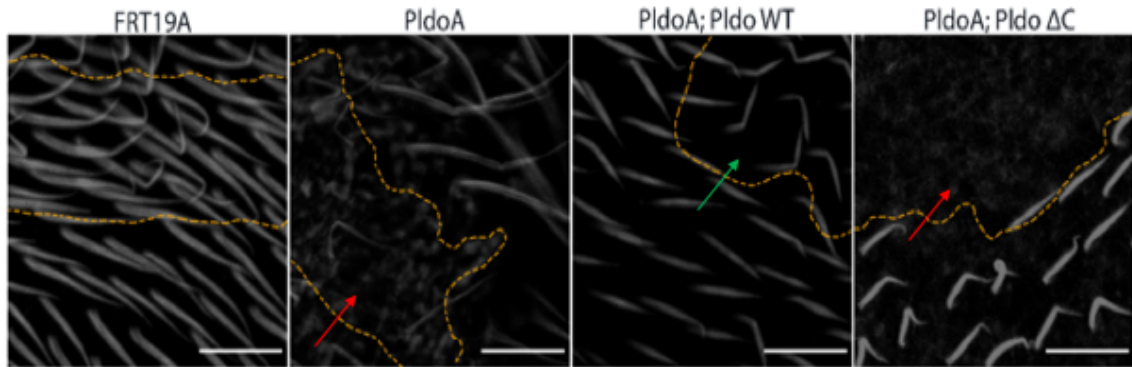
Finalmente, se observa que en ambos casos se logró formar el pelo y fenotípicamente no se observan diferencias aparentes. Sin embargo, hay dos observaciones interesantes que se pueden hacer respecto de los presentes resultados. Primero, que ambas versiones de Pelado están presentes en los pelos en formación, aunque la señal de Pelado silvestre es bastante más conspicua que la versión  $\Delta C$ . Segundo, la señal de Scar se observa bastante distinta en ambos casos, mientras en la versión silvestre se encuentra junto con Pelado y Actina en los pelos crecientes, en el caso  $\Delta C$ , se observa bastante más disperso en la célula, lo que sugiere una participación de Pelado en la regulación de la distribución celular de Scar.

Es probable que efectivamente la alteración observada en la localización de Mwh al expresar el mutante que carece del extremo C-terminal, tenga algún efecto en la formación del tricoma si se observa a 25°C, dado que como el desarrollo a dicha temperatura es más rápido, no habría tiempo para permitir la adaptación o la compensación del sistema en respuesta a dicha alteración. De hecho, se ha observado el fenotipo de ganancia de función de ambas versiones de Pelado y sólo la versión mutante genera una alteración en la morfología celular, aunque no se impide la formación del tricoma, lo que estaría indicando que también participa en otros procesos para los que el extremo C-terminal sería esencial (Figuras 26 y 27).

Finalmente, se quiso evaluar en el ala pupal si las dos versiones de Pelado son capaces de revertir el fenotipo generado en el mutante. Se observó que sólo el WT es capaz de



revertir el fenotipo y elongar el tricoma. Lo que corrobora lo observado en el caso de las alas adultas, donde sólo la versión silvestre (WT) revierte el fenotipo de pérdida de función de Pelado.



**Figura 33.** Evaluación de reversión del fenotipo de células mutantes para *pelado* en alas pupales utilizando distintas versiones de Pelado. Nuevamente, se generaron tejidos mosaicos y se evaluó la posible reversión del fenotipo *pelado* mutante, expresando al mismo tiempo Pelado silvestre (WT) o Pelado que carece del extremo C-terminal ( $\Delta$ C). La zona delimitada con líneas punteadas amarillas corresponde a la zona en que se produjo la recombinación. Como control se utilizó FRT19A (imagen de la izquierda), donde se induce la recombinación, pero no hay genes mutados. En la segunda imagen hacia la derecha, se observa el control del fenotipo mutante de pelado (flecha roja). Sólo la versión WT permite la reversión del fenotipo de ausencia de tricomas (flecha verde). Sin embargo, al expresar la versión mutante de Pelado ( $\Delta$ C), no hay reversión del fenotipo, al igual que la condición de *pelado* mutante por sí sola (flechas rojas). Se analizaron al menos 5 individuos para cada caso. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m.

## DISCUSION

### Pelado promueve la elongación del pelo celular

En la Figura 13 se analizó el crecimiento del pelo en distintos tiempos del proceso: 28 horas APF, momento en que comienza a acumularse la Actina en la zona apico-distal de cada célula; 32 horas APF, aparición del “*prehair*”, y 36 horas APF, cuando el pelo está prácticamente formado por completo (en relación a la elongación del pelo). La idea de este ensayo era determinar qué proceso estaba alterado al tener *pelado* mutante. Para así explicar el fenotipo que se observa en el ala adulta: células sin pelo (Figura 9). Se observó que a las 28 h APF, tanto en las células control como en las células mutantes, se observa la acumulación de Actina. Incluso, aparentemente la acumulación de Actina es mayor en las células mutantes comparado con las células control; esto podría deberse a que la célula podría sentir, de alguna forma, que no están las condiciones o requisitos para elongar dichos centros de nucleación. Entonces, se estaría forzando el sistema y, de manera análoga a lo que ocurre en las vías metabólicas, se podría estar acumulando el producto de la primera etapa de la formación del pelo o tricoma. Sin embargo, esta observación requiere un análisis más profundo para determinar si dichos centros de

nucleación observados son efectivamente los puntos donde posteriormente elongará el pelo.

Este resultado, además, estaría indicando que la participación de Pelado estaría siendo directamente sobre la elongación de los filamentos de Actina que constituirán el tricoma, proceso que depende esencialmente de la polimerización lineal de Actina. Para resolver con mayor profundidad esto, se podría hacer un ensayo de polimerización de Actina *in vitro*. Para así determinar si Pelado efectivamente es capaz de inducir la polimerización lineal de Actina y cuáles serían las proteínas necesarias para ello. Esta evaluación de la polimerización de Actina *in vitro* también permitiría determinar, al mismo tiempo, cuáles son los dominios y proteínas necesarios para ejercer dicha función.

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 28, la versión de Pelado que carece del extremo C-terminal no revierte el fenotipo de pérdida de función de Pelado, lo que estaría indicando entonces, que aparentemente la actividad de Pelado para inducir la formación de tricomas también es dependiente de su interacción con otras proteínas, hasta ahora desconocidas y probablemente dicha interacción es dependiente del extremo C-terminal. Sin embargo, no se puede descartar que el extremo C-terminal sea necesario para la localización de Pelado, lo cual se sugiere a partir de los resultados observados en las Figuras 30, 31 y 32.

Pelado participa en la competencia por los monómeros de Actina, favoreciendo la polimerización lineal

En la Figura 14 se evaluó la posible reversión del fenotipo generado por la pérdida de función de Pelado. Para ello se modificó la expresión de distintas proteínas que regulan el citoesqueleto de Actina, en conjunto con la pérdida de función de Pelado. En este punto, se determinó que la ganancia de función de Diaphanous y de Actina son capaces de revertir el fenotipo de pérdida de función de Pelado. En el caso de la ganancia de función de cada una de dichas proteínas por sí solas, en la zona de expresión de *patch* (Ptc-Gal4), no se observaron efectos visibles sobre la formación de los tricomas (Figura 14).

Cabe destacar que en algunos casos se observó que la reversión del fenotipo de pérdida de función de Pelado generado con la ganancia de función de Diaphanous no es del todo completo (Figura 14). Esta última aseveración se basa en que algunos de los tricomas que logran formarse (en la zona donde antes no había) son más delgados comparados con el resto, fenotipo que no se observa cuando se genera la ganancia de función de esta proteína por sí sola en la misma zona del ala (Figura 14). Esto podría deberse también a una carencia de monómeros de Actina en la zona de formación del tricoma, los que podrían estar capturados por Scar y entonces el número de filamentos de Actina que se logran formar es menor a lo normal.

Además, esto podría indicar que efectivamente Pelado no induce la degradación de Scar mediante la ubiquitinación de este, sino que más bien podría estar regulando su actividad, inhibiéndola. Esto impediría que Scar se una a monómeros de Actina y así permitiría la elongación lineal del filamento de Actina mediante la actividad de la forma Diaphanous. O bien, podría estar reclutando a Profilina y que esta inhiba la unión de los monómeros de Actina a Scar y de esta forma favorecer la polimerización lineal de Actina. Por otro lado, Pelado podría estar participando en la ubiquitinación de Scar, pero para relocalizarlo dentro de las células epiteliales.

Entonces, por un lado, el aumento de expresión de Diaphanous podría competir con Scar por los monómeros de Actina y así permitir la elongación lineal, mientras que, en el caso de la ganancia de función de Pelado, este podría unir a Scar impidiendo su asociación a los monómeros de Actina.

Por otro lado, la reversión del fenotipo de pérdida de función de Pelado también se observó con la pérdida de función de Scar y la pérdida de función de Mwh. El hecho de que sólo con la pérdida de función de Scar y no de Wasp, sea posible revertir el fenotipo de pérdida de función de Pelado podría indicar que la ausencia o disminución de actividad de Scar durante dicho proceso es importante. Sin embargo, cabe destacar que la pérdida de función de distintas subunidades del complejo Arp2/3 en combinación con la pérdida de función de Pelado también se observa una clara reversión del fenotipo

(Anexo 1). Lo que refuerza nuevamente la idea de la competencia entre las distintas formas de polimerizar la Actina por los monómeros disponibles.

En el caso de la reversión del fenotipo de pérdida de función de Pelado generado por la pérdida de función de Mwh, esta no es completa, sino que aparece el fenotipo de pérdida de función de Mwh (más de un pelo por célula) (Figura 14). Al respecto, cabe recordar que Mwh es un inhibidor de la forma Diaphanous y, por ende, de la polimerización lineal de Actina. Es por esto que hace sentido que, al disminuir la expresión de un inhibidor de la polimerización, dicho fenómeno ahora sí se pueda completar.

Por otro lado, al analizar el efecto de la pérdida de función de Diaphanous (Anexo 1) se observa que hay una menor cantidad de pelos por área, pero también se observa la aparición de más de un pelo por célula. Este efecto se debe a que Diaphanous participa en el proceso de división celular y al disminuir su expresión, se generan alteraciones en la citoquinesis, generándose células con más de un núcleo, lo que genera finalmente la aparición de más de un pelo por célula (Castrillon y Wasserman, 1994). Dicho fenotipo es bastante similar al caso de la ganancia de función de Scar miristoilado, proteína que también participa en la citoquinesis celular (Figura 21) (Lu y Adler, 2013).

Entonces, considerando que: i) los niveles de Scar no cambian en condiciones de ganancia o pérdida de función de Pelado ii) la ganancia de función/actividad de Scar no

genera el fenotipo de ausencia de tricomas y iii) la ganancia de función de Diaphanous, así como la ganancia de función de Actina, y la pérdida de función de Scar y de Mwh generan la reversión del fenotipo, proponemos que existe una competencia por los monómeros de Actina, donde Pelado, mediante un mecanismo desconocido, reduciría la interacción de Scar con los monómeros de Actina y así favorecería la elongación lineal del filamento de Actina a través de la actividad de forminas, como Diaphanous.

Por otro lado, si consideramos los resultados obtenidos tanto en la línea celular S2R+, como en los cultivos primarios de hemocitos, la ganancia de función de Pelado induce la formación de filopodios (Anexo 2 y Figuras 22 y 23), estructuras que requieren para su formación de la polimerización lineal de Actina, lo que estaría implicando que Pelado estimula ese tipo de polimerización de Actina. Además, la expresión de la versión de Pelado que carece del extremo C-terminal ( $\Delta C$ ) también es capaz de inducir la formación de filopodios en hemocitos, lo que indicaría que el extremo N-terminal es suficiente para inducir la formación de dichas estructuras. Un fenotipo similar se observa al reducir los niveles de Scar, y por ende al reducir la actividad del complejo Arp2/3, lo que también implica una reducción en la polimerización ramificada de Actina. Esto, junto a los resultados obtenidos en la formación de tricomas, nos permite sugerir que Pelado tiene una función opuesta a Scar respecto a la polimerización de Actina. Lo cual, reafirma la idea de la competencia por los monómeros de Actina.

Además, al observar los ensayos de reversión del fenotipo de formación de filopodios en

hemocitos (Figura 24), donde se aprecia que la pérdida de función de proteínas como Diaphanous, Profilina y Actina impiden la formación de filopodios, indicarían que Pelado favorece la polimerización lineal de Actina, pero no es capaz de ejercer dicha función por sí sola, si no que requiere de la participación de otras proteínas, como las ya mencionadas. También sería interesante evaluar qué ocurre en condiciones de pérdida de función de Pelado al expresar la versión constitutivamente activa de Cdc42 (Figura 23), que induce la formación de filopodios (Leung y cols., 1998) para así determinar la importancia o esencialidad de Pelado en dicho contexto.

Por el contrario, cuando se genera la pérdida de función de Pelado en hemocitos, se observa un cambio en la estructura celular, las células están más redondas y, aparentemente, menos adheridas a la superficie de cultivo. Además, se observa un aumento en la formación de *ruffles* (Anexo 7), cuya formación requiere de la polimerización ramificada de Actina. Respecto de la estructura celular en hemocitos de células mutantes para *pelado*, donde se observó una reducción del área de adhesión en el caso de las células mutantes (Figuras 25 y 27) y la reversión de dicho fenotipo mediante la ganancia de función de Diaphanous, de Actina de Pelado WT y  $\Delta C$ , así como con la pérdida de función de Scar, estarían indicando que los procesos que ocurren en el citoesqueleto de Actina para favorecer la adhesión celular serían similares a los mecanismos de formación de filopodios y por ello es posible rescatar dicho fenotipo con ambas versiones de Pelado, proceso que también es dependiente de la polimerización



lineal de Actina (Parsons y cols., 2010). Aunque, no podemos descartar que haya alguna interacción con otras proteínas, como integrinas u otras moléculas de adhesión.

Aunque podría ser cuestionable utilizar la presencia de Facina como único marcador de filopodios, debido a que dichas estructuras también se caracterizan por una alta dinámica, hecho que no fue posible determinar en el caso de la ganancia de función de las distintas versiones de Pelado en hemocitos. No obstante, las estructuras que se forman en las condiciones de ganancia de función de las distintas versiones de Pelado son estructuras constituidas principalmente por filamentos lineales de Actina, por lo tanto sí podemos concluir que inducen ese tipo particular de polimerización.

#### Pelado y su potencial función como componente de complejo ubiquitin ligasa

Debido a que la pérdida de función de Scar es capaz de revertir el fenotipo de pérdida de función de Pelado, y se sabe que EBAX-1, el ortólogo de Pelado en *C. elegans*, forma parte de un complejo ubiquitin ligasa que envía las proteínas blanco a degradación por el proteasoma. Entonces, una opción posible era que Pelado tuviera la misma función que EBAX-1 y un potencial blanco a ser degradado fuera Scar. De hecho, se observó que ambas proteínas, Scar y Pelado, forman parte del mismo complejo molecular (Figura 16). Sin embargo, al analizar si la ganancia o pérdida de función de Pelado generan alteraciones en los niveles de Scar, mediante distintas estrategias, no se observaron diferencias significativas respecto de los controles correspondientes (Figuras 18, 19 y 20; Anexos 3 y 8). Además, también se evaluó la posible acumulación de Scar al inhibir el

proteosoma, mediante el uso de MG132, pero tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de Scar, respecto del control (Anexo 8).

En base a los resultados mencionados, se podría proponer que Pelado tiene una función distinta en *Drosophila melanogaster*. No obstante, el hecho de que ambas proteínas formen parte del mismo complejo molecular podría indicar que Pelado podría estar inhibiendo la actividad de Scar, o bien, Pelado efectivamente podría formar parte de un complejo ubiquitin ligasa donde reconoce y se une a Scar para ubiquitarlo y de esta forma regular su actividad o localización celular, como se ha descrito para otras proteínas (Petroski y Deshaies, 2005; Kaiser y cols., 2000). Al respecto, se trató de evaluar la localización de Scar en distintas condiciones de expresión de Pelado, pero tampoco se vieron diferencias (Anexo 4). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, dado que pudo haber sido un problema de resolución simplemente y no fuimos capaces de observar una alteración leve en los niveles o localización de Scar.

No obstante, tampoco podemos descartar que efectivamente Pelado cumpla una función formando un complejo ubiquitin ligasa, pero que no sea Scar uno de los blancos reconocidos por Pelado para enviar a degradación por el proteasoma. Esto también podría estar ocurriendo en otro contexto celular.

Se podría sugerir, entonces, que Pelado podría tener dos funciones, dependientes del contexto celular: una regulando el citoesqueleto de Actina y otra como componente de un complejo ubiquitin ligasa. Respecto de esto, el mutante  $\Delta C$  cumpliría la función sobre

el citoesqueleto de Actina, pero no para formar parte del complejo ubiquitin ligasa.

#### Pelado como potencial *scaffold* regulador del citoesqueleto de Actina

Como se mencionó previamente, se ha descrito que la función de la formina Diaphanous está asociada a Profilina (Suarez y cols., 2015), donde esta última actuaría estimulando la actividad de Diaphanous, a través de su interacción con los monómeros de Actina y generando una especie de lanzadera de dichos monómeros hacia la formina, aumentando así la concentración efectiva de monómeros de Actina y con ello, la eficiencia de polimerización mediada por Diaphanous. Por otro lado, también se ha descrito que Profilina podría competir por los monómeros de Actina, favoreciendo la polimerización lineal en desmedro de la ramificada (Suarez y cols., 2015). En consecuencia con lo señalado, se evaluó si la ganancia de función de Profilina pudiera producir también un rescate del fenotipo de ausencia de tricomas en los animales deficientes en Pelado. Se utilizó la ganancia de función de Profilina con un promotor interno (*otu*), que también permite la expresión en las alas, pero en bajos niveles. A pesar de ello, se observó la reversión del fenotipo con dicha ganancia de función de Profilina (Chic) (Anexo 1). Sin embargo, cuando se genera la pérdida de función de Profilina, no se observa una alteración en la formación de tricomas, pero en algunas células se observa la aparición de dos pelos por célula, los que también son más pequeños que el resto y aún más curioso, es el hecho que la pérdida de función de esta proteína en combinación con la pérdida de función de Pelado atenúa el fenotipo de ausencia de tricomas, lo cual

podría deberse a una dilución de la función de Dicer en este caso o mecanismos compensatorios que pudieran involucrar a Diaphanous mismo o a la actividad de polimerización ramificada, por ejemplo reduciendo la actividad de Scar o Arp2/3.

Cabe destacar también, que considerando a Pelado como un *scaffold* que favorece la polimerización lineal, haciendo el proceso de formación del pelo más eficiente (necesario, porque tiene que ocurrir en un tiempo definido del desarrollo de *D. melanogaster*). Esto explicaría porqué el fenotipo de *pelado* mutante, generado en mosaicos celulares, es menor cuando dichas moscas crecen a menor temperatura, como 18°C (Anexo 5), ya que como a dicha temperatura todos los procesos ocurren de manera más lenta y por ende se reduce la importancia de proteínas que funcionan como *scaffolds* moleculares (o catalizadores, de cierta forma), cuya función es justamente acelerar los procesos o vías de señalización en las que participan.

Entonces, considerando en conjunto los resultados obtenidos se puede especular que la función de Pelado aparentemente es favorecer la polimerización lineal de Actina, mediante la forma Diaphanous durante la formación del pelo, o bien que Pelado inhibe la actividad de Scar y de esta forma favorecería la polimerización lineal de Actina mediada por Diaphanous, o ambas. En el primer caso, esto estaría ocurriendo mediante el reclutamiento de Profilina, que se ha descrito como uno de los competidores por monómeros de Actina que favorece la polimerización lineal. Este reclutamiento estaría mediado por el dominio FH1 presente en Pelado y que se ha descrito en la forma

Diaphanous, y otras proteínas, como un dominio de unión a Profilina (Faix y Grosse, 2006). Por ejemplo, también se ha descrito que Profilina es inactivada al interactuar con fosfolípidos de membrana (Lu y cols., 1996; Krishnan y Moens, 2009). Por lo tanto, es probable que Pelado esté actuando para bloquear dicha inhibición al interactuar con Profilina y de esta forma evitar la interacción con fosfolípidos y así, se favorecería su actividad y por ende, la polimerización lineal de Actina en la cercanía de la membrana.

Para confirmar si este último mecanismo propuesto es el responsable del fenotipo, se evaluó la interacción entre Pelado y Profilina mediante ensayos de inmunoprecipitación. Sin embargo, dicha interacción no fue concluyente debido a que no se observó en todos los ensayos realizados (Figura 29). Esto último podría deberse a que la interacción podría no ser directa, ya que se ha descrito por ejemplo, que Scar forma complejos con Diaphanous y el complejo Arp2/3 (Beli y cols., 2008), lo que indicaría que Pelado se podría estar uniendo directamente a Scar y de manera indirecta a otras proteínas como Diaphanous y Profilina.

Ahora bien, si Pelado efectivamente forma parte de un complejo multiproteico cuya función principal sería regular la dinámica del citoesqueleto de Actina, uno podría especular que podría funcionar como una especie de *switch* molecular, facilitando la polimerización lineal o ramificada de Actina, dependiendo del contexto celular. Dicha función sería análoga a la descrita para algunos complejos multiproteicos que regulan la expresión génica, como por ejemplo el complejo Polycomb, que dependiendo de su

estado, puede actuar tanto como activador o como represor de la expresión génica (Margueron y Reinberg, 2011). Esto se sugiere debido a que entre las proteínas que observamos como parte del complejo molecular aparecen tanto proteínas que inducen la polimerización lineal de Actina, como también algunas que inducen la polimerización ramificada de esta.

Pelado tendría un control temporal en el proceso de formación del pelo en *Drosophila melanogaster*

Al analizar la localización de las distintas versiones de Pelado en el ala pupal a distintos tiempos durante la formación del pelo, se observaron pocas y sutiles diferencias. Por ejemplo, a 61 h APF, se observa que la mutante que carece del extremo C-terminal tiene una menor señal, al analizar los niveles del tag HA. Esto podría indicar que la versión  $\Delta C$  se podría estar degradando rápidamente y por eso no rescata el fenotipo *pelado* analizado en la Figura 28, lo que indicaría que la formación del pelo requiere de una concentración apropiada de Pelado. Esta idea se refuerza al observar la presencia de una señal punteada para dicho tag, en la versión  $\Delta C$  y que no se observa en el caso de la versión silvestre (WT), lo que podría sugerir que dicha versión  $\Delta C$  podría estar acumulándose en vesículas, para ser degradadas, o bien excretadas por la célula.

De acuerdo a las vías descritas que están involucradas en el proceso de formación del tricoma en *Drosophila melanogaster*, podemos decir que hay 2 procesos esenciales que

deben ser estrictamente regulados para permitir la correcta formación de dicha estructura: la **localización** asimétrica de proteínas y la **temporalidad** de ocurrencia.

Dicha localización y temporalidad son claves para permitir la nucleación y elongación de los filamentos de Actina en la zona apico-distal de las células epiteliales del ala. De acuerdo a lo descrito en la presente tesis, Pelado no regula la localización asimétrica, dado que no se observaron los clásicos fenotipos que afectan la polaridad del tricoma. Entonces, Pelado estaría regulando la temporalidad del proceso, mediante mecanismos que no están del todo claros, pero que requiere del extremo C-terminal de Pelado, probablemente porque involucra la interacción con otros factores en el proceso de formación del tricoma.

Respecto de esto, Pelado podría estar siendo regulado por la vía Ovo/Svb, dado que, de acuerdo a los resultados obtenidos y presentados aquí, sería la vía en la que mejor encaja. Esto, porque podría ser un gen blanco de dicho factor transcripcional. Se buscó si el gen *pelado* contiene, en su zona promotora, la secuencia blanco descrita para el factor transcripcional Shavenbaby (ACAGTTA), y efectivamente está presente (al igual que en *shavenoid*), lo que fortalece esta idea. Además, se han visto fenotipos similares a los de *pelado* en la pérdida de función de otros genes blanco de Svb, como *shavenoid* y *grainy head* (Lee y Adler, 2004; Ren y cols., 2005). Por ello, sería interesante evaluar la posible interacción o epistasis de Pelado con las proteínas codificadas por dichos genes.

Por otro lado, también se ha descrito que el inicio de la formación del tricoma es regulado, al menos indirectamente, por la cascada de ecdisona (Ren y cols., 2005), por lo que sería interesante también evaluar si *Pelado* sería un gen que responde a dicha señalización hormonal.

Por otro lado, también es interesante mencionar que en varias oportunidades se observó la formación de pelos más pequeños en células que tienen *pelado* mutante, o bien en células que expresan el RNA interferente contra dicho gen. Esto se podría deber en el último caso a que eficiencia del RNA interferente no sea óptima, pero también a la diferencia en los niveles de expresión del interferente con el mismo *driver*, ya que por ejemplo, en el Anexo 15 se observa, mediante el uso del marcador GFP, que los niveles de expresión de dicho transgen no son los mismos en todas las células que pertenecen a dicha zona. Por otro lado, si *Pelado* efectivamente es una proteína *scaffold*, que participaría haciendo el proceso de formación del pelo más eficiente, entonces es probable que en algunos casos, al estar el resto de las proteínas que se requieren para la formación del tricoma (como *Diaphanous* y *Profilina*), estas alcancen los niveles necesarios en algunas células lo que permitiría al menos comenzar la formación del tricoma, proceso que, al no ser eficiente, no se alcanzaría a completar y por ende se obtendría la formación de pelos de menor tamaño a lo normal. Esto corroboraría la idea de que *Pelado* estaría regulando la temporalidad de la formación del pelo.



### Letalidad embrionaria en condiciones de *pelado* mutante

Es bien sabido que durante la embriogénesis, el citoesqueleto de Actina cortical cumple un rol esencial. Por ejemplo, durante la invaginación de membranas en la etapa sincicial del embrión, en la formación del surco metafásico, la celularización y la formación de las células del polo, entre otros procesos (Afshar y cols., 2000; GroBhans y cols., 2005). Por lo tanto, no es de extrañar que un mutante en el organismo completo para un gen regulador del citoesqueleto de Actina, como *pelado*, llegue a ser letal. De hecho, cabe destacar que los máximos niveles de expresión de *pelado* en *Drosophila melanogaster* ocurren en la etapa embrionaria ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

## CONCLUSIONES

- Pelado es importante para inducir la elongación lineal de Actina durante la formación del pelo en *D. melanogaster*.
- Pelado induce la polimerización lineal de Actina en hemocitos formando estructuras de tipo filopodio. Dicho proceso ocurre mediante la participación de otras proteínas como Diaphanous y Profilina.
- Para cumplir dicha función, el extremo C-terminal no es esencial, dado que ambas versiones que se tienen disponibles de Pelado (WT y  $\Delta C$ ), inducen la polimerización lineal de actina, evidenciado por la formación de estructuras de tipo filopodio, en hemocitos.
- En las células epiteliales el extremo C-terminal es esencial para cumplir su función durante la formación del pelo o tricoma, probablemente mediante la interacción con otras proteínas que regulan el proceso de elongación del pelo o tricoma, como Diaphanous, Profilina y Mwh.
- Los procesos previamente descritos dependen también de la disponibilidad de monómeros de Actina. Lo que sugeriría podría participar en la competencia por dichos monómeros.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler, P. 2012. The *frizzled/stan* pathway and planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Current Topics in Developmental Biology*, 101: 1 - 31.
- Afshar, K., Stuart, B., Wasserman, S. 2000. Functional analysis of the *Drosophila* Diaphanous FH protein in early embryonic development. *Development*, 127: 1887 – 1897.
- Andrew, D., Baker, B. 2008. Expression of the *Drosophila* secreted cuticle protein 73 (*dsc73*) requires Shavenbaby. *Developmental Dynamics*, 237: 1198 - 1206.
- Arendt, D. 2008. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nature Reviews Genetics*, 9: 868 – 882.
- Aso, T., Haque, D., Barstead, R., Conaway, R., Conaway, J. 1996. The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *The EMBO Journal*, 15: 5557 - 5566.
- Begg, D., Rodewald, R., Rebhun, L. 1978. The visualization of actin filament polarity in thin sections. Evidence for the uniform polarity of membrane-associated filaments. *Journal of Cell Biology*, 79: 846 – 852.
- Beise N. y Trimble W. 2011. Septins at a glance. *Journal of Cell Science* 124: 4141 - 4146.
- Beli, P., Mascheroni, D., Innocenti, M. 2008. WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2. *Nature Cell Biology*, 10: 849 - 857.
- Ben-Yaacov, S., Le Borgne, R., Abramson, I., Schweisguth, F., Schejter, E. 2001. Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by *Notch* signaling. *The Journal of Cell Biology*, 152: 1- 13.
- Bernadskaya, Y., Wallace, A., Nguyen, J., Mohler, W., Soto, M. 2012. UNC-40/DCC, SAX-3/Robo, and VAB-1/Eph polarize F-actin during embryonic morphogenesis by regulating the WAVE/SCAR actin nucleation complex. *PLoS Genetics*, 8: e1002863 (1 - 17).

- Bieling, P., Hansen, S., Akin, O., Li, T., Hayden, C., Fletcher D., Mullins, D. 2018. WH2 and proline-rich domains of WASP-family proteins collaborate to accelerate actin filament elongation. *The EMBO Journal*, 37: 102 - 121.
- Blair, S. 2003. Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development*, 130: 5065 - 5072.
- Bogdan, S., Stephan, R., Löbke, C., Mertens, A., Klämbt, C. 2005. Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nature Cell Biology*, 7: 977 - 984.
- Bogdan, S., Schultz, J., Grosshans, J. 2013. Formin' cellular structures, physiological roles of Diaphanous (Dia) in actin dynamics. *Communicative and Integrative Biology*, 6: e27634: 1 - 8.
- Brower, C., Shilatifard, A., Mather, T., Kamura, T., Takagi, Y., Haque, D., Treharne, A., Foundlings, S., Weliky, J., Conaway, R. 1999. The elongin B ubiquitin homology domain, Identification of Elongin B sequences important for interaction with Elongin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 13629 - 13636.
- Brüser, L., Bogdan, S. 2016. Molecular control of actin dynamics in vivo: insights from *Drosophila*. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 235: 285 - 310.
- Burke T., Christensen, J., Barone, E., Suarez, C., Sirotkin, V., Kovar, D. 2014. Homeostatic Actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers. *Current Biology*, 24: 579 - 585.
- Campellone y Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature Reviews*, 11: 237 - 251.
- Carrier, M., Pernier, J., Avvaru, B. 2013. Control of actin filament dynamics at barbed ends by WH2 domains: from capping to permissive and processive assembly. *Cytoskeleton*, 70: 540 - 549.
- Carrier, M., Shekhar, S. 2017. Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nature Reviews*, 18: 689 - 401.
- Carvajal-González, J., Mlodzik, M. 2014. Mechanisms of planar cell polarity establishment in *Drosophila*. *F1000 Prime Reports*, 6: 98 - 108.
- Castrillon, D., Wasserman, S. 1994. *diaphanous* is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the *limb deformity* gene. *Development*, 120: 3367 - 3377.
- Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F., Plaza, S. 2006. Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. *Plos Biology*, 4: 1549 - 1561.

- Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C., Liao, Y., Shi, S., Henry, L., Grishin, N., Bogdan, S., Rosen, M. 2014. The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell*, 156: 195 - 207.
- Chou, J., Stolz, D., Burke, N., Watkins, S., Wells, A. 2002. Distribution of gelsolin and phosphoinositol 4,5-biphosphate in lamellipodia during EGF-induced motility. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34: 776 – 790.
- Clainche, C., Carlier, M. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*, 88: 489 - 513.
- Classen, A., Aigouy, B., Giangrande, A., Eaton, S. 2008. Imaging *Drosophila* pupal wing morphogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 420: 265 – 275.
- Da Silva, J., Dotti, C. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews*, 3: 694 - 704.
- Davidson, A., Insall, R. 2010. Actin-based motility: WAVE regulatory complex structure reopens old SCARs. *Current Biology*, 21: 66 - 68.
- Davidson, A., Insall, R. 2013. SCAR/WAVE A complex issue. *Communicative and Integrative Biology*, 6: e27033.
- Delon, I., Chanut-Delalande, H., Payre, F. 2003. The *Ovo/Shavenbaby* transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 120: 747 - 758.
- Delon, I., Payre, F. 2004. Evolution of larval morphology in flies: get in shape with *shavenbaby*. *TRENDS in Genetics*, 20: 305 - 313.
- Deng, S., Bothe, I., Baylies, M. 2016. Diaphanous regulates SCAR complex localization during *Drosophila* myoblast fusion. *Fly*, 10: 178 - 186.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., Dickson, B. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448: 151 – 157.
- Drenckhahn, D., Pollard, T. 1986. Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 12754 - 12758.
- Eaton, S., Wepf, R., Simons, K. 1996. Roles for Rac1 and Cdc42 in planar polarization and hair outgrowth in the wing of *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 135: 1277 - 1289.

- Fagan, J., Dollar, G., Lu, Q., Barnett, A., Jorge, J., Schlosser, A., Pflieger, C., Adler, P., Jenny, A. 2014. Combover/CG10732, a novel PCP effector for *Drosophila* wing hair formation. *Plos One*, 9: e107311.
- Faix, J., Grosse, R. 2006. Staying in shape with formins. *Developmental Cell*, 10: 693 - 706.
- Fletcher, D., Mullins, R. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463: 485 - 492.
- Frankel, S., Mooseker, M. 1996. The actin-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 8: 30 – 37.
- Fricke, R., Gohl, C., Dharmalingam, E., Grevelhörster, A., Zahedi, B., Harden, N., Kessels, M., Qualmann, B., Bogdan, S. 2009. *Drosophila* Cip4/Toca-1 integrates membrane trafficking and actin dynamics through WASP and SCAR/WAVE. *Current Biology*, 19: 1429 - 1437.
- Gao, B. 2012. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Current Topics in Developmental Biology*, 101: 263 - 295.
- Gault, W., Olguin, P., Weber, U., Mlodzik, M. 2012. *Drosophila* CK1-Y, *gilgamesh*, controls PCP-mediated morphogenesis through regulation of vesicle trafficking. *The Journal of Cell Biology*, 196: 605 - 621.
- Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B., Schejter, E. 2009. The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *European Molecular Biology Organization*, 10: 1043 - 1050.
- Godin, S., Meslin, C., Kabbinavar, F., Bratton-Palmer, D., Homack, C., Mihalevic, M., Yoshida, K., Sullivan, M., Clark, N., Bernstein, K. 2015. Evolutionary and functional analysis of the invariant SWIM domain in the conserved Shu/SWS1 protein family from *Saccharomyces cerevisiae* to *Homo sapiens*. *Genetics*, 199: 1023 - 1033.
- Goley E., y Welch M. 2006. The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Reviews*, 7: 713 - 726.
- Graziano, B., Yu, H., Alioto, S., Eskin, J., Ydenberg, C., Waterman, D., Garabedian, M., Goode, B. 2014. The F-bar protein Hof1 tunes formin activity to sculpt actin cables during polarized growth. *Molecular Biology of the Cell*, 25: 1730 - 1743.
- Greenspan, R. 2004. Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- GroBhans, J., Wenzl, C., Herz, H., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H., Müller, H. 2005. RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal

by directed actin assembly during *Drosophila* cellularization. *Development*, 132: 1009 – 1020.

Harris, E., Li, F., Higgs, N. 2004. The mouse formin, FRLa, slows actin filament based end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 20076 – 20087.

Henson, J., Yeterian, M., Weeks, R., Medrano, A., Brown, B., Geist, H., Pais, M., Oldenbourg, R., Shuster, C. 2014. Arp2/3 complex inhibition radically alters lamellipodial actin architecture, suspended cell shape, and the cell spreading process. *Molecular Biology of the Cell*, 26: 887 - 900.

Hetrick, B., Han, M., Helgeson, L., Nolen, B. 2013. Small molecules CK-666 and CK-869 inhibit actin-related protein 2 /3 complex by blocking an activating conformational change. *Chemistry and Biology*, 20: 701 - 712.

Higgs, H., Peterson, K. 2005. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 1 – 13.

Huxley, H. 1963. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *Journal of Molecular Biology*, 7: 281 – 308.

Jockusch M. 2004. *The Actin Cytoskeleton*. 331 - 342.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., Reed, S. 2000. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF (Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, 3: 303 - 314.

Kang, H., Wang, J., Longley, S., Tang, J., Shaw, S. 2010. Relative actin nucleation promotion efficiency by WASP and WAVE proteins in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400: 661 - 666.

King, J., Veltman, D., Georgiou, M., Baum, B., Insall, R. 2010. Scar/WAVE is activated at mitosis and drives myosin-independent cytokinesis. *Journal of Cell Science*, 123: 2246 - 2255.

Ko, K., Powell, M., Hogarth, M. 2014. ZSWIM1: A novel biomarker in T helper cell differentiation. *Immunology Letters*, 160: 133 - 138.

Koch, N., Kobler, O., Thomas, U., Qualmann, B., Kessels, M. 2014. Terminal axonal arborization and synaptic bouton formation critically rely on Abp1 and the Arp2/3 complex. *Plos One*, 9: 1- 15 (e97692).

Koestler, S., Rottner, K., Lai, F., Block, J., Vinzenz, M., Small, V. 2009. F- and G-Actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *Plos One*, 4: 1 – 5 (e4810).

- Korobova, F., Svitkina, T. 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19: 1561 - 1574.
- Kovar, D., Kuhn, J., Tichy, A., Pollard, T. 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *The Journal of Cell Biology*, 161: 875 – 887.
- Kovar, D. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, 18: 11 - 17.
- Krishnan, K., Moens, P. 2009. Structure and functions of profilins. *Biophysical Reviews*, 1: 71 – 81.
- Kunda, C. Craig, G., Dominguez, B., Baum, B. 2003. Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of Scar/WAVE to regulate the formation of actin based protrusions. *Current Biology*, 13: 1867 - 1875.
- LeClaire, L., Baumgartner, M., Iwasa, J., Mullins, R., Barber, D. 2008. Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *Journal of Cell Biology*, 182: 647 - 654.
- Lee, H., Adler, P. 2004. The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, 121: 37 - 49.
- Leung, T., Chen, X., Tan, I., Manser, E. 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Molecular and Cellular Biology*, 18: 130 - 140.
- Lewis, T., Courchet, J., Polleux, F. 2013. Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *Journal of Cell Biology*, 202: 837 - 848.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2005. *Molecular Cell Biology*. 173 - 178.
- Lu, P., Shieh, W., Rhee, S., Yin, H., Chen, Ch. 1996. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry*, 35: 14027 – 14034.
- Lu, Q., Yan, J., Adler, P. 2010. The *Drosophila* planar polarity proteins Inturned and Multiple Wing Hairs interact physically and function together. *Genetics*, 185: 549 – 558.
- Lu, Q., Adler, P. 2015. The *diaphanous* gene of *Drosophila* interacts antagonistically with *multiple wing hairs* and plays a key role in wing hair morphogenesis. *Plos One*, 10: e0115623.



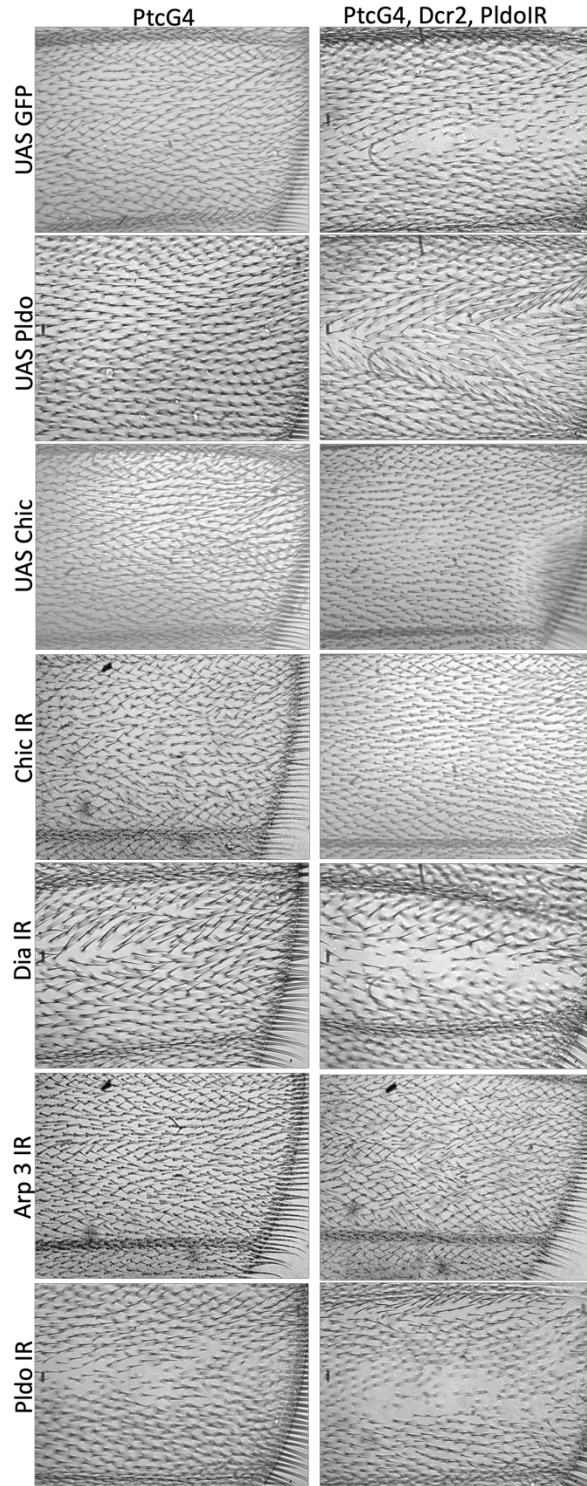
- Lu, Q., Schafer, D., Adler, P. 2015. The *Drosophila* planar polarity gene *multiple wing hairs* directly regulates the actin cytoskeleton. *Development*, 142: 2478 - 2486.
- Machesky, L., Mullins, R., Higgs, H., Kaiser, D., Blanchoin, L., May, R., Hall, M., Pollard, T. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 3739 – 3744.
- Makarova, K., Aravind L., Koonin, E. 2002. SWIM, a novel Zn-chelating domain present in bacteria, archaea and eukaryotes. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27: 384 - 386.
- Margueron, R., Reinberg, D. 2011. The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469: 343 – 349.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., Weeds, A. 1997. Cofilin changes the twist of F-Actin: implications for Actin filament dynamics and cellular function. *The Journal of Cell Biology*, 138: 771 – 781.
- Mitchell, H., Roach, J., Petersen, N. 1983. The morphogenesis of cell hairs on *Drosophila* wings. *Developmental Biology*, 95: 387 - 398.
- Moreira, C., Jacinto, A., Prag, S. 2013. *Drosophila* integrin adhesion complexes are essential for hemocyte migration in vivo. *Biology Open*, 2: 795 - 801.
- Mullins, R., Heuser, J., Pollard, T. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 6181 - 6186.
- Nobes, C., Hall, A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81: 53 - 62.
- Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., Kamura, T. 2012. The role of Elongin BC-containing ubiquitin ligases. *Frontiers in Oncology*, 2: 1 - 13.
- Olguin, P., Glavic, A., Mlodzik, M. 2011. Inter-tissue mechanical stress affects Frizzled-mediated planar cell polarity in the *Drosophila* notum epidermis. *Current Biology*, 21: 236 – 242.
- Pak, C., Flynn, K., Bamburg, J. 2008. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nature Reviews*, 9: 136 - 147.
- Parsons, J., Horwitz, A., Schwartz, M. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 11: 633 – 643.

- Paunola, E., Mattila, P., Lappalainen, P. 2002. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 513: 92 - 97.
- Payre, F., Vincent, A., Carreno, S. 1999. *ovo/svb* integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature*, 400: 271 - 275.
- Petroski, MD., Deshaies, RJ. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 1: 9 - 20.
- Pollitt, A., Insall, R. 2009. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science*, 122: 2575 - 2578.
- Ren, N., He, B., Stone, D., Kirakodu, S., Adler, P. 2006. The shavenoid gene of *Drosophila* encodes a novel actin cytoskeleton interacting protein that promotes wing hair morphogenesis. *Genetics*, 172: 1643 - 1653.
- Ren, N., Zhu, C., Lee, H., Adler, P. 2005. Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. *Genetics*, 171: 625 - 638.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., Louvard, D. 2004. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nature Reviews*, 5: 1 - 12.
- Riedl, J., Crevenna, A., Kessenbrock, K., Haochen, J., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods*, 5: 1 - 8.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., Carlier, M. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, 119: 419 - 429.
- Rotty J., Wu, C., Bear, J. 2012. New insights into the regulation and cellular functions of the Arp2/3 complex. *Nature Reviews*, 14: 7 - 12.
- Rougerie, P., Miskolci, V., Cox, D. 2013. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunology Review*, 256: 222 - 239.
- Saengsawang, W., Taylor, K., Lumbard, D., Mitok, K., Price, A., Pietila, L., Gomez, T., Dent, E. 2013. Cip4 coordinates with phospholipids and actin-associated proteins to localize to the protruding edge and produce actin ribs and veils. *Journal of Cell Science*, 126: 2411 - 2423.
- Sainath, R., Gallo, G. 2015. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Research*, 359: 267 - 278.

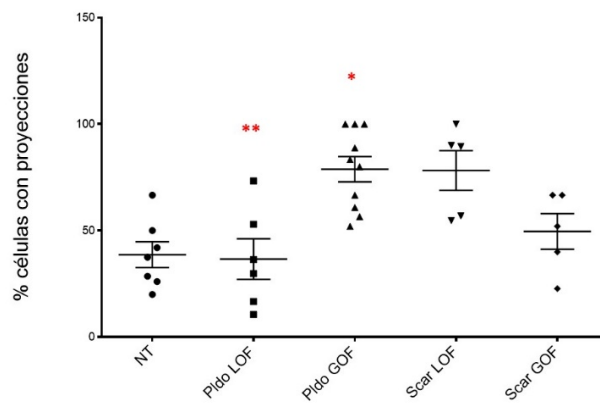
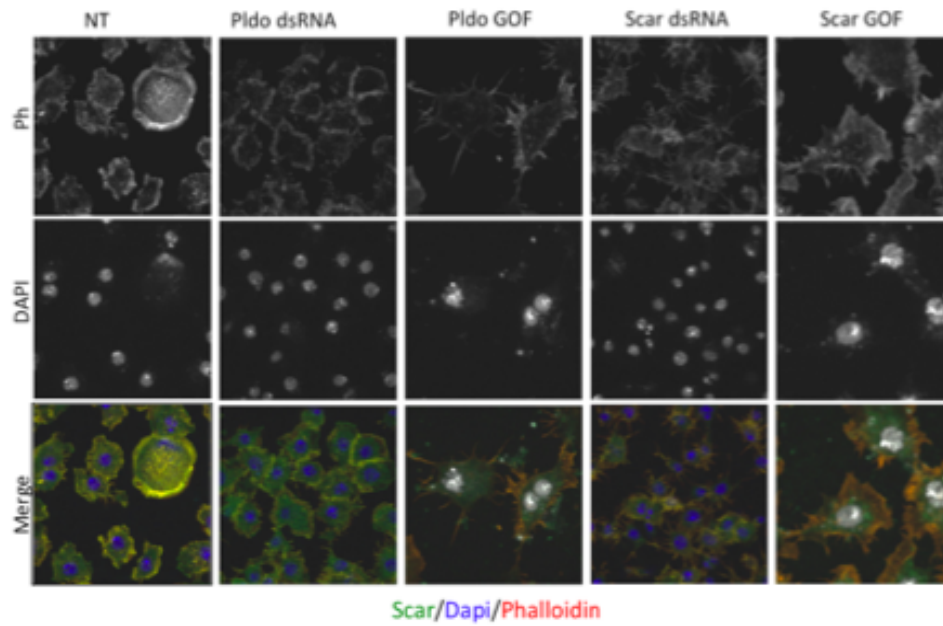
- Sagner, A., Merkel, M., Aigouy, B., Gaebel, J., Brankatschk, M., Jülicher, F., Eaton, S. 2012. Establishment of global patterns of planar polarity during growth of the *Drosophila* wing epithelium. *Current Biology*, 22: 1296 - 1301.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, IR., Kühlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, MA., Wittinghofer, A. 2004, The core FH2 domain of Diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, 13: 511 - 522.
- Simon, M., Xu, A., Ishikawa, H., Irvine, K. 2010. Modulation of Fat-Dachsous binding by the cadherin domain kinase Four-jointed. *Current Biology*, 20: 811 – 817.
- Stewart, M., Ritterhoff, T., Klevit, R., Brzovic, P. 2016. E2 enzymes: more than just middle mes. *Cell Research*, 26: 423 - 440.
- Strutt, D. 2008. The planar polarity pathway. *Current Biology*, 18: R898 - 902.
- Strutt, H., Strutt, D. 2009. Asymmetric localisation of planar polarity proteins: mechanisms and consequences. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20: 957 - 963.
- Strutt, D., Warrington, S. 2008. Planar polarity genes in the *Drosophila*. Wing regulate the localisation of the FH3-domain protein Multiple Wing Hairs to control the site of hair production. *Development*, 135: 3103 – 3111.
- Suarez, C., Carroll, R., Burke, T., Christensen, J., Bestul, A., Sees, J., James, M., Sirotkin, V., Kovar, D. 2015. Profilin regulates F-Actin network homeostasis by favoring Formin over Arp2/3 complex. *Developmental Cell*, 32: 1 - 11.
- Suarez, C., Kovar, D. 2016. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nature Reviews*, 17: 799 - 810.
- Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B., Flynn, K., Stradal, T., Chrostek-Grashoff, A., Brakebush, C., Bradke, F. 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *The Journal of Neuroscience*, 30: 6930 - 6943.
- Takeya, R., Sumimoto, H. 2003. Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation. *Journal of Cell Science*, 116: 4567 - 4575.
- Turner, C., Adler, P. 1998. Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeleton in the morphogenesis of epidermal hairs during wing development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 70: 181 - 192.

- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., Borisy, G. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *The Journal of Cell Biology*, 174: 863 - 875.
- Wang, Z., Hou, Y., Guo, X., Van der Voet, M., Boxem, M., Dixon, J.E., Chisholm, A.D., Jin, Y. 2013. The EBAX-type Cullin-RING E3 ligase and HSP90 guard the protein quality of the SAX-3/Robo receptor in developing neurons. *Neuron*, 79: 903 - 916.
- Wong, L., Adler, P. 1993. Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *The Journal of Cell Biology*, 123: 209 - 221.
- Woodrum, D., Rich, S., Pollard, T. 1975. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *The Journal of Cell Biology*, 67: 231 - 237.
- Wu, J., Luo, L. 2006. A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nature Protocols*, 1: 2583 - 2589.
- Yan, J., Lu, Q., Fang, X., Adler, P. 2009. Rho1 has multiple functions in *Drosophila* wing planar polarity. *Developmental Biology*, 333: 186 - 199.
- Yan, J., Huen, D., Morely, T., Johnson, G., Gubb, D., Roote, J., Adler, P. 2008. The *multiple-wing-hairs* gene encodes a novel GBD-FH3 domain-containing protein that functions both prior and after wing hair initiation. *Genetics*, 180: 219 - 228.
- Yan, S., Lv, Z., Winterhoff, M., Wenzl, C., Zobel, T., Faix, J., Bogdan, S., Grosshans, J. 2013. The F-bar protein Cip4/Toca1 antagonizes the formin Diaphanous in membrane stabilization and compartmentalization. *Journal of Cell Science*, 126: 1796 - 1805.
- Zallen, J., Cohen, Y., Hudson, A., Cooley, L., Wieschaus, E., Schejter, E. 2002. SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 156: 689 - 701.
- Zanet, J., Jayo, A., Plaza, S., Millard, T., Parsons, M., Stramer, B. 2012. Fascin promotes filopodia formation independent of its role in actin bundling. *Journal of Cell Biology*, 197: 477 - 486.
- Zobel, T., Bogdan, S. 2013. A high resolution view of the fly actin cytoskeleton lacking a functional WAVE complex. *Journal of Microscopy*, 251: 224 - 231.

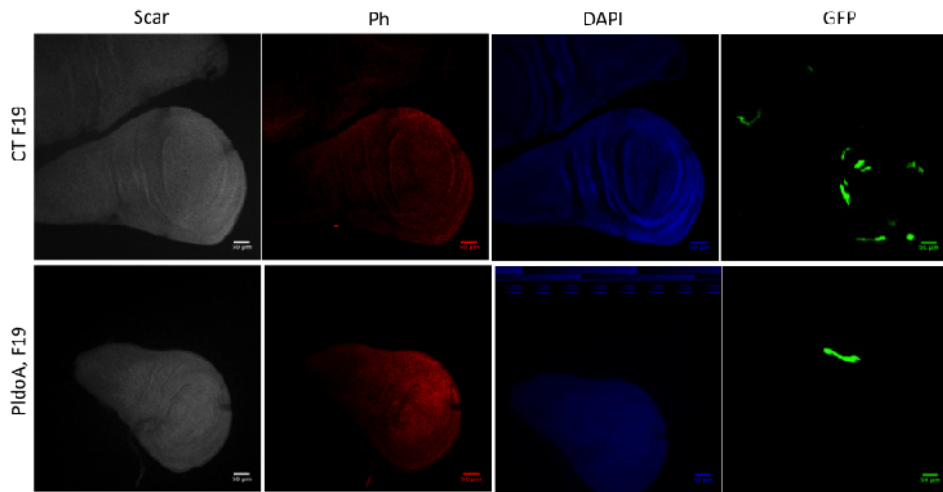
## ANEXOS



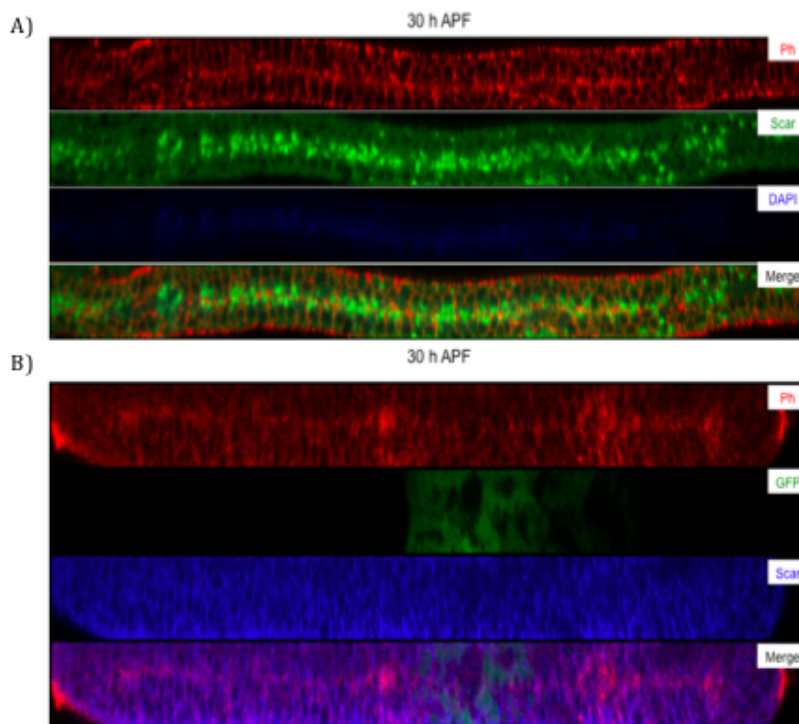
**Anexo 1:** Fenotipo alas adultas. Estas imágenes son representativas de 20 alas por genotipo (10 alas de hembras y 10 alas de machos), y fueron tomadas con un aumento de 40x; n = 3.



**Anexo 2:** Fenotipo células S2R+. Los filamentos de Actina se marcaron con faloidina unida a rodamina (en rojo) y el núcleo con DAPI (en azul). LOF indica pérdida de función (del inglés, Loss of function) y GOF indica ganancia de función (del inglés, Gain of function). A partir de estas imágenes se cuantificó el porcentaje de células con más de 3 proyecciones de tipo filopodio. Se cuantificaron al menos 20 células en cada caso, n= 3. Como análisis estadístico se utilizó One-Way ANOVA,  $P < 0,05$ . Tukey post test.



**Anexo 3:** Evaluación niveles Scar en condiciones de *pelado* mutante en discos imaginales de ala, en comparación con las células silvestres que rodean los parches mutantes. No se observaron diferencias significativas.

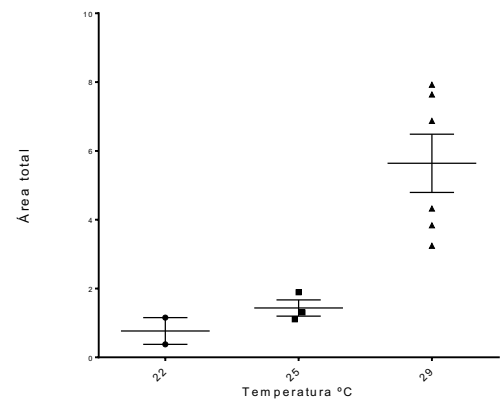
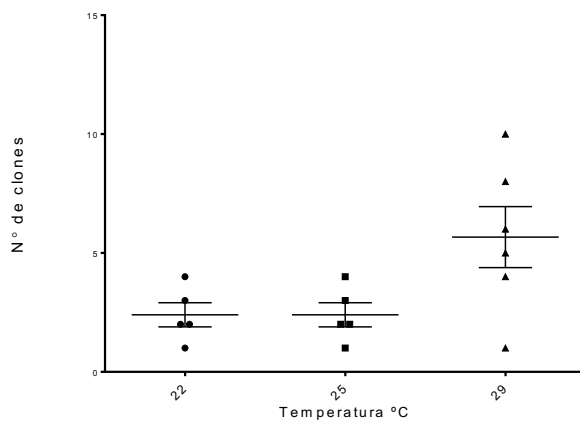
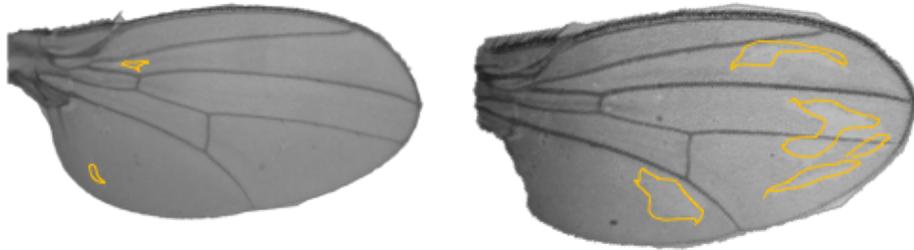


**Anexo 4:** Localización de Scar en distintos contextos genéticos. A) condición silvestre, 30 horas APF. B) Expresión del interferente de Pelado en la zona Patch (marcado en verde con GFP), 30 horas APF.

MARCM PldoA

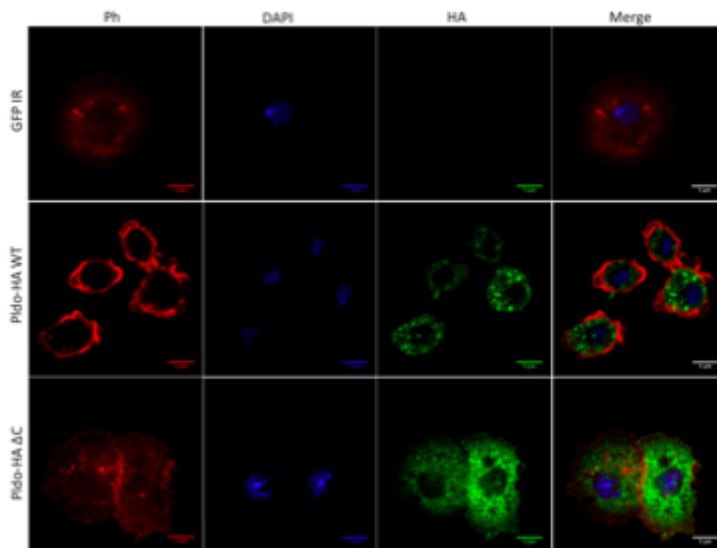
18°C

29°C

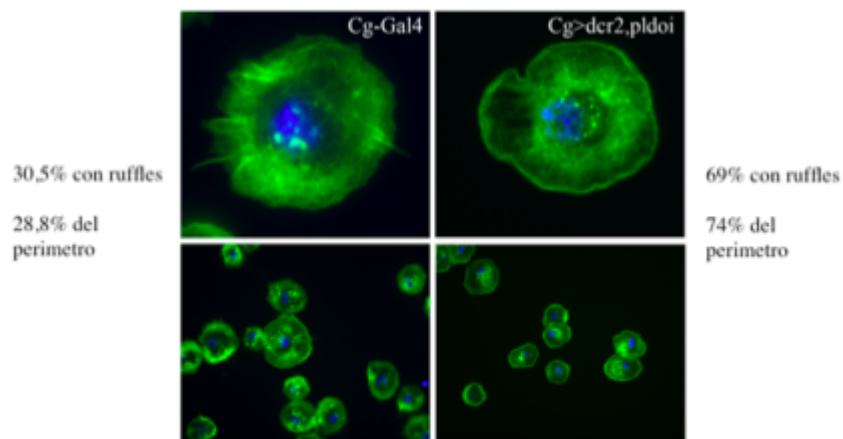


**Anexo 5:** Generación de clones *pelado* a distinta temperatura. Luego de realizar el heat shock a 37°C, que induce la expresión de la flipasa, los distintos tubos se mantuvieron a distinta temperatura, hasta que llegaron a adultos.

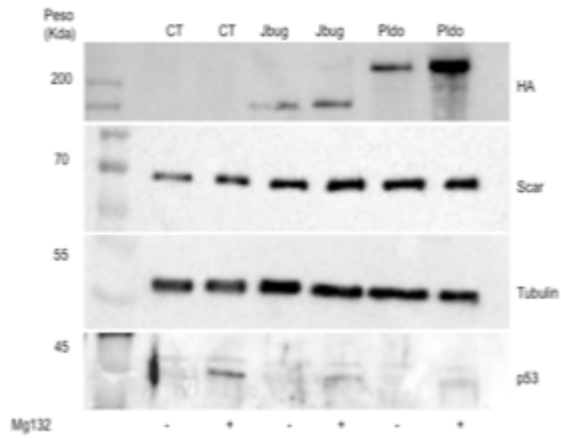




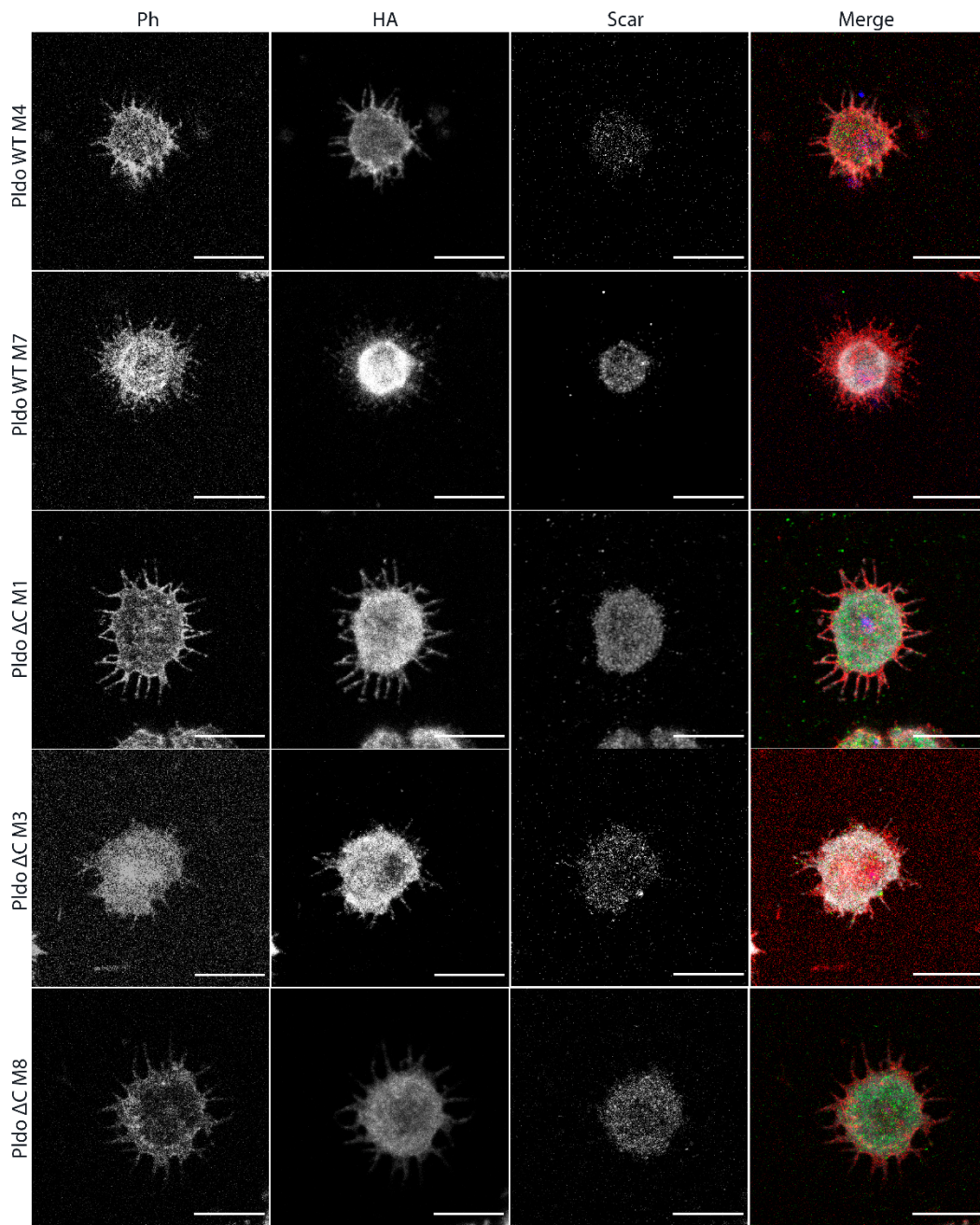
**Anexo 6.** Localización HA en hemocitos. Este análisis se realizó a 18°C. En rojo está la marca de Faloidina y en verde la marca de HA. Se observa que en estas condiciones, aparentemente la carencia del extremo C-terminal induce mayor formación de filopodios en comparación con la expresión de la proteína silvestre. La barra de tamaño corresponde a 5 μm.



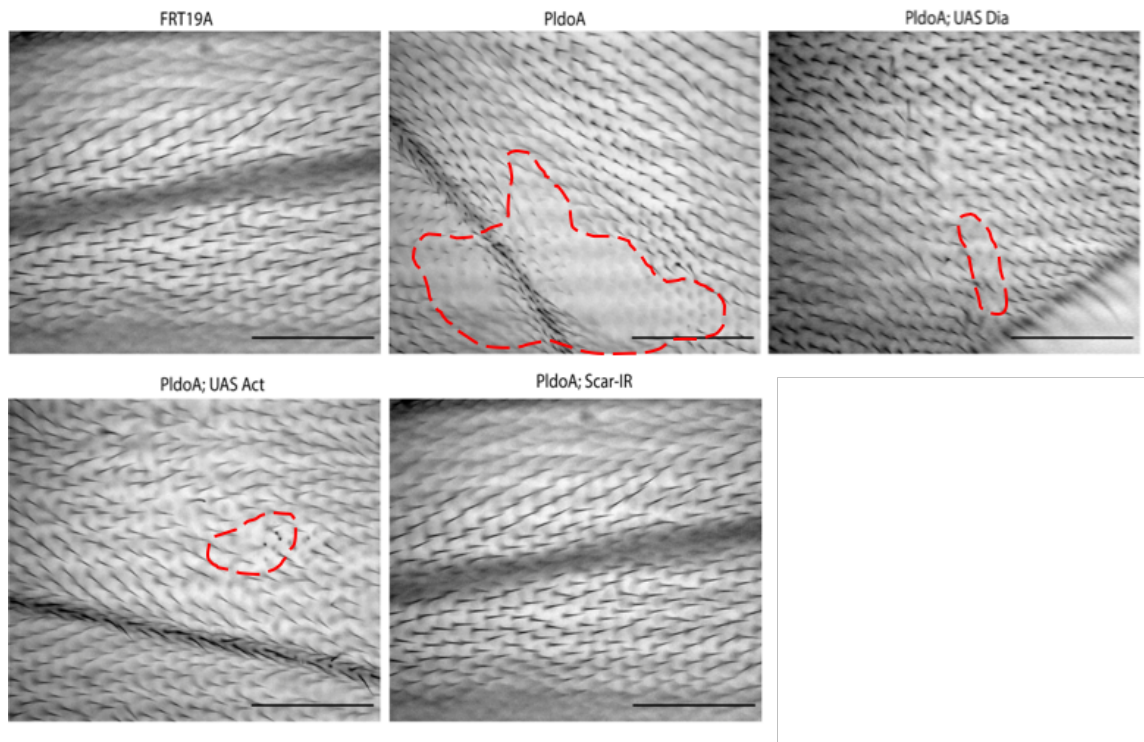
**Anexo 7:** Fenotipo pérdida de función de Pelado en hemocitos. Comparación entre hemocitos silvestres (panel izquierdo) y aquellos que expresan un RNA interferente contra pelado (panel derecho). Cuantificaciones realizadas por Glavic et al.



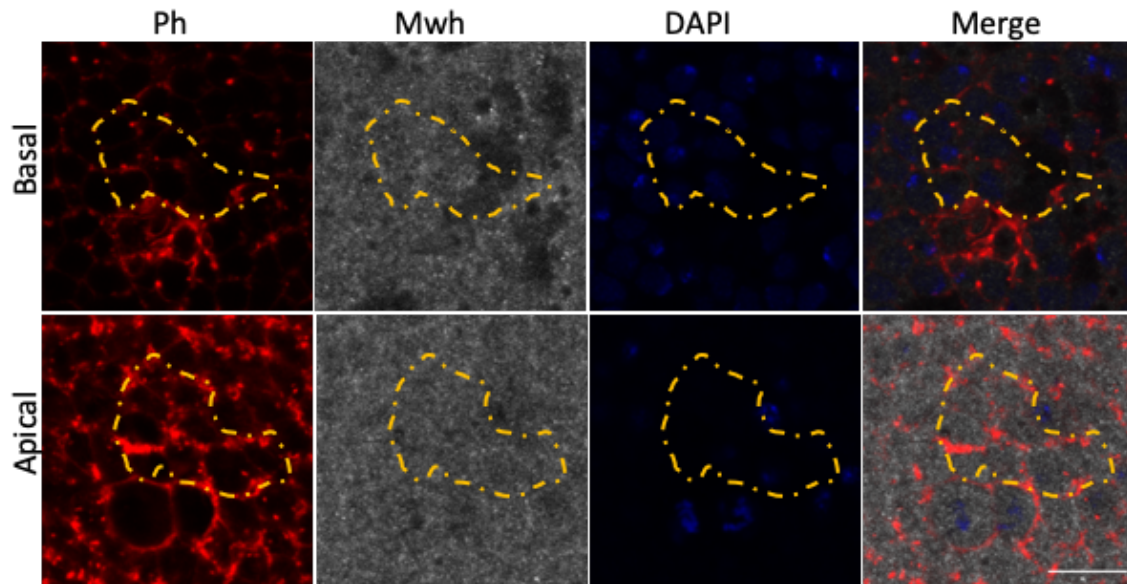
**Anexo 8:** Niveles de Scar al bloquear proteasoma. CT corresponde a células que no sobreexpresan ningún plasmidio. Jbug corresponde a células que sobreexpresan la proteína Jitterbug unida al tag HA. Pido corresponde a células que sobreexpresan Pelado unido al tag HA. En la parte inferior se indica si fueron o no tratadas con el inhibidor MG132. Se utilizó la evaluación de los niveles de p53 como control, ya que está ampliamente descrito que esta proteína es degradada por el proteasoma.



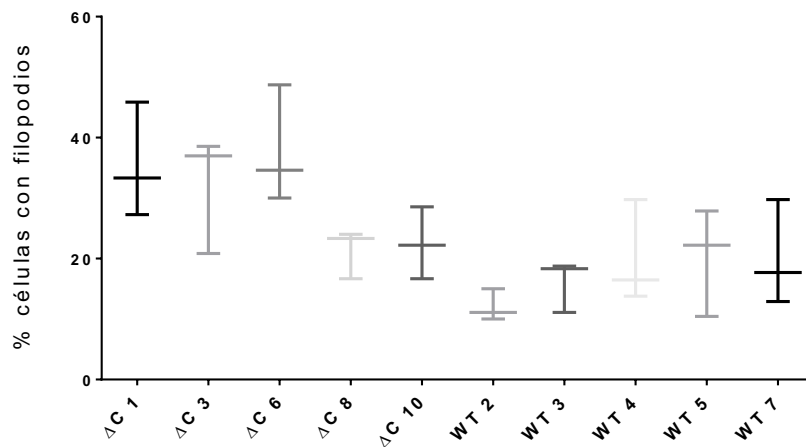
Anexo 9: Evaluación codistribución señales HA, Scar y Actina en hemocitos que expresan distintas versiones de Pelado. Se utilizaron distintas líneas para cada versión de Pelado. Para este experimento se mantuvieron los individuos a 18°C, para así reducir sus niveles de expresión. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m.



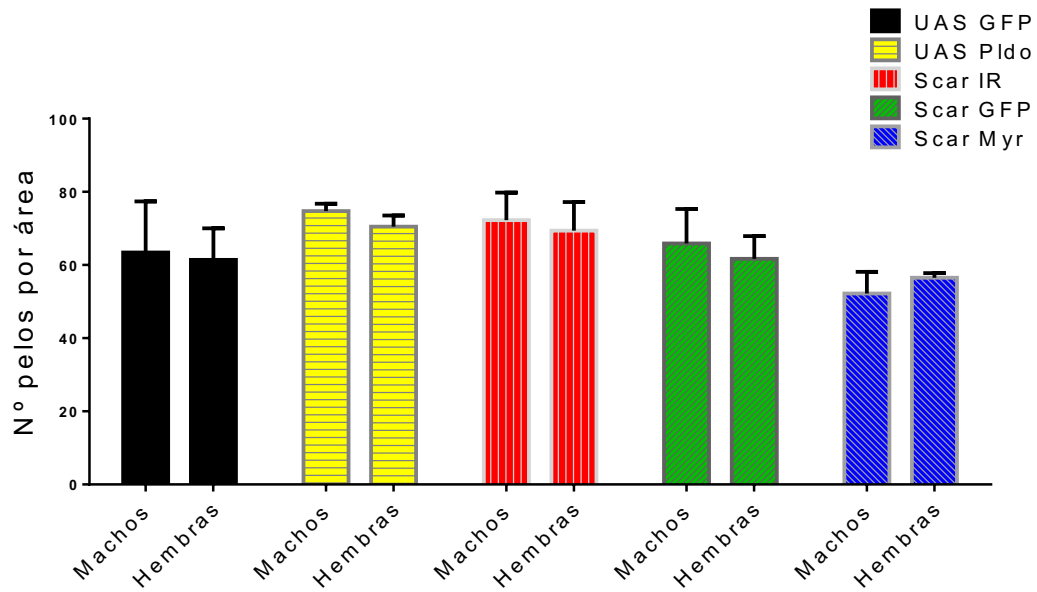
Anexo 10: Evaluación de reversión del fenotipo mutante de *pelado* en alas adultas, expresando distintos componentes previamente analizados como Diaphanous, Actina y pérdida de función de Scar. En la mayoría de los casos analizados se observa que la reversión del fenotipo no es del todo completa, pero sí se observa que el área con fenotipo es considerablemente más reducido en comparación con el mutante por sí solo. La barra de tamaño corresponde a 100  $\mu$ m.



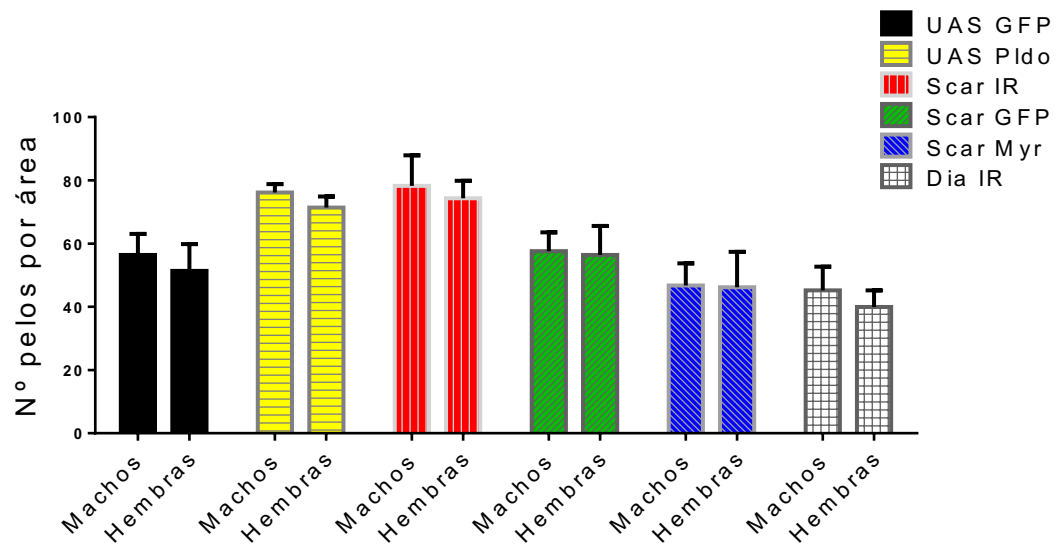
Anexo 11: Evaluación de la localización de Mwh en condiciones de *pelado* mutante. Las líneas punteadas encierran a células mutantes mientras el resto son células silvestres. No se observan mayores diferencias, tanto en apical como en basal. La barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m.



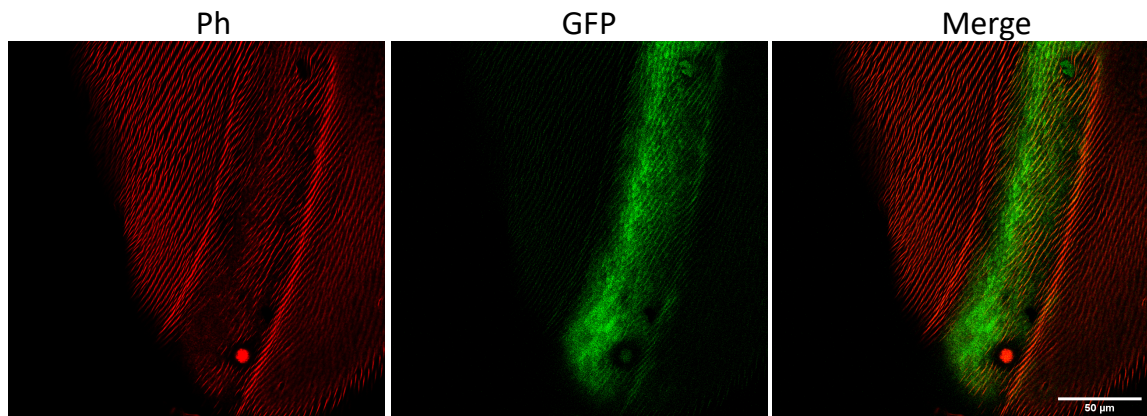
Anexo 12: Cuantificación donde se muestra el porcentaje de células que forman filopodios en las distintas líneas de moscas que expresan Pelado mutante, que carece del extremo C-terminal ( $\Delta C$ ) y de las distintas versiones silvestre de Pelado (WT). Cabe destacar que, en este caso, todas las líneas analizadas poseen el transgen en heterocigosis.



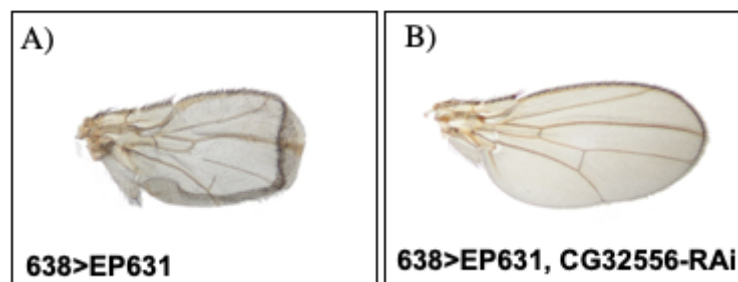
Anexo 13: Comparación en la cuantificación de número de pelos por área entre machos y hembras, expresando cada transgen en la zona *patch* del ala.



Anexo 14: Comparación en la cuantificación de número de pelos por área entre machos y hembras, expresando cada transgen junto a la pérdida de función de *pelado* en la zona *patch* del ala.



Anexo 15: Zona de expresión del *driver* Patch (Ptc Gal4). Como se observa en la figura, la zona de expresión de Patch comprende la zona que está entre las venas L3 Y L4 del ala. Dicha zona se observa mediante el uso del marcador GFP. En paralelo se está expresando el RNA interferente de Pelado. La expresión de GFP no es homogénea en dicha zona, observándose claramente algunas zonas donde el verde de GFP es más intenso, lo que indica que esa zona tiene una mayor expresión del transgen y coincide con la zona la zona donde el fenotipo de pérdida de función de Pelado es mayor. Esto explica porqué en las distintas alas adultas analizadas el fenotipo no es homogéneo, observándose que incluso en algunas células el pelo se forma, a pesar de estar en la zona de expresión de Patch.



Anexo 16: A) Fenotipo generado por EP631 y B) reversión observada con el RNA interferente contra CG32556 (*chascon*).