

UCH-FC
Biotecnología
F224

C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“FUNCIÓN DE RHOGEF3 EN LA TUBULOGÉNESIS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Por

LEANDRO ANTHONY EMMANUEL FARÍAS AGUILERA

Dra. Verónica Cambiazo
Directora de Seminario de Título

Dr. Miguel Allende
Profesor Patrocinante de Seminario de Título

Enero de 2013
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Leandro Anthony Emmanuel Farías Aguilera: "FUNCIÓN DE RHOGEF3 EN LA TUBULOGÉNESIS DE *Drosophila Melanogaster*"** ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Liliana Verónica Cambiazo Ayala
Directora Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Dr. Miguel Allende Connely
Profesor Patrocinante



Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alvaro Glavic Maurer
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, marzo de 2013

Biografía



Leandro Farías nació un 27 de mayo de 1987, en la ciudad de Antofagasta, es en ese momento y lugar donde comienza su vida, hijo de Leonardo Farías Vásquez y Margarita Aguilera Ochoa, Hermano de Leonardo Farías A. y de Benjamín Farías Aguilera. Cuando decide emprender su camino como científico ingresa al programa de Ingeniería en Biotecnología Molecular en el año 2007, en la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En el 2011 inició su seminario de título en el laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Verónica Cambiazo, trabajo que el día de hoy ve la luz...

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a todas las personas que estuvieron conmigo durante esta gran travesía científica.

Les dedico este gran trabajo de forma especial a mis padres Margarita Aguilera y Leonardo Farías V. ya que con el apoyo que siempre me dieron este seminario de título se pudo concretar.

También dedicárselo a mis hermanos Leonardo Farías A. y Benjamín

Farías A.

Finalmente a la mujer que estuvo a mi lado durante todo este camino, Jannina Cisterna Contreras, que estuvo cuando estaba complicado para darme unas palabras de apoyo y soluciones a los problemas que se dieron en el trayecto de este trabajo.

Agradecimientos.



Quiero agradecer a mis amigos que me ayudaron y comprendieron el camino de científico que decidí seguir.

Agradecer a mis amigos del laboratorio Francisco Altimiras y Esteban Gárate, que siempre se dieron el tiempo para poder discutir resultados y así ayudarme a encontrar soluciones.

También a mis compañeros de trabajo que me facilitaron el trabajo dentro de este laboratorio explicándome los caminos que uno tiene para solucionar problemas.

Finalmente agradecer a todas las personas que me ayudaron de alguna u otra forma para que el desarrollo de este trabajo diera frutos.

Índice

Índice de Tablas	viii
Índice de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Resumen	xiii
Introducción	- 1 -
1. Morfogénesis de glándulas salivales y tráqueas en D. melanogaster... -	1 -
1.1. Glándulas salivales.....	- 1 -
1.2. Sistema traqueal en D. melanogaster.....	- 4 -
2. Función de las GTPasas en la morfogénesis tubular..... -	9 -
3. RhoGEF3 un nuevo GEF en Drosophila melanogaster. -	10 -
HIPOTESIS.....	- 11 -
Objetivo General.....	- 11 -
Objetivos Específicos.....	- 11 -
Materiales y Métodos.....	- 12 -
1. Materiales.....	- 12 -
1.1. Cepas de Drosophila melanogaster.....	- 12 -
1.2. Vectores.....	- 13 -
1.3. Partidores.....	- 14 -
1.4. Cepas Escherichia coli.....	- 15 -

2. Métodos	- 16 -
2.1. Colecta de embriones e inmunofluorescencia.	- 16 -
2.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	- 17 -
2.3. PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).	- 18 -
2.4. Preparación y transformación de células competente.....	- 19 -
2.4.1. Preparación de células competentes.....	- 19 -
2.4.2. Transformación bacteriana.....	- 20 -
2.5. Extracción de DNA plasmidial.....	- 20 -
2.6. Electroforesis de DNA.....	- 21 -
2.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.	- 21 -
2.7.1. Expresión de proteína fusión a GST	- 21 -
2.7.2. Solubilización de proteína fusión a GST.	- 22 -
2.7.3. Purificación de la proteína de fusión a GST.	- 23 -
2.8. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	- 25 -
2.9. Cuantificación de proteínas.	- 25 -
2.10. Extracción de proteínas desde larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	- 25 -
2.11. Western Blots.	- 26 -
2.12. Análisis estadísticos.....	- 27 -
 Resultados	 - 28 -
 1. Determinar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 en la formación de glándulas salivales y tráqueas.....	 - 28 -

1.1. Función de RhoGEF3 en las glándulas salivales.....	- 28 -
1.2. Función de RhoGEF3 en la formación del sistema traqueal.	- 31 -
1.3. Disminución en la expresión del gen <i>rhogef3</i>	- 37 -
2. Identificación <i>in vivo</i> de la GTPasa blanco de RhoGEF3.	- 39 -
2.1. GTPasas involucradas en el desarrollo de las glándulas salivales.....	- 39 -
2.2. GTPasas involucradas en el sistema traqueal.	- 42 -
3. Generación de un anticuerpo α-RhoGEF3 y analizar la localización <i>in vivo</i> de la proteína RhoGEF3.....	- 44 -
3.1. Generación de una proteína recombinante de RhoGEF3.....	- 44 -
3.2. Producción de proteína de fusión a GST.	- 47 -
3.3. Purificación de las proteínas RhoGEF3-NH ₂ y RhoGEF3-COOH.	- 50 -
3.4. Ensayos de Western blot con el anticuerpo α -RhoGEF3.....	- 52 -
 Discusión	- 54 -
1. Función de RhoGEF3 en las glándulas salivales.....	- 54 -
2. Función de RhoGEF3 durante el desarrollo del sistema traqueal.....	- 56 -
3. Generación de anticuerpo α-RhoGEF3.	- 58 -
 Conclusiones	- 60 -
 Bibliografía	- 61 -

Indice de Tablas

Tabla 1: Partidores utilizados en el proceso de clonamiento del gen *rhogef3*. - 14 -

Tabla 2: Partidores utilizados en la realización del qPCR para *rhogef3*. - 15 -

Índice de figuras.

Figura 1: Desarrollo de las glándulas salivales.....	- 3 -
Figura 2: Migración e intercalación celular.....	- 6 -
Figura 3: Desarrollo del sistema traqueal de <i>D. melanogaster</i>	- 8 -
Figura 4: Efecto del silenciamiento del gen <i>rhogef3</i> en las glándulas salivales.....	- 30 -
Figura 5: Morfogénesis traqueal en <i>Drosophila</i>	- 32 -
Figura 6: Porcentaje de fenotipos mutantes.....	- 35 -
Figura 7: Fenotipo asociado a la pérdida de función de <i>rhogef3</i> ..	- 36 -
Figura 8: Expresión relativa de <i>rhogef3</i>	- 38 -
Figura 9: Fenotipo de embriones que expresan el dominante negativo Cdc42.....	- 41 -
Figura 10: Fenotipos de embriones que expresan un dominante negativo de Rac1 ...	- 43 -
Figura 11: Generación proteínas de fusión..	- 46 -
Figura 12: Producción de GST-RhoGEF3-NH ₂ y GST-RhoGEF3-COOH..	- 49 -
Figura 13: Purificación de RhoGEF3-COOH.	- 51 -
Figura 14: Western blot con el suero α -RhoGEF3.	- 53 -

Lista de abreviaturas.



BSA	Bovine Suerum Albumin, suero de albumina bovina.
cDNA	DNA complementario.
Cp	Crossing point, ciclo umbral.
DH	Dbl Homology Domain, dominio de homología Dbl.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dsRNA	RNA doble hebra.
DB	Dorsal Branch, brazo dorsal.
DT	Dorsal Trunk, tronco dorsal.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid, ácido etilenglicol tetra acético.
FGF	Fibroblast Growth Factor, factor de crecimiento de fibroblastos.
GAP	GTPase Activating Protein, proteína activadora de GTPasa.
GB	Ganglionic Branch, brazo ganglionar.
GFP	Green Fluorescent Protein, proteína fluorescente verde.
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor, inhibidor de la disociación del nucleótido guanina.
GDP	Guanosin Difosfato.
GEF.	Guanine nucleotide Exchange factor, intercambiador de nucleótidos de guanina.
GST	Glutación S-Transferasa.

GTP	Guanosin Trifosfato.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
LB	Lysogeny Broth, caldo de lisogenia.
LT	Lateral Trunk, tronco lateral.
OD	Optical Density, densidad óptica.
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis, electroforesis en geles de poliacrilamida.
PBS	Phosphate Buffer Saline, buffer de fosfato salino.
PCR	Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa.
PH	Pleskstrin Homology Domain, dominio de homologia Pleskstrin.
PVDF	Polivinilidene fluoride, fluoruro de polivinilideno.
qPCR	Quantitative PCR, PCR cuantitativo.
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay, ensayo de radio inmunoprecipitación.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNAi	RNA interferente.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-qPCR	Real Time Quantitative PCR, PCR cuantitativo en tiempo real.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, dodecil sulfato de sodio.
SH3	Sarc Homology Domain, dominio de homología Sarc.
STE	Sodium/Tris/EDTA.
TAE	Tris/Acetate/EDTA.
TC	Transverse Connective, conectivo transverso.

Tm	Melting Temperature, temperatura de desnaturalización térmica.
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.
UAS	Upstream activation Sequence, secuencia de activación río arriba.
VB	Visceral branch, brazo visceral.

Resumen

Los sistemas de tráqueas y glándulas salivares de *Drosophila melanogaster* han sido utilizados como modelos para entender, desde un punto de vista celular y molecular, cómo las células epiteliales se organizan en órganos tubulares de variadas formas y tamaños. Durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* las células que forman las glándulas salivales y el sistema traqueal son sometidas a varios movimientos coordinados para producir su reordenamiento espacial y temporal. Los distintos movimientos celulares pueden ser regulados por procesos tales como la reorganización del citoesqueleto de actina, del citoesqueleto de microtúbulos y el transporte de vesículas, que son en su gran mayoría dependientes de la actividad de RhoGTPasas. La actividad de las GTPasas, a su vez, es regulada por las proteínas GEFs (Guanine exchange Factors) y GAPs (GTPase Activating Proteins).

En este seminario de título se propuso estudiar la participación de una nueva proteína GEF en *Drosophila* denominada RhoGEF3, dentro del desarrollo de los órganos tubulares glándulas salivales y tráqueas, por lo tanto se formuló como hipótesis que “la proteína RhoGEF3 está involucrada en la tubulogénesis de glándulas salivales y sistema traqueal en el embrión de *Drosophila*”. Para abordar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos: (1) Determinar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 sobre la formación de glándulas salivales y tráquea. (2) Identificar *in vivo* la GTPasa activada por RhoGEF3. (3) Generar un anticuerpo α -RhoGEF3 y analizar la localización de la proteína RhoGEF3.

Con el fin de abordar los objetivos (1) y (2) se utilizó el sistema GAL4-UAS (Brand y Perrimon, 1993). Se analizó la pérdida de función mediante el silenciamiento del gen *rhogef3*, el fenotipo asociado a la disminución de la expresión de *rhogef3* se estudió a través de inmunofluorescencia indirecta, de la misma forma se procedió para el análisis fenotípico de la pérdida de función de las RhoGTPasas. Este estudio reveló que la proteína RhoGEF3 está involucrada en el desarrollo de las glándulas salivales y del sistema traqueal, y además sugirió que Rac1 es la GTPasa blanco de RhoGEF3 dentro del proceso de formación del sistema traqueal.

La creación de un anticuerpo que contempla el objetivo (3) se llevó a cabo gracias a la purificación de una proteína recombinante, la cual contenía un fragmento de RhoGEF3 fusionada a GST. La proteína fusión nos permitió generar un anticuerpo que reconoce la proteína RhoGEF3 mediante Western blot. En experimentos en curso nos encontramos en la optimización de este anticuerpo para el reconocimiento de la proteína nativa y de esta manera realizar un estudio más profundo de la función de RhoGEF3.

Introducción

La organización de estructuras tubulares es un proceso conservado del desarrollo de distintos organismos, desde insectos hasta mamíferos. En mamíferos adultos los órganos tubulares incluyen el sistema respiratorio, vascular, digestivo y excretor, y también órganos secretores como páncreas, próstata, glándulas salivales y mamarias. Muchas de estas estructuras son homólogas en *Drosophila melanogaster*, por lo tanto, el estudio de la tubulogénesis en este modelo nos puede ayudar a comprender los distintos procesos morfogenéticos involucrados en el desarrollo de órganos tubulares en organismos más complejos.

Para conocer en mayor profundidad el desarrollo de las estructuras tubulares, nos centraremos en las glándulas salivales y en el sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* con el fin de analizar la formación de un órgano tubular no ramificado y ramificado, respectivamente. Ambos órganos comienzan a diferenciarse en el mismo estado de desarrollo embrionario a partir de grupos de células epiteliales, las cuales a través de cambios coordinados de forma, reordenamiento espacial y migración inician la formación de las estructuras tubulares.

1. Morfogénesis de glándulas salivales y tráqueas en *D. melanogaster*.

1.1. Glándulas salivales.

Las glándulas salivales son un órgano relativamente simple, que consta de dos

tubos secretores, los cuales se unen mediante sus ductos salivales para formar un ducto común, generando un órgano en forma de “Y”.

Las glándulas salivales se forman durante la embriogénesis a partir de un grupo pequeño de células epiteliales ubicadas en el ectoderma ventral del parasegmento 2, esta ubicación es determinada por un complejo transcripcional, codificado por los genes de expresión ventral *Sex combs reduced (Scr)*, *extradenticle (exd)* and *homothorax (hth)*, entre los cuales la expresión de *scr* está restringida espacialmente al sector ventral del parasegmento 2 (Henderson y Andrew 2000; Abramsy cols. 2003). Dos grupos de aproximadamente 100 células cada uno ubicadas lateralmente en este primordio de células epiteliales originaran los tubos secretores, mientras que 55 células de la porción central del primordio formaran los ductos salivales (figura 1), estos destinos son mediados por una fina regulación morfogénica (Kuo y col. 1996; Haberman y col. 2003; Kerman y col., 2006).

Durante el estadio 10 de la embriogénesis, las células laterales del primordio se alargan en el eje apical-basal cambiando su forma de cuboidal a columnar para formar las placodas precursoras de los tubos secretores (figura 1, Abrams y col., 2003). Las células de las placodas experimentan un proceso altamente regulado, que coordina la constricción apical de actomiosina y la migración nuclear hacia la región basal, para cambiar la forma celular de columnar a piramidal lo que impulsa la invaginación de este grupo celular (Pirraglia y Myat 2010a). Concomitante con la invaginación, las células glandulares entran en un ciclo especializado, el endociclo (endoreplicación), en el cual ciclan entre la fases G y S, provocando que el número de

células no varié durante el desarrollo del órgano, por lo tanto la formación de las glándulas salivales depende solo del cambio de forma y del tamaño celular (Smith y Orr-weaver 1991).

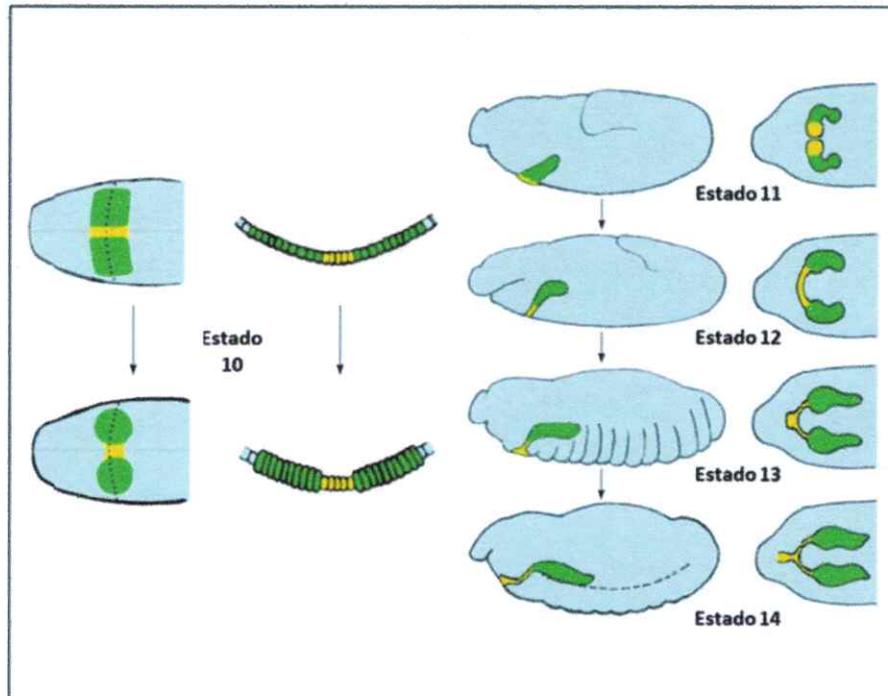


Figura 1: Desarrollo de las glándulas salivales. La ilustración muestra los cambios y procesos que son sometidas las células para la formación del órgano salival, desde el estado 10 hasta el estado 14. De color amarillo se indican las células que dan origen al ducto salival y en verde se indican las células que forman las glándulas secretoras (Abrams y cols. 2003).

El proceso de internalización de las células de la glándula salival culmina en el momento que la región más distal del tubo entra en contacto con las células mesodermales, hecho que ocurre en el estado 12 del desarrollo embrionario y que da lugar a la migración de la glándula hacia el extremo posterior del embrión (Bradley y col, 2001, 2003). Contemporáneo con la internalización y migración de las células, se inicia la elongación del lumen de la glándula salival, a través de un mecanismo que involucra la generación de membrana apical mediante dos procesos, uno involucra la agregación directa de lípidos a la membrana mediante transporte de vesículas hacia el extremo apical (Myat y Andrew, 2002; Abrams y col., 2003; Pirraglia y Myat, 2010a), y el otro proceso implica la formación y disolución dinámica de las uniones adherentes entre las células salivales (Pirraglia y Myat, 2010b).

1.2. Sistema traqueal en *D. melanogaster*.

El sistema traqueal es el órgano respiratorio de *Drosophila melanogaster*. Es una red tubular epitelial que tiene su entrada en los espiráculos y provee oxígeno a todos los tejidos del organismo. Durante el estadio 10 de la embriogénesis el sistema traqueal inicia su formación a partir de 10 pequeños grupos de aproximadamente 40 células situadas a ambos lados del embrión, estos primordios se ubican desde el segmento torácico 2 hasta el segmento abdominal 8. Mediante una serie de movimientos celulares coordinados, las células epiteliales de los primordios contraen su extremo apical y se invaginan, en un proceso similar al

descrito para las células de las glándulas salivales. Al momento de invaginarse, las células traqueales entran en su último ciclo mitótico. Una vez internalizadas las células, forman pequeños sacos epiteliales de 80 células cada uno, generando un sistema traqueal de 1600 células, ya que la formación de la red traqueal se deberá exclusivamente a los cambios de forma y tamaño de estas células (Kerman y col., 2006).

Las actividades coordinadas de los factores de transcripción temprano regulan la expresión del gen *breathless (btl)*, el cual codifica para un receptor de Fibroblast Growth Factor (FGF), esencial para la migración celular dentro del desarrollo del sistema traqueal. Una vez que las células traqueales se han internalizado formando los sacos traqueales, pequeños grupos de células en distintas posiciones dentro de los sacos inician la migración para formar las principales ramas del sistema traqueal. En este proceso, las células de la tráquea generan filopodios hacia las células no traqueales que producen el ligando Branchless (Bnl), ligando de tipo FGF. Las células que dirigen esta migración son las que reconocen el ligando Bnl siendo conocidas como las células de la punta, las cuales en el momento de la migración arrastran consigo las demás células traqueales en un proceso de intercalación celular (Caussinus y col., 2008). Este proceso se inicia a partir de un brote de ramificación, dirigido por las células de la punta, formado por un tubo compuesto por células organizadas en pares a lo largo del eje de este brote (figura 2A). Luego cada célula forma una primera unión autoadherente en un punto situado en los extremos opuestos con respecto a su par a lo largo del eje proximal-distal, a medida que progresa la formación de estas uniones las dos células parecen

deslizarse una sobre otra e intercalarse (figura 2B, Ribeiro y col., 2004). Posteriormente, el lumen de los tubos del sistema traqueal se expande de manera uniforme gracias a la secreción controlada de quitina hacia el lumen, y luego que los tubos traqueales han alcanzado la madurez, la matriz basada en quitina es removida del lumen traqueal (Affolter y Caussinus, 2008).

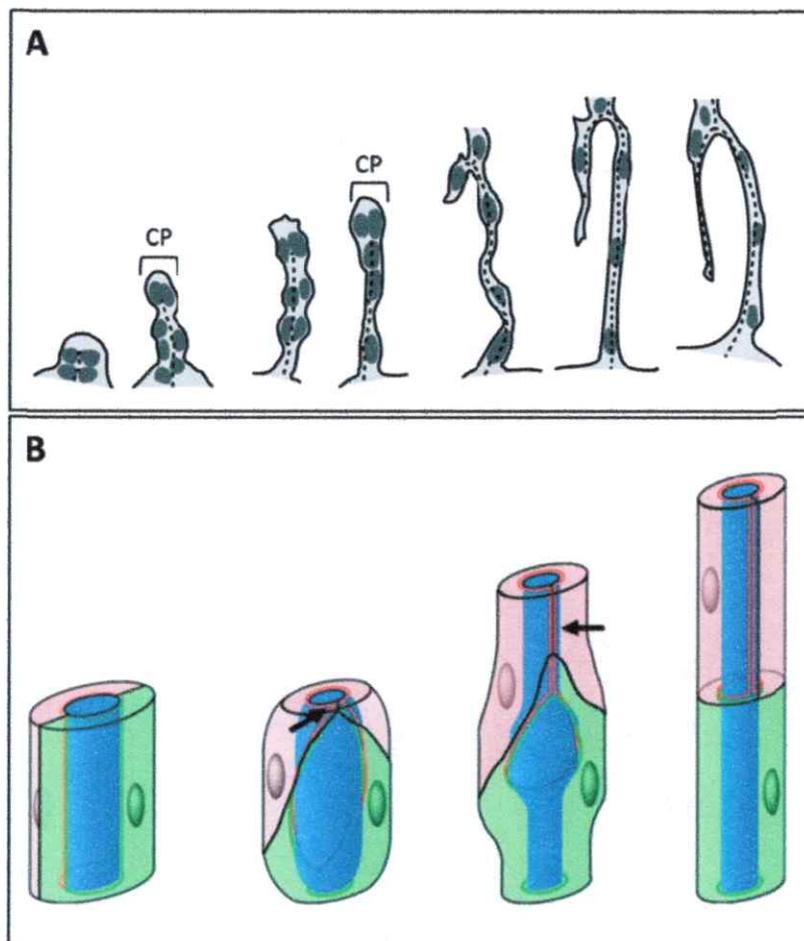


Figura 2: Migración e intercalación celular. (A) Migración celular dirigidas por las células de la punta (CP) desde un brote traqueal que dará origen a un brazo traqueal (Samakovlis y col., 1996). Esta migración provoca la intercalación celular (B), la cual muestra como progresan las uniones autoadherentes en las células traqueales (flechas) (Ribeiro y col. 2004)

La migración traqueal es un proceso que se inicia una vez formado los sacos traqueales donde las células se dirigen hacia direcciones que tienen un patrón bastante estereotipado, para formar las principales ramas de la red tubular traqueal (figura 3). La arteria mayor de la tráquea es el tronco dorsal (DT), el cual conecta todos los segmentos traqueales (o metámeros) a lo largo del eje anterior-posterior del embrión. Una conexión más fina entre todos los metámeros se forma más lateralmente y es denominada como tronco lateral (LT). El conectivo transversal (TC) conecta el DT y LT dentro de cada metámero. Adicionalmente, dentro de cada segmento traqueal surgen otros brazos principales, dentro de los cuales se incluyen el brazo dorsal (DB) que migra dorsalmente para proveer de oxígeno a las células ubicadas en la sección dorsal del embrión; el brazo ganglionar (GB), el cual migra ventralmente para suministrar oxígeno al sistema nervioso central de *Drosophila*; y el brazo visceral (VB) que se forma de la mayoría de los metámeros que migra internamente para oxigenar las vísceras del embrión. Finalmente, la red tubular del sistema traqueal está constituida por cuatro tipos de tubos, tipo I, II, III y IV, que se diferencian por el número de células que cubren el lumen y por el diámetro del tubo (Kerman y col., 2006).

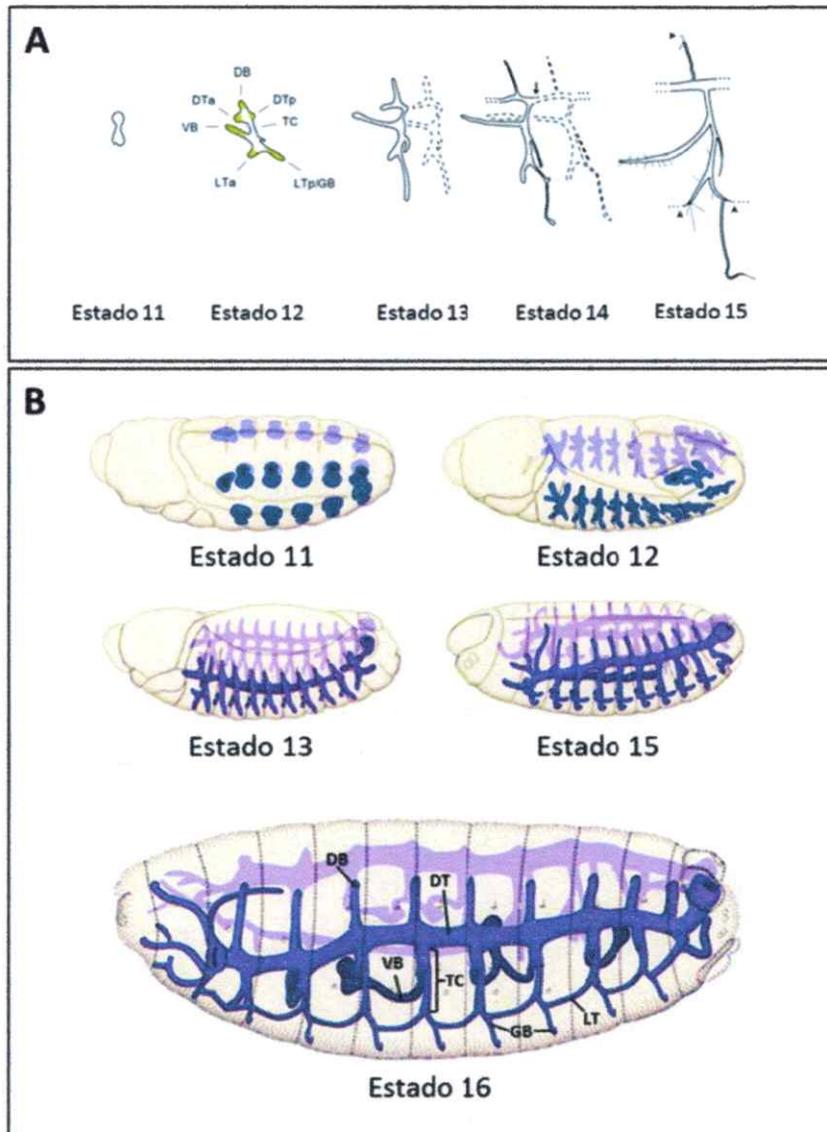


Figura 3: Desarrollo del sistema traqueal de *D. melanogaster*. (A) Migración de las células de la punta para formar los distintos brazos traqueales del sistema. En el estado 14 se indica con una flecha la fusión del DT. En el estado 15 se indica con una cabeza de flecha la fusión de los DB y de los LT (Samakovlis y col., 1996). (B) Desarrollo de la tráquea, desde el estado 11 donde se forman los sacos traqueales hasta el estado 16, en el cual el sistema traqueal está prácticamente formado en su totalidad (Flybase). Tronco dorsal (DT), tronco dorsal anterior (DTa), tronco dorsal posterior (DTp), tronco lateral (LT), tronco lateral anterior (LTa), tronco lateral posterior (LTp), conectivo transverso (TC), brazo dorsal (DB), brazo ganglionar (GB), brazo visceral (VB).

2. Función de las GTPasas en la morfogénesis tubular.

Los cambios de formas y movimientos celulares durante el desarrollo de *D. melanogaster* se deben a la reorganización del citoesqueleto de actina. El control de la organización de los filamentos de actina en estructuras especializadas de la célula depende de la actividad de la familia de las RhoGTPasas: Rho, Rac y CDC42 (Jaffe y Hall, 2005). Estas proteínas ciclan entre un estado inactivo (unido a GDP) y un estado activo (unido a GTP), en el cual interaccionan con diferentes efectores para realizar las distintas funciones celulares. Las proteínas responsables del estado de activación de las RhoGTPasas son: los GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), los cuales capturan a la RhoGTPasa en su estado inactivo, los GAPs (GTPase Activating Proteins), los que estimulan la actividad intrínseca de las GTPasas, y finalmente las GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), los cuales facilitan el intercambio de GDP por GTP, favoreciendo así la activación de las RhoGTPasas (Schmidt y Hall, 2002).

Durante la tubulogénesis embrionaria las GTPasas regulan varios de los procesos morfogenéticos que sustentan la diferenciación de las glándulas salivales y de la tráquea. Es así como Rho1 dirige la constricción apical de las células de las glándulas salivales (Xu y col., 2008) y del sistema traqueal (Brodu y Casanova, 2006), promoviendo su invaginación. Por otro lado, las Rac GTPasas, Rac1, Rac2 y Mtl están involucradas en la reorganización de las uniones células-células mediadas por E-cadherina, afectando la migración celular durante el desarrollo de las glándulas salivales (Pirraglia y col., 2006; Pirraglia y Myat, 2010;), y en el desarrollo del

sistema traqueal participan tanto en la migración como en la intercalación celular (Chihara, 2003). Por su parte, Cdc42 controla el tamaño del lumen de las glándulas salivales a través de un mecanismo que involucra la endocitosis de E-cadherina (Pirraglia y col., 2010), y además Cdc42 está involucrada en la extensión de filopodios durante el proceso de migración del sistema traqueal (Wolf y col., 2002).

3. RhoGEF3 un nuevo GEF en *Drosophila melanogaster*.

La capacidad de las RhoGTPasas de participar en distintos procesos morfogénéticos indica la existencia de un mecanismo que permita regular espacial y temporalmente la actividad de estas proteínas. La regulación fina de las RhoGTPasas es responsabilidad de las proteínas GAPs y GEFs, las cuales permiten la activación de diversas vías de señalización. Se han identificado 22 genes que codifican potenciales RhoGEFs (FlyBase), de las cuales solo cuatro han sido funcionalmente caracterizadas en el desarrollo, demostrando la relevancia de profundizar en el estudio de estas proteínas durante la morfogénesis de *Drosophila melanogaster*. En un trabajo previo del laboratorio (Zúñiga y col., 2009) se identificó el gen *rhogef3* que codifica para un intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF. La proteína RhoGEF3 presenta varios dominios conservados como DH (Dbl Homology Domain), que define la especificidad de la proteína por una o más GTPasas; PH (Pleskstrin Homology Domain) que reconoce y se une a fosfolípidos, definiendo la localización subcelular de la proteína; y SH3 (Sarc Homology Domain), dominio que está involucrado en la interacción proteína-

proteína. Además se demostró que en células S2R+ de *Drosophila*, RhoGEF3 es necesaria para la correcta formación de lamelipodios, lo que sugiere que su función sería regular la GTPasa Rac1. Además, mediante ensayos de hibridación *in situ* se detectó la presencia de transcritos del gen *rhogef3* en glándulas salivales y sistema traqueal durante los estadios 15-16 del desarrollo embrionario de *Drosophila*, sugiriendo la presencia de la proteína RhoGEF3 en estos órganos.

HIPOTESIS.

La proteína RhoGEF3 está involucrada en la formación de las glándulas salivales y del sistema traqueal durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Objetivo General.

Determinar la función de la proteína RhoGEF3 en la tubulogénesis de *Drosophila melanogaster*, usando como modelo las glándulas salivales y el sistema traqueal.

Objetivos Específicos.

1. Determinar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 sobre la formación de glándulas salivales y tráquea.
2. Identificar *in vivo* la GTPasa candidata para ser activada por RhoGEF3.
3. Generar un anticuerpo α -RhoGEF3 y analizar la localización de la proteína RhoGEF3 en *D. melanogaster*.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Cepas de *Drosophila melanogaster*.

Se utilizaron cuatro cepas de *D. melanogaster* que expresan RNAs de doble hebra (dsRNA) diseñados para silenciar el gen *rhogef3*, estas fueron:

- i. w^{1118} ; P{GD7547}v31718 obtenida de Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC).
- ii. NIG1225R-2 de Fly Stocks of National Institute of Genetics (NIG – FLY).
- iii. $y^1 v^1$; P{TRiP.JF01153}attP2 proveniente de Bloomington *Drosophila* Stock Center.
- iv. $y^1 v^1$; P{TRiP.JF01154}attP2 de Bloomington *Drosophila* Stock Center.

Todas estas cepas de *Drosophilas* expresan dsRNAs dirigidos contra diferentes regiones exónicas de *rhogef3* bajo el control del sistema GAL4-UAS (Brand y Perrimon 1993).

Las siguientes cepas fueron obtenidas de la colección de Bloomington Stock Center de la Universidad de Indiana, Estados Unidos:

- i. w^* ; P{GawB}332.3: dirige la expresión de GAL4 en glándulas salivales y amnioserosa.
- ii. w^* ; P{GAL4-btl.S}2, P{UASp-Act5C.T:GFP}2: dirige la expresión del factor de transcripción GAL4 en células traqueales y además expresa la proteína de fusión actina-GFP en células traqueales.

- iii. w*; P{UAS-lacZ.B}Bg4-2-4b: expresa el gen *lacZ* bajo la dirección de la secuencia UAS.
- iv. y¹ w*; P{UAS-Rac1.L89}6: expresa el dominante negativo Rac1L89 bajo el promotor UAS.
- v. y¹ w*; P{UAS-Rac1.N17}1: expresa el dominante negativo Rac1N17 bajo el promotor UAS.
- vi. w*; P{UAS-Cdc42.F89}3: expresa el dominante negativo Cdc42F89 bajo el promotor UAS.
- vii. w*; P{UAS-Cdc42.L89}4: expresa el dominante negativo Cdc42L89 bajo el promotor UAS.
- viii. w*; P{UAS-Cdc42.N17}3: expresa el dominante negativo Cdc42N17 bajo el promotor UAS.

1.2. Vectores.

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron los siguientes vectores:

- i. pGEMT-Easy (Promega): vector que contiene los promotores SP6 y T7 flanqueando la región de clonamiento y una secuencia que codifica para la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina. Este fue utilizado para clonar productos de PCR en los procesos de subclonamiento.
- ii. pGEX-6P1 (General Electric HealthCare): vector de expresión en bacterias.

Contiene un sitio de multiclonamiento en la región correspondiente al C-terminal de GST (Glutación S-Transferasa), permitiendo generar una proteína de fusión a GST, cuya expresión es inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

- iii. pGIBS-LYS: Adquirido en American Type Culture Collection (ATCC, cat. #87482,). Derivado del vector pBluescript II KS+, posee un marcador de selección ampR y un origen de replicación pMB1, fl. El gen posee en su extremo una secuencia de poliA agregada artificialmente y un sitio de unión para la RNA polimerasa T3. Fue utilizado en la síntesis *in vitro* del RNA de Lisina.

1.3. Partidores.

- Clonamiento de *rhogef3*.

Los partidores para realizar el clonamiento se encuentran en la Tabla 1. Se muestran los partidores que fueron usados para clonar la secuencia nucleotídica que codifica para el extremo amino y carboxilo de la proteína RhoGEF3 de *D. melanogaster*.

Tabla 1: Partidores utilizados en el proceso de clonamiento del gen *rhogef3*.

	Partidor	Secuencia
Amino	DmRhoGEF3-s13	5'-ATGATGGAATTCATGGTACATATCACTTTCGGTC-3'
	DmRhoGEF3-a16	5'-TCATCACTCGAGACTATCGCTGTCGCTATCCTC-3'
Carboxilo	DmRhoGEF3-s14	5'-ATGATGGAATTCCTATAACGTATCAGAGATGACTG-3'
	DmRhoGEF3-a17	5'-TCATCACTCGAGCGCTGAGGAGCTGTCCGTTG-3'

- PCR cuantitativo (qPCR).

Los partidores para realizar el PCR cuantitativo (qPCR) se encuentran en la Tabla 2. En esa tabla se muestran la pareja de partidores 1 y 2, P1 y P2 respectivamente, partidores que reconocen diferentes regiones del gen *rhogef3*.

Tabla 2: Partidores utilizados en la realización del qPCR para *rhogef3*.

	Partidor	Secuencia	Tm (°C)
P1	DmRhoGEF3RT-s1	5'-CATACCCTCGAGCCCTGA-3'	56
	DmRhoGEF3RT-a1	5'-ACCGTCTGTATCGTTCCT-3'	56
P2	DmRhoGEF3RT-s2	5'-GTGCTCGCTTCTTCCTGC-3'	56
	DmRhoGEF3RT-a2	5'-AGATGAAGTGGCTCCGCTT-3'	56

1.4. Cepas *Escherichia coli*.

Se utilizaron las siguientes cepas de bacterias para el desarrollo de esta tesis

- DH5 α (Invitrogen, F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1*

hsdR17 (*rk*⁻, *mk*⁺) *phoA supE44* λ - *thi*⁻1 *gyrA96 relA1*) de *Escherichia coli*.

Esta cepa contiene un marcador (ϕ 80*lacZ* Δ M15) que provee complementación al gen de la β -galactosidasa presente en el vector pGEMT-Easy, permitiendo la identificación por color de las colonias transformantes positivas.

ii. BL21 de *Escherichia coli*. Esta cepa fue utilizada para la expresión de proteínas recombinantes ya que carece de proteasa lon y de la proteasa de membrana externa ompT, que podrían degradar proteínas recombinantes durante su expresión.

2. Métodos.

2.1. Colecta de embriones e inmunofluorescencia.

Los embriones *D. melanogaster* fueron ovopositados en una placa de agar al 2% en jugo de uva y extraídos de la placa con solución PBS (Buffer de Fosfato Salino, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄•7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH ~7,3) conteniendo 0,05% v/v Tritón (PBST). Los embriones fueron descorionizados con 50% v/v de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) en PBST y desvitelinizados con 0,05 M EGTA en metanol 100%. Los embriones fueron fijados con una solución de heptano: PEM (0,1M Hepes pH 6,8, 0,001M EGTA, 0,001 M MgCl₂): 37% Formaldehido (Merck) en una razón de 3:3:1. Los embriones se almacenaron en metanol 100% a -20°C. Para realizar la inmunofluorescencia los embriones fueron rehidratados con PBST, se bloquearon con BSA (suero de albumina bovina) al 5% p/v en PBST. Luego los embriones se incubaron con los anticuerpos primarios α -Crumbs (1:50), α - β -galactosidasa (1:250), ambos anticuerpos fueron obtenidos de Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), y α -GFP (1:500), proveniente de Invitrogen. Todos estos anticuerpos fueron diluidos en una solución con BSA al 5% p/v en PBST, durante 16 horas a 4°C en agitación. Se

utilizaron los anticuerpos secundarios α -rabbit 488 (1:800) y α -mouse Cy3 (1:800), ambos anticuerpos provenientes de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Además se utilizó To-pro (1:250, Invitrogen), molécula que se une al DNA, los anticuerpos secundarios y el To-pro fueron diluidos en una solución con BSA al 5% p/v en PBST. Los embriones fueron montados en un medio móvil, el cual consiste en glicerol y 2 M Tris pH 8,8 en una razón de 9:1. Este medio de montaje nos permitió orientar los embriones para obtener una mejor imagen de la inmunofluorescencia.

Finalmente las preparaciones de inmunofluorescencia de embriones fueron examinadas en el Microscopio Confocal Zeiss LSM 510 Meta, las imágenes fueron adquiridas con el software LSM Examiner (Zeiss) y tratadas con los programas ImageJ y Adobe Photoshop CS.

2.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

El RNA total fue extraído desde 100 μ l de embriones homogenizados en 1 ml del reactivo TRIzol® (Ambion). Luego de agregar 250 μ l de cloroformo, la mezcla fue sometida a agitación y centrifugada a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 min a 4°C, y el RNA presente en la fase acuosa fue rescatado. El RNA total se precipito usando un volumen de isopropanol, seguido de una centrifugación a 13000 rpm por 15 min a 4°C. El RNA precipitado se lavó con etanol 75% frio, centrifugando a 13000 rpm por 15 min a 4°C, finalmente el RNA fue resuspendido en 20 μ l de agua libre de nucleasas. Se obtuvo un rendimiento

promedio de 5,80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para embriones controles y de 10,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para embriones tratados con dsRNA contra *rhogef3*. Todas las muestras fueron llevadas a una concentración final de 500 ng/ μl .

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV RT, Promega) con 0,5 μg de partidores oligo dT 15 primers (Promega). La retrotranscripción se realizó a partir de 2 μg de RNA total, además a esta reacción se le agregó antes de comenzar 0,2 μg de un RNA *spike* poliadenilado (Lisina proveniente de *Bacillus subtilis*), el cual nos permitirá normalizar los datos. Se obtuvo una concentración final de 0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desde RNA de muestras control, y una concentración de 1,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cDNA desde muestras tratadas con dsRNA. Ambas muestras fueron llevadas a una concentración final de 200 ng/ μl . La cuantificación de los ácidos nucleicos fue realizada en el equipo Nanoquant.

2.3. PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).

Para las reacciones de amplificación mediante qPCR se utilizó el sistema LightCycler® FastStar DNA Master SYBR Green I en un equipo LightCycler® 2.0 Instrument (Roche). Cada reacción fue realizada mezclando 200 ng de cDNA, 0,5 μM de cada partidor, 1 μL de FastStart Reaction Mix SYBR Green I, 1 μL de 25 mM de MgCl_2 , en un volumen final de 10 μL . EL programa de amplificación consistió en una etapa de activación a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de amplificación que consistían en 2 s de desnaturalización a 95 °C, 10 s de alineamiento a la temperatura adecuada para cada pareja de partidores y una

extensión de 15 s a 72 °C. Los niveles de expresión relativa fueron calculados a partir de los *crossing points* (Cp) en un nivel constante de fluorescencia y la eficiencia (E) de los partidores, utilizando el modelo de cuantificación relativa según Pfaffl, 2001. Brevemente, a partir de los valores de E^{Cp} de la muestra problema y del control, ambos normalizados por los valores de E^{Cp} obtenidos para el *spike* lisina, se obtienen las variaciones relativas entre las condiciones comparadas (ecuación 1).

$$\text{Ecuación 1} \quad \frac{E_{spike}^{Cp}}{E_{muestra}^{Cp}}$$

2.4. Preparación y transformación de células competente.

2.4.1. Preparación de células competentes.

En 100 ml de medio LB (Lysogeny Broth, 10 g/l Triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) se inocularon 4 ml de células *E. coli* BL 21 crecidas por 16 h a 37°C. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD) entre 0,4 – 0,6, se centrifugó por 15 min a 2.500 rpm. Las células fueron resuspendidas en 50 ml de 0,1 M CaCl₂ frío, luego se incubaron en hielo por 30 min. El cultivo se centrifugó por 15 min a 2.500 rpm y el pellet celular fue resuspendido en 3 ml de 0,1 M CaCl₂: glicerol en razón 7:3, frío. Finalmente se generaron alícuotas de 30 µl que fueron guardadas a -80°C.

2.4.2. Transformación bacteriana.

Para la transformación química, 30 μl de células competentes fueron transformadas con 120 ng de DNA plasmidial a 4°C por 30 min, luego de los cuales fueron incubadas a 42°C por 45 s y sumergidas inmediatamente en hielo por 5 min. Se agregó 1 ml de medio LB y las células fueron incubadas a 37°C con agitación vigorosa por 1,5 h, y luego fueron sembradas sobre placas de medio LB-Agar al 2% p/v suplementado con Ampicilina a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.5. Extracción de DNA plasmidial.

Miniprep: Tres mL de bacterias crecidas 16 h a 37 °C en medio LB fueron centrifugados, el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 200 μL de solución 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA), luego las bacterias fueron lisadas agregando 200 μL de solución 2 (1% p/v SDS, 0.2 M NaOH), neutralizadas con 200 μL de solución 3 (3M KCH_3CO_2 , 11.5 % v/v CH_3COOH) y finalmente centrifugadas a 13.000 x g por 15 min. El sobrenadante se mezcló vigorosamente con 600 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, y se centrifugó a 13.000 x g por 10 min, la fase acuosa rescatada fue mezclada vigorosamente con 420 μL de isopropanol y centrifugada a 13000 x g por 10 min. El precipitado fue lavado con 1 mL de Etanol al 70% v/v y centrifugado a 13000 x g por 10 min. El etanol fue descartado y el DNA fue resuspendido en 30 μL de agua. El RNA fue degradado adicionando 1 μL de RNAsa A 10 mg/mL e incubado a 37°C por 30 min. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa.

2.6. Electroforesis de DNA.

Todas las electroforesis de DNA se llevaron a cabo en geles de Agarosa al 1% p/v en solución TAE (40 mM Tris, 1.1% v/v Ácido Acético, 2 mM EDTA) conteniendo una concentración final de 0,5 µg/ml de bromuro de Etidio (EtBr). Para las mediciones de tamaño y masa fue utilizado el estándar 1 Kb Gene Ruler (Fermentas).

2.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

2.7.1. Expresión de proteína fusión a GST

Se clonaron fragmentos nucleotídicos correspondientes a los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína RhoGEF3 en el vector pGEX-6-P1. Los vectores fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21.

En 10 ml de medio LB suplementado con Ampicilina 50 µg/ml (LB-Amp) se inocularon 200 µl de un cultivo crecido por 16 h en medio LB-Amp a 37 °C. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar un OD entre 0,6 - 0,7. Con el fin de determinar el tiempo requerido para inducir la expresión de RhoGEF3 recombinantes se agregó IPTG a una concentración de 1 mM y luego de 1, 3, 5 y 16 h de cultivo a 37°C con agitación a 140 rpm, las células fueron centrifugadas por 5 min a 9000 rpm. El pellet celular fue resuspendido en 1 ml de PBS y se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (Halt* Protease Inhibitor Cocktails, Thermo Scientific). Las

células fueron lisadas mediante sonicación y fraccionadas en un gel de SDS-PAGE. Una vez confirmada la inducción, se generaron fracciones solubles e insolubles para analizar la presencia de la proteína fusión a GST en las distintas fases de preparación y en cada tiempo de inducción. Una vez inducida la expresión de la proteína RhoGEF3 recombinante, las células se sonicaron para provocar la lisis celular y luego se incubaron con tritón a una concentración final de 1% v/v por 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a una temperatura de 4°C, el sobrenadante fue recuperado y traspasado a un tubo nuevo (fase soluble), por otro lado, el precipitado fue resuspendido en un volumen de buffer PBS equivalente al del sobrenadante (fase insoluble). Ambas fases (soluble e insoluble) fueron fraccionadas y analizadas en un gel de SDS-PAGE.

Con el fin de determinar la concentración óptima de IPTG se procedió de manera similar utilizando 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 y 1,0 mM de IPTG por un periodo de 5 h de inducción.

2.7.2. Solubilización de proteína fusión a GST.

Las condiciones óptimas determinadas en el paso anterior fueron 5 h de inducción con 0,1 mM de IPTG. El cultivo se centrifugó a 9000 rpm por 5 min y las células fueron resuspendidas en buffer STE (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) suplementado con lisozima a una concentración de 0,67 mg/ml e incubadas 15 min en hielo. Se agregó 5 mM de Ditioneitol (DTT), inhibidores de proteasas (Halt* Protease Inhibitor Cocktails, Thermo Scientific) y sarkosyl en

distintas concentraciones, 0%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 3,0% v/v en buffer STE, para determinar la condición óptima. Las células fueron lisadas mecánicamente mediante sonicación, centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm. Tanto la fracción sobrenadante como el pellet fueron analizados mediante un gel de SDS-PAGE. La proteína GST-RhoGEF-NH₂ se solubilizó con 1,5% v/v de sarkosyl y la proteína GST-RhoGEF3-COOH con 1,0% v/v de sarkosyl.

2.7.3. Purificación de la proteína de fusión a GST.

Las proteínas de fusión a GST soluble, GST-RhoGEF-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH, fueron purificadas por cromatografía de afinidad mediante una resina de Glutación-Agarosa (Sigma). Las proteínas solubles se incubaron con 1 ml de resina durante 45 min a 4°C con agitación, permitiendo la unión del extremo GST de la proteína fusión a la Glutación-Agarosa. Luego, la fase móvil de la cromatografía fue eliminada de la resina y fue lavada con PBS 4 veces por 10 min con agitación suave, proceso en el que se eliminan las moléculas que no presentan afinidad al glutatión presente en la resina. Posteriormente la proteína de fusión a GST fue retirada de la resina utilizando buffer de elución (75 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM Glutación en su forma reducida, 5 mM DTT)(Mercado-Pimentel y col., 2002). Este buffer contiene glutatión reducido que es la molécula que presenta afinidad por el extremo GST de las proteínas GST- RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF-COOH. Por lo tanto se generó una condición de exceso de glutatión en la fase móvil que es 100 veces mayor que en la fase estacionaria (resina). De esta manera se pudo generar una

competencia entre los sustrato glutatión-agarosa versus glutatión libre en solución, donde el equilibrio de afinidad del extremo GST se desvía hacia el sustrato libre, es decir, glutatión reducido presente en la fase móvil, llevando a cabo la obtención de las proteínas de fusión a GST desde la resina. Debido a los resultados obtenidos en este paso, todos los procesos de producción y purificación se escalaron solo para la proteína de fusión GST-RhoGEF3-COOH a 1 l de cultivo.

Una vez purificada la proteína GST-RhoGEF3-COOH proveniente de 1 l de cultivo, el paso siguiente fue eliminar el extremo GST de las proteínas de fusión. Para cumplir con este objetivo fue necesario dializar las proteínas presentes en el buffer de elución utilizando una membrana de celulosa (SnakeSkin Dialysis Tubing, 7K MWCO, Thermo Scientific) que tiene un corte de peso molecular igual a 7 kDa, permitiendo la difusión del glutatión y no de la proteína GST-RhoGEF-COOH. Esta diálisis se realizó en 2 l de buffer de clivaje (50 mM Tris-HCl pH: 7.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,01% v/v Tween). La proteína dializada fue incubada con la resina Glutatión-agarosa durante 45 min a 4°C con agitación suave, permitiendo la incorporación de la proteína de fusión GST-RhoGEF-COOH a la resina. Luego, la proteína fue lavada con el buffer de clivaje. La proteína de fusión a GST que fue incorporada en la resina, se incubo en 1 ml de buffer de clivaje con la enzima PreScission Protease (General Electric HealthCare), que también presenta un extremo GST, el cual permite la unión a la resina, y no presenta la secuencia blanco de esta misma enzima. Por lo tanto, la enzima es capaz de proteolizar a la proteína GST-RhoGEF3-COOH dejando libre en solución a RhoGEF3-COOH, y a su vez quedando acoplada mediante el extremo GST a la resina. La fase móvil, la cual contiene la

proteína RhoGEF3-COOH, se recuperó y guardó a -20°C . Finalmente se eliminaron las moléculas que quedaron en la resina mediante buffer de elución.

2.8. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Muestras de proteínas fueron fraccionadas en geles de Acrilamida al 10-12% y SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 0.01 % p/v, en cámaras verticales de electroforesis MiniProtean II (BioRad) de acuerdo con protocolos estándares (Harlow y Lane, 1999). Los geles fueron teñidos en una solución de Azul de Coomasie al 0.1 % p/v en Ácido Acético 10% v/v y Metanol 50% v/v en agua destilada. Los geles fueron desteñidos en una solución de Ácido Acético 10% v/v y Metanol 10% v/v en agua destilada, y fueron fotografiados usando el programa Kodak 1D.

2.9. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el protocolo de Bradford (1976) y una curva estándar de BSA.

2.10. Extracción de proteínas desde larvas de *Drosophila melanogaster*.

Se colectaron 50 larvas de *Drosophila* que fueron homogenizadas en 150 μl de buffer RIPA (Tris-HCl 5 mM pH 7,5, NaCl 10,5 mM, NP-40 0,1%, SDS 0,02%, EDTA 0,2 mM) con 2,5 μl de inhibidores de proteasas (Halt* Protease Inhibitor Cocktails, Thermo Scientific). Finalmente, se agregó 80 μl de buffer de carga 4x (SDS

22%, glicerol 0,4%, Tris 1 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,04% p/v, β -mercaptoetanol 25%), las muestras fueron fraccionadas en geles SDS-PAGE para el posterior análisis mediante Western blot.

2.11. Western Blots.

Geles de SDS-PAGE fueron electrotransferidos a membranas de PVDF (Polivinilideno Fluoruro, Millipore), previamente activadas en metanol 100% durante 30 s, durante 12 h a 20 volts o 1 hora a 100 volts a 4°C en módulos de electrotransferencia MiniProtean II (BioRad). La presencia de proteínas en la membrana de PVDF fue verificada por tinción con Rojo Ponceau al 1% p/v (Sigma). Las membranas fueron bloqueadas en leche descremada al 5% p/v en solución de lavado (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 0.1% v/v Tween 20) por 1 h y los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada al 3% en esta misma solución de lavado. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario por 16 h a 4°C con agitación suave. Se utilizaron como anticuerpos primarios α -GST (1:10000, General Electric Health Care.), y el anticuerpo α -RhoGEF3, generado mediante la inyección de la proteína RhoGEF3 purificada a conejos por Pacific Immunology®, a una dilución de 1:100 para el ensayo con muestra de proteína recombinante, 1:1000 para experimentos con extracto de proteína desde larvas de *Drosophila melanogaster*. El exceso de anticuerpo primario se eliminó lavando las membranas cuatro veces por 5 min en la solución de lavado. Posteriormente el anticuerpo secundario acoplado a Peroxidasa (HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc), fue diluido en

leche descremada al 3% p/v, incubando las membranas por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Los anticuerpos secundarios fueron lavados 4 veces por 5 min en solución de lavado. La unión del anticuerpo a la membrana fue detectada utilizando el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific). Las membranas fueron expuestas a films radiográficos, reveladas y fijadas (AFGA).

2.12. Análisis estadísticos.

En este trabajo se utilizaron dos análisis estadísticos, los cuales fueron los test de Chi-cuadrado (χ^2) y test de Student, ambos análisis se realizaron con el software STATISTICA.

Resultados

1. Determinar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 en la formación de glándulas salivales y tráqueas.

Con el fin de analizar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 en tejidos específicos del embrión, se utilizó el sistema GAL4-UAS de levaduras que ha sido usado ampliamente en *Drosophila melanogaster* (Brand y Perrimon, 1993). Mediante vectores basados en elementos P, que son transposones naturales de *Drosophila*. En síntesis, el sistema consta de dos cepas de moscas transgénicas, la primera porta un transgen con la secuencia que codifica para la proteína Gal4, bajo el control de una región reguladora de un gen de *Drosophila*, y la segunda cepa contiene la secuencia UAS (Upstream Activation Sequence) río arriba del gen diana de interés. Esta proteína Gal4 es un activador transcripcional que reconoce regiones UAS activando la expresión del gen ubicado río abajo de esta región. El cruzamiento de estas dos cepas produce una descendencia que porta ambas construcciones permitiendo la expresión del gen de interés bajo la dirección de una región reguladora particular que dirige la expresión de la proteína Gal4.

1.1. Función de RhoGEF3 en las glándulas salivales.

Con el fin de analizar el efecto de la pérdida de función de RhoGEF3 se cruzó la cepa de *Drosophila* w*; P{GawB}332.3 (SG-Gal4), que expresa Gal4 en las células de las glándulas salivales, con la cepa w¹¹¹⁸; P{GD7547}v31718, VDRC (UAS-dsRNA-

rhogef3-31718) que expresa un dsRNA dirigido contra RhoGEF3 bajo el control de UAS. Además, como cepa control utilizamos embriones descendientes del cruce entre las cepas SG-Gal4 y *w**; P{UAS-lacZ.B}Bg4-2-4b (UAS-*lacZ*). Los embriones control fueron sometidos a un ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo α - β -galactosidasa, comprobando la expresión de Gal4 en las glándulas salivales entre los estados 12 y 16 del desarrollo de *Drosophila melanogaster* (datos no mostrados).

En la figura 4 podemos ver el efecto del RNAi contra el gen *rhogef3*, observándose irregularidades en la formación del lumen en embriones SG-GAL4 x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718 en comparación con los embriones controles SG-Gal4 x UAS-*lacZ* (figura 4A, 4B y 4C). Los efectos producidos por el silenciamiento del gen *rhogef3* se pueden observar en las etapas tardías del desarrollo de la glándula salival, entre los estados 14 y 16, momento que está en curso la migración hacia posterior de las células salivales. En esta etapa, además, tiene lugar el proceso que determina la forma y tamaño del lumen de las glándulas secretoras. Los resultados sugieren que el silenciamiento de *rhogef3* afectó la morfología del órgano observándose constricciones a lo largo del eje próximo-distal de la glándula, generando una diferencia de tamaño en el lumen a lo largo de este eje (figura 4D, 4E y 4F).

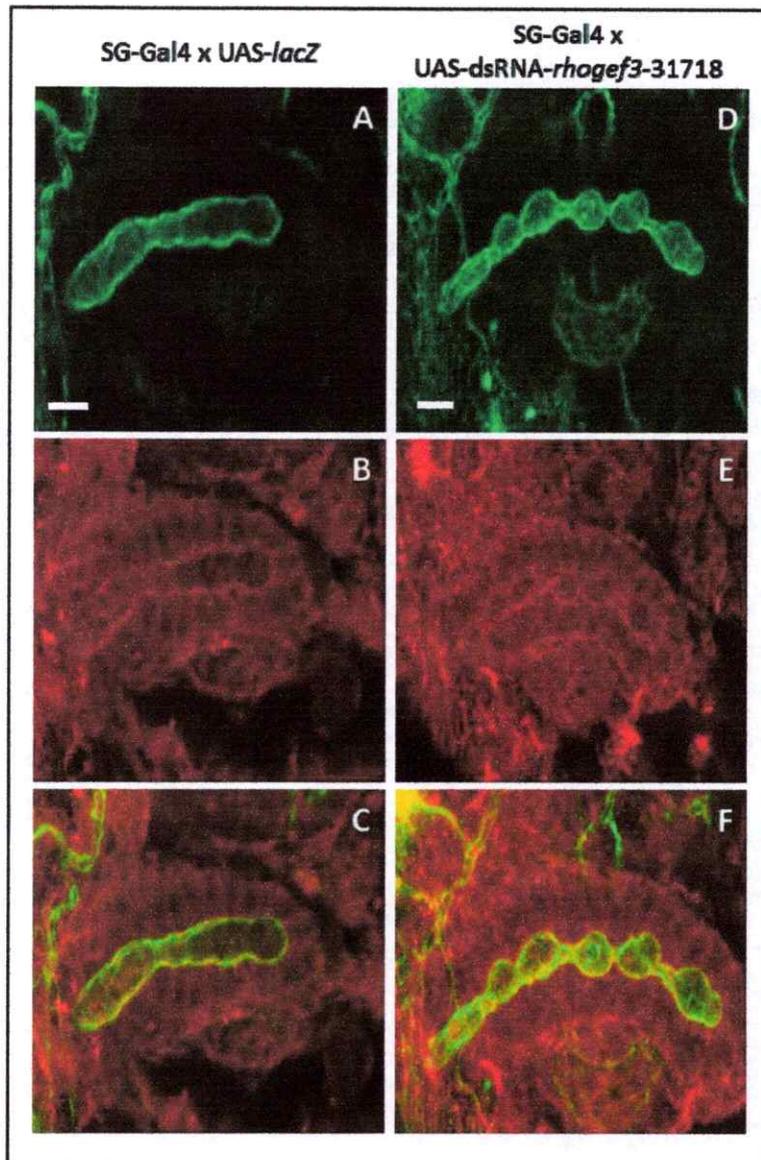


Figura 4: Efecto del silenciamiento del gen *rhogef3* en las glándulas salivales. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos α -Crumbs (verde A y D) y α -actina (rojo B y E) en embriones de estado 16 del desarrollo. **A, B, C** embriones control producto del cruce *SG-Gal4* x *UAS-lacZ*, las glándulas salivales forman un tubo de células ordenadas con un lumen central homogéneamente expandido. **D, E, F** embriones *SG-Gal4* x *UAS-dsRNA-rhogef3-31718*. El lumen presenta varias constricciones y no está totalmente expandido. Barra = 10 μ m.

1.2. Función de RhoGEF3 en la formación del sistema traqueal.

Con el objetivo de analizar el efecto de pérdida de función de RhoGEF3 sobre la formación del sistema traqueal, se silenció el gen *rhogef3* mediante la expresión de un dsRNA contra el gen *rhogef3*, para ello se cruzó la cepa de *D. melanogaster* w*; P{GAL4-*btl.S*}2, P{UASp-Act5C.T:GFP}2 (*btl*-GAL4-UAS-*actin-gfp*), expresando Gal4 en las células traqueales, con distintas cepas que expresan dsRNAs contra diferentes regiones exónicas del gen *rhogef3*, bajo el control de UAS. Como control utilizamos embriones descendientes del cruzamiento entre *btl*- GAL4-UAS-*actin-gfp* y UAS-*lacZ*. En la figura 5 podemos ver la expresión de actina- GFP en los embriones *btl*-GAL4-UAS-*actin-gfp* x UAS-*lacZ* durante el desarrollo del sistema traqueal de *Drosophila*. En esta imagen podemos observar los 10 metámeros que corresponden a células traqueales en estados tempranos del desarrollo del sistema traqueal (figura 5 E11). Desde ellos, a medida que avanza el desarrollo, las células distales de cada metámero migran para formar los distintos brazos del sistema traqueal generando una tráquea bien constituida.

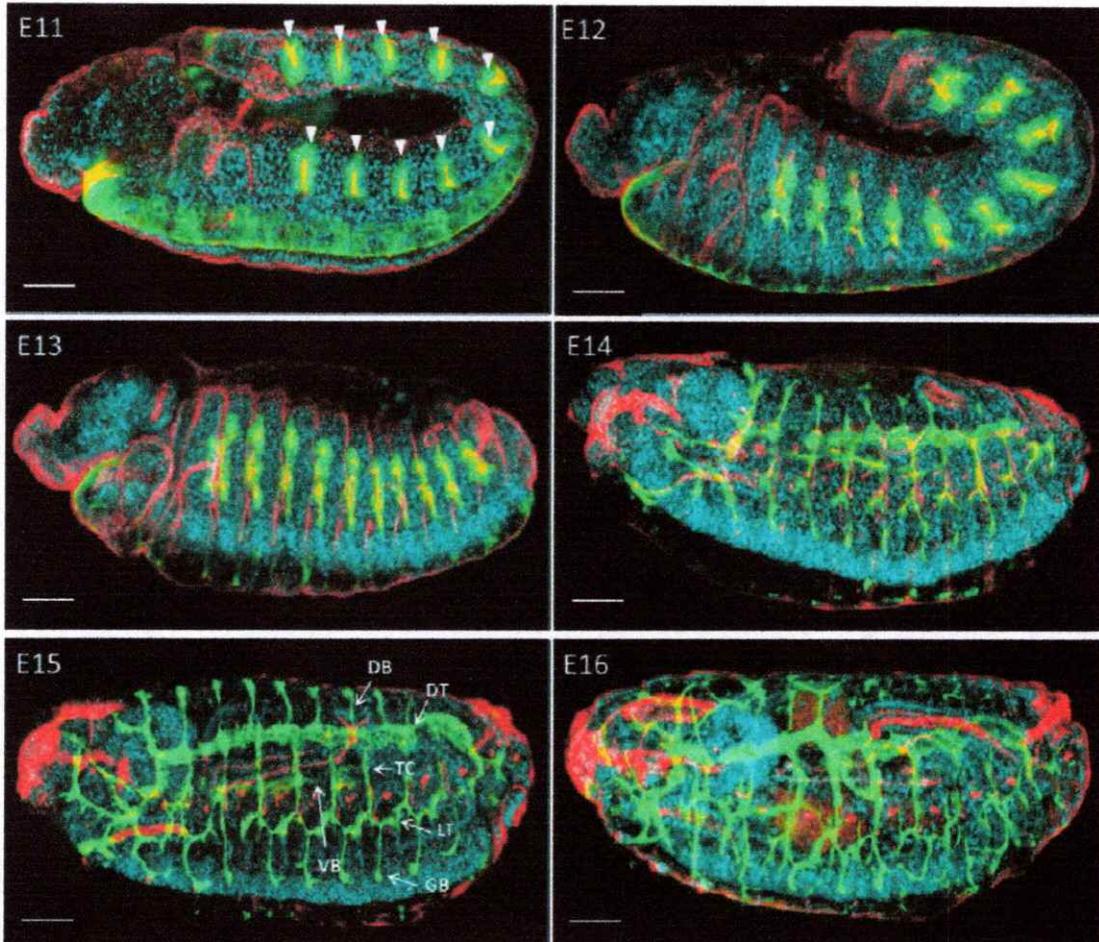


Figura 5: Morfogénesis traqueal en *Drosophila*. Inmunofluorescencia indirecta de embriones que nos ilustra el desarrollo del sistema traqueal desde el estado 11 hasta el 16. Embriones fueron marcados con α -GFP (verde), α -Crumbs (rojo) y To-pro (celeste) para marcar el DNA de las células. En el estado 11 tiene lugar la formación de los 10 sacos traqueales (TS) (cabezas de flecha). El sistema traqueal está compuesto por sus diferentes conductos: Tronco dorsal (DT); brazo dorsal (DB); tronco lateral (LT); conectivo transverso (TC); brazo visceral (VB) y brazo ganglionar (GB). Embriones derivados del cruce entre *btl*-GAL4-UAS-*actin-gfp* y UAS-*lacZ*. Todas las imágenes son vistas laterales con el extremo dorsal hacia arriba y región anterior hacia la izquierda. Barra = 50 μ m.

Para determinar el efecto de la pérdida de función de RhoGEF3 se utilizaron varias cepas que expresan dsRNAs contra el gen *rhogef3*. La cepa *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* fue cruzada contra las cepas UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718, UAS-dsRNA-*rhogef3*-NIG1225R-2 (NIG-FLY), UAS-dsRNA-*rhogef3*-31580 ($y^1 \quad v^1$; P{TRiP.JF01153}attP2) y UAS-dsRNA-*rhogef3*-31581 ($y^1 \quad v^1$; P{TRiP.JF01154}attP2), con el fin de determinar el cruce que genere una progenie con mayor fenotipo mutante. Para cada cruce se contaron los embriones que presentaban un fenotipo diferente al de los embriones controles, obteniendo un porcentaje de fenotipo mutante asociado a la pérdida de función debido a la disminución en la expresión de *rhogef3*. El porcentaje de fenotipos mutantes de los embriones descendientes de cada cruce fue graficados en la figura 6, observándose que los cruces con las líneas UAS-dsRNA-*rhogef3*-NIG1225R-2, UAS-dsRNA-*rhogef3*-31580 y UAS- dsRNA-*rhogef3*-31581 no presentan una proporción con fenotipo mutante significativamente distintos ($p > 0,05$, test de Chi-cuadrado). Sin embargo, los embriones provenientes del cruce *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718 muestran un 38% de embriones con fenotipos mutantes, siendo una proporción estadísticamente significativa comparado con el 9% que se obtiene de los embriones controles (figura 6D, $p < 0,05$, Chi-cuadrado). Por lo tanto, en los próximos ensayos se utilizó solo la cepa UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718 (UAS-dsRNA- *rhogef3*) para analizar la pérdida de función del gen *rhogef3*.

En la figura 7 se muestran imágenes representativas de los fenotipos obtenidos de los embriones provenientes del cruce entre las cepas de *D. melanogaster* *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* y UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718. Se analizaron

413 embriones, de los cuales 163 embriones presentaron un fenotipo mutante. En los embriones mutantes se pudieron observar distintos fenotipos mutantes, de los cuales el de menor frecuencia tiene un valor de 11/163 (figura 7A), en contra parte, el fenotipo más representado en los embriones mutantes, tiene una frecuencia de 111/163 (figura 7B y 7F). Estos embriones, en los que se silenció el gen *rhogef3*, presentan un tronco dorsal discontinuado a lo largo del eje anterior-posterior. Además los brazos dorsales no migran hacia el extremo más dorsal del embrión como se observa en embriones control (figura 7E). Los fenotipos asociados a la pérdida de función de *rhogef3* fueron observados en etapas tardías del desarrollo del sistema traqueal, siendo distinguibles desde el estado 13 hasta el 16 de la embriogénesis.

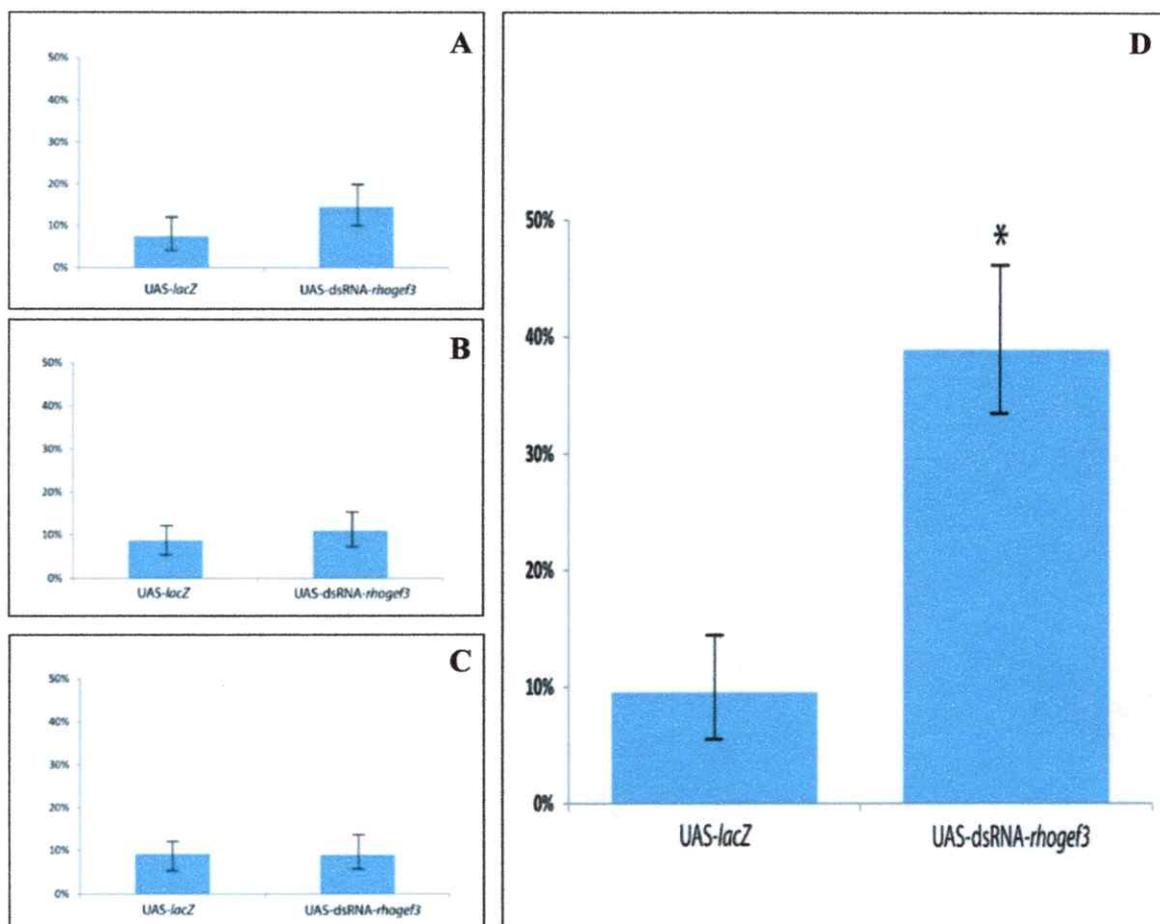


Figura 6: Porcentaje de fenotipos mutantes. Los gráficos muestran las proporciones de embriones que presentaron fenotipos mutantes en embriones controles (UAS-lacZ) y en embriones que expresan diferentes dsRNAs contra *rhogef3*. (A) Embriones *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-dsRNA-*rhogef3*-NIG1225R-2 (N=95 embriones). (B) Embriones *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31580 (N=93 embriones). (C) Embriones *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31581 (N=98 embriones). (D) Embriones *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718 (N=93 embriones). Eje Y corresponde a porcentaje de embriones con fenotipo. * $p < 0,05$, Chi-cuadrado.

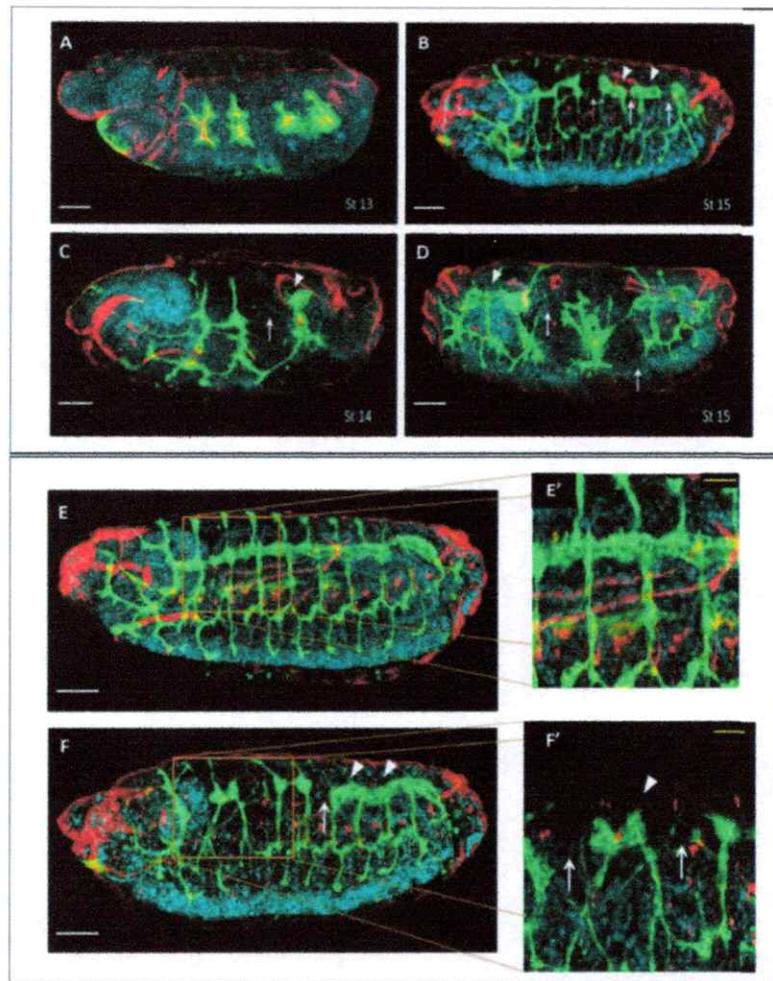


Figura 7: Fenotipo asociado a la pérdida de función de *rhogef3*. Las imágenes corresponden a inmunofluorescencias indirectas con anticuerpos α -GFP (verde), α -Crumbs (rojo) and To-pro (celeste). (A-D) Embriones derivados del cruce entre *btl*-GAL4- UAS-*actin-gfp* y UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718. Se observan diferentes fenotipos asociados al silenciamiento del gen *rhogef3*, entre ellos menor número de sacos traqueales y formación grupos celulares desorganizados (A), N = 11. Discontinuidad en el DT (flechas) y defectos en la migración de los DB (cabezas de flechas) (B y F), N = 114. Fenotipos más severos en los cuales también se ven los DT interrumpidos (flechas) y no se observa migración (cabezas de flechas) (C-D), N = 14 para C y N = 24 para D. (E) Embriones controles *btl*-GAL4-UAS- *actin-gfp* x UAS-*lacZ*. Las imágenes corresponden a vistas laterales de embriones de estado 15 con la región dorsal hacia arriba y anterior hacia la izquierda. Flechas: DT no conectado. Cabezas de flechas: migración no realizada. Barra blanca= 50 μ m, barra amarilla= 20 μ m.

1.3. Disminución en la expresión del gen *rhogef3*.

Los fenotipos asociados a la pérdida de función del gen *rhogef3* fueron obtenidos de embriones que expresan un dsRNA contra *rhogef3*, por lo tanto son embriones que deben presentar una disminución en la abundancia de los transcritos del gen *rhogef3*. Para verificar esta disminución, se cuantificó la abundancia del transcrito de *rhogef3* mediante ensayos de RT-qPCR en embriones provenientes del cruce entre la cepa *nanos-GAL4* y *UAS-dsRNA-rhogef3*, y en embriones controles *nanos-GAL4* x *UAS-lacZ*. En estos ensayos, se utilizó la cepa *nanos-GAL4* para que la expresión del dsRNA contra *rhogef3* se lleve a cabo de forma global en el embrión, permitiendo de esa manera cuantificar el efecto del dsRNA. Los resultados obtenidos indican una significativa disminución en la abundancia relativa del transcrito *rhogef3* en embriones *nanos-GAL4* x *UAS-dsRNA-rhogef3* respecto a embriones controles (figura 8), obteniendo una disminución de un 18% en la expresión de *rhogef3* con la pareja de partidores P1 y una disminución del 29,6% para la pareja P2 de partidores. En ambos casos las diferencias son significativas según un test de Student, con un $p < 0,01$.

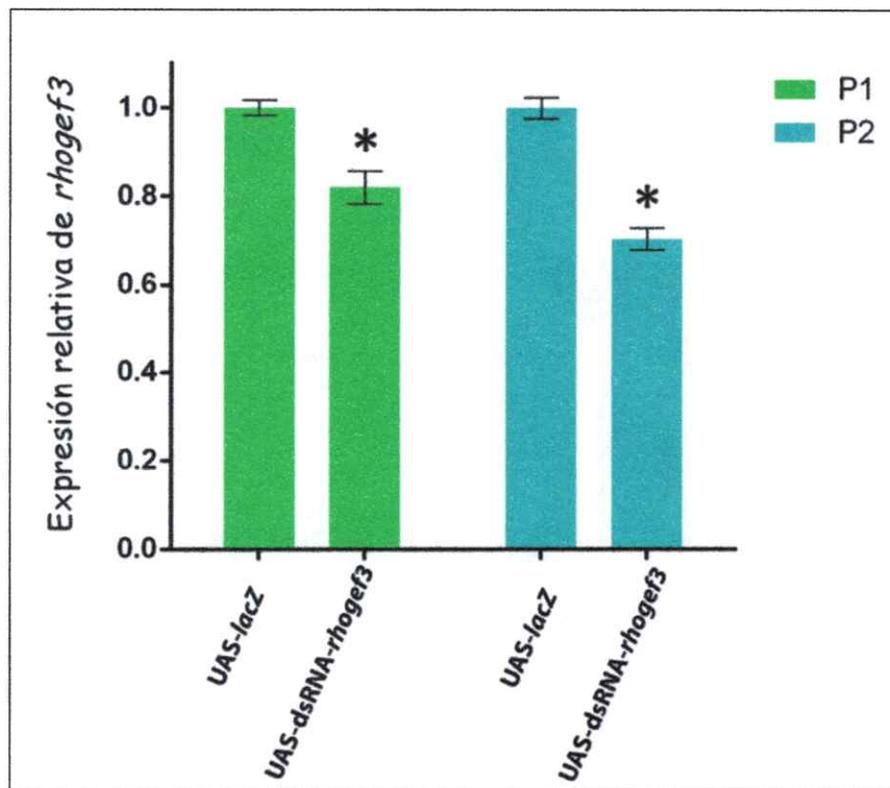


Figura 8: Expresión relativa de *rhogef3*. Las barras indican la expresión relativa del gen *rhogef3* obtenida mediante RT-qPCR con 2 parejas de partidores que amplifican diferentes regiones exónicas de *rhogef3* (P1 y P2). Se utilizaron embriones de los cruces *nanos*-GAL4 x UAS-*lacZ* (UAS-*lacZ*) y *nanos*-GAL4 x UAS-dsRNA-*rhogef3*-31718 (UAS-dsRNA-*rhogef3*). La expresión relativa fue calculada según la ecuación de Pfaffl 2001 utilizando un RNA *spike* como normalizador. * $p < 0,01$, test de Student

2. Identificación *in vivo* de la GTPasa blanco de RhoGEF3.

Los posibles blancos de RhoGEF3 son las GTPasas Rho, Rac y Cdc42. La GTPasa Rho1 tiene una participación al comienzo del desarrollo de las glándulas salivales y del sistema traqueal, favoreciendo la invaginación de las células epiteliales (Brodu y Casanova, 2006; Xu y col., 2008), por otro lado, también participa en la apertura del sistema traqueal a través de la anastomosis de los brazos traqueales (Lee and Kolodziej 2002; Matusek y col. 2006). La disminución de la función de RhoGEF mediante RNAi nos muestra un fenotipo que no afecta la invaginación de las células ni la anastomosis de los brazos traqueales, por lo tanto Rho1 fue descartado para los siguientes análisis. Por consiguiente las posibles GTPasas que podrían ser activadas por RhoGEF3 son Rac1 y Cdc42. Con el objetivo de identificar la GTPasa blanco de RhoGEF3 se analizó el fenotipo generado por la pérdida de función de las GTPasas Rac1 y Cdc42. Se analizaron embriones que expresan proteínas bajo el sistema UAS-GAL4, las cuales presentan mutaciones puntuales en su secuencia aminoacídica que provocan un funcionamiento como dominante negativo, tanto para Rac1 como para Cdc42.

2.1. GTPasas involucradas en el desarrollo de las glándulas salivales.

Primeramente examinamos la pérdida de función de Rac1 y para ello utilizamos embriones provenientes del cruce entre SG-Gal4 y las cepas y^1, w^* ; P{UAS- Rac1.L89}6 (UAS-Rac1.L89) y y^1, w^* ; P{UAS-Rac1.N17}1 (UAS-

Rac1.N17), las cuales expresan dominantes negativos de Rac1 con distintas mutaciones bajo la dirección de la secuencia UAS. Para obtener embriones que expresan el dominante negativo de Cdc42 colectamos embriones desde los cruces entre SG-Gal4 y las cepas w^* ; P{UAS-Cdc42.F89}3 (UAS-Cdc42.F89), w^* ; P{UAS-Cdc42.L89}4 (UAS-Cdc42.L89) y w^* ; P{UAS-Cdc42.N17}3 (UAS-Cdc42.N17). De esta manera analizamos la similitud del fenotipo obtenido con los distintos dominantes negativos de Rac1 como de Cdc42 y aquel generado por la disminución en la expresión del gen *rhogef3*.

En ensayos con el dominante negativo de Rac1 no fue posible obtener fenotipos asociados a la pérdida de función de Rac1, como los reportados en la literatura (Pirraglia y col., 2006). Mientras que, para los embriones que expresaban la forma dominante negativa Cdc42.N17 si se observó un fenotipo asociado a la pérdida de función de esta GTPasa. En este caso, en 28 de 98 embriones SG-Gal4 x Cdc42.N17 se observaron alteraciones en el tamaño y forma del lumen de las glándulas salivales (figura 9). Estos fenotipos fueron similares a los descritos por Pirraglia y cols 2010.

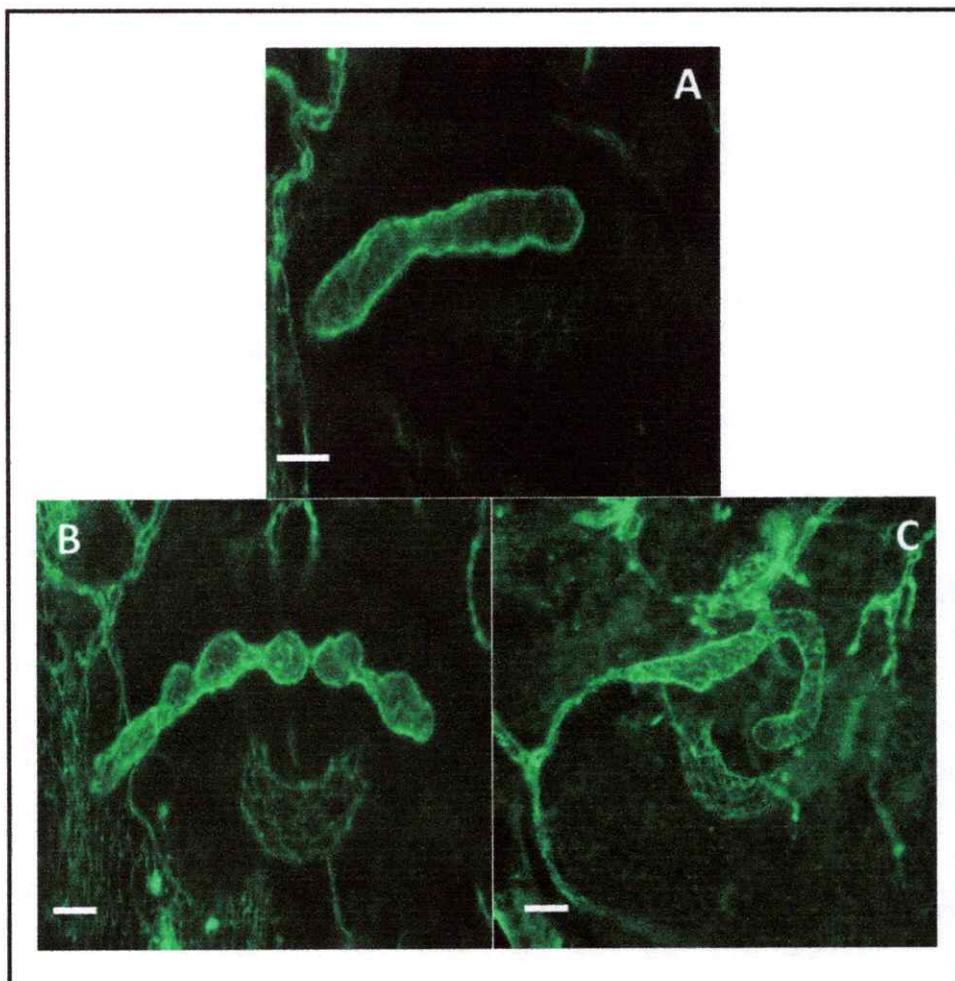


Figura 9: Fenotipo de embriones que expresan el dominante negativo Cdc42. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo α -Crumbs en embriones de estado 16 del desarrollo. (A) Embriones controles descendientes del cruce SG-GAL4 x UAS-*lacZ*. (B) glándulas salivales de embriones SG-Gal4 x UAS-dsRNA-*rhogef3-31718*. (C) Embriones provenientes del cruce SG-GAL4 x UAS-Cdc42.N17. En estos embriones podemos observar que existe un efecto en el tamaño del lumen en las glándulas salivales, si bien es menos severo que el observado en embriones UAS-dsRNA-*rhogef3-31718*. Barra = 10 μ m.

2.2. GTPasas involucradas en el sistema traqueal.

En este caso se expresaron los dominantes negativos de Cdc42 y Rac1 en las células traqueales mediante el uso de la cepa *btl-GAL4-UAS-actin-gfp*. El análisis del dominante negativo de Cdc42 se realizó con embriones provenientes del cruce entre *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* y las cepas UAS-Cdc42.F89, UAS-Cdc42.L89 y UAS-Cdc42.N17. En ninguno de estos cruces los embriones presentaron un fenotipo alterado al ser comparados con embriones controles *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-*lacZ* (datos no mostrados).

Por otro lado, se obtuvieron embriones que expresan el dominante negativo de Rac1 del cruce entre *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* y las cepas UAS-Rac1.L89 y UAS-Rac1.N17. Los embriones *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-Rac1.L89 no presentaron ningún fenotipo, sin embargo, 48 de 105 embriones del cruce *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x UAS-Rac1.N17 mostraron un fenotipo alterado con desconexión de los túbulos traqueales (flecha, figura 10B') y alteraciones en la migración del DB (cabeza de flecha, figura 10B') con respecto a los embriones controles (figura 10A y 10A'). Los efectos de Rac1.N17 se observan en estados tardíos de la formación del sistema traqueal. En esta figura el fenotipo que se muestra son del estado 15 del desarrollo embrionario similar a lo descrito en Chihara y col. 2003.

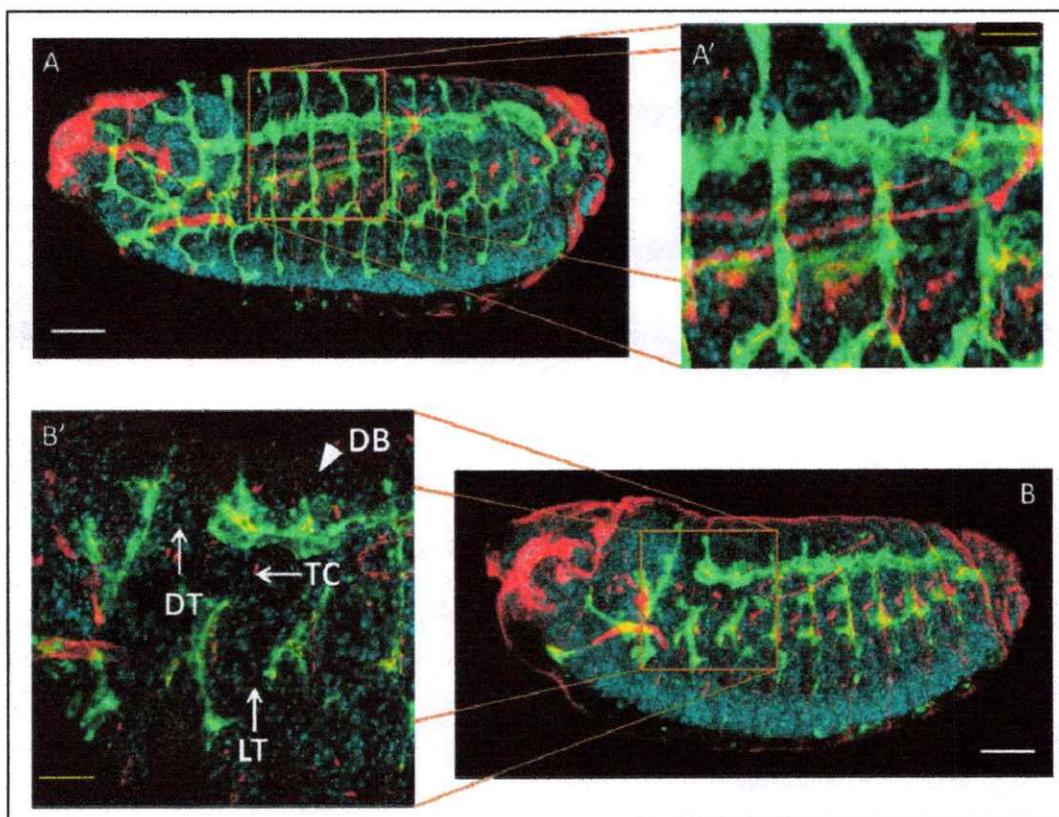


Figura 10: Fenotipos de embriones que expresan un dominante negativo de Rac1. Inmunofluorescencias indirectas de embriones teñidos con anticuerpos α -GFP (verde), α -Crumbs (rojo) y To-pro (celeste). (A) Embriones controles descendientes del cruce *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x *UAS-lacZ*. (B) Embriones provenientes del cruce *btl-GAL4-UAS-actin-gfp* x *UAS-Rac1.N17*. En estos embriones algunas estructuras traqueales están interrumpidas: DT, TC y aparentemente LT (B'), y además no se lleva a cabo la migración del DB. Las imágenes son de vista lateral de embriones del estadio 15 con el lado dorsal hacia arriba y la región anterior hacia la izquierda. Flechas: túbulos no conectados. Cabezas de flechas: migración no realizada. Barra blanca = 50 μ m, barra amarilla = 20 μ m.

3. Generación de un anticuerpo α -RhoGEF3 y analizar la localización *in vivo* de la proteína RhoGEF3.

3.1. Generación de una proteína recombinante de RhoGEF3.

Se seleccionaron dos secuencias nucleotídicas que codifican para el extremo amino y carboxilo de la proteína RhoGEF3, RhoGEF3-NH₂ y RhoGEF3-COOH respectivamente. Ambas secuencias fueron clonadas en el vector de clonamiento pGEM- T transformando células *E. coli* DH5 α y posteriormente subclonadas en el vector p- GEX-6P1 en el sitio de multiclonamiento ubicado en la región C-terminal del gen GST (Glutación S-Transferasa), generando las secuencias nucleotídicas que expresaran las proteínas de fusión GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH. Ambos clones fueron verificados por secuenciación, indicándonos que no existe error en el marco de lectura de la secuencia nucleotídica. Este vector de expresión en bacterias posee un promotor inducible por IPTG que dirige la expresión de la proteína recombinante fusionada a GST. Los nuevos vectores generados, pGEX-6P1-RhoGEF3-NH₂ y pGEX-6P1-RhoGEF3-COOH, se utilizaron para transformar células *E. coli* BL21, la cuales como se indica en materiales y métodos, no presentan ciertas proteasas lo que nos permitió disminuir la posibilidad de degradación de las proteínas de fusión a GST. En la figura 8 observamos la digestión enzimática de DNA plasmidial obtenido de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pGEX-6P1-RhoGEF3-NH₂ (figura 11A) y con el vector pGEX-6P1-RhoGEF3-COOH (figura 11B). Cada vector fue sometido a un análisis de restricción con las enzimas BamHI y HindIII respectivamente, que permiten ver un vector lineal de ~5500 bp, tamaño

correspondiente al vector más la secuencia del extremo de RhoGEF3 respectivo. Finalmente verificamos la expresión de las proteínas de fusión mediante ensayos de expresión. Para ello los clones fueron crecidos a 37°C y la expresión de las proteínas fue inducida adicionando 1 mM de IPTG. Luego de 5 horas de crecimiento las bacterias fueron colectadas y analizadas mediante SDS-PAGE, y comparadas contra un control no inducido. En ambos casos varios clones fueron evaluados. Los resultados obtenidos indican que se logró inducir la expresión de una proteína de aproximadamente 69 kDa (figura 11C) en el caso de GST-RhoGEF3-NH₂ y de 50 kDa (figura 11D) para GST-RhoGEF3-COOH, coincidiendo con los tamaños esperados. El resto de las bandas que se observan en el gel, corresponden a proteínas propias que expresa la bacteria. Con estos resultados se decidió utilizar el clon 1 en ambos casos para los siguientes ensayos de expresión y purificación de proteínas a gran escala con el objetivo de obtener la proteína pura y soluble para la inoculación en conejo, y la posterior generación del anticuerpo que reconozca RhoGEF3.

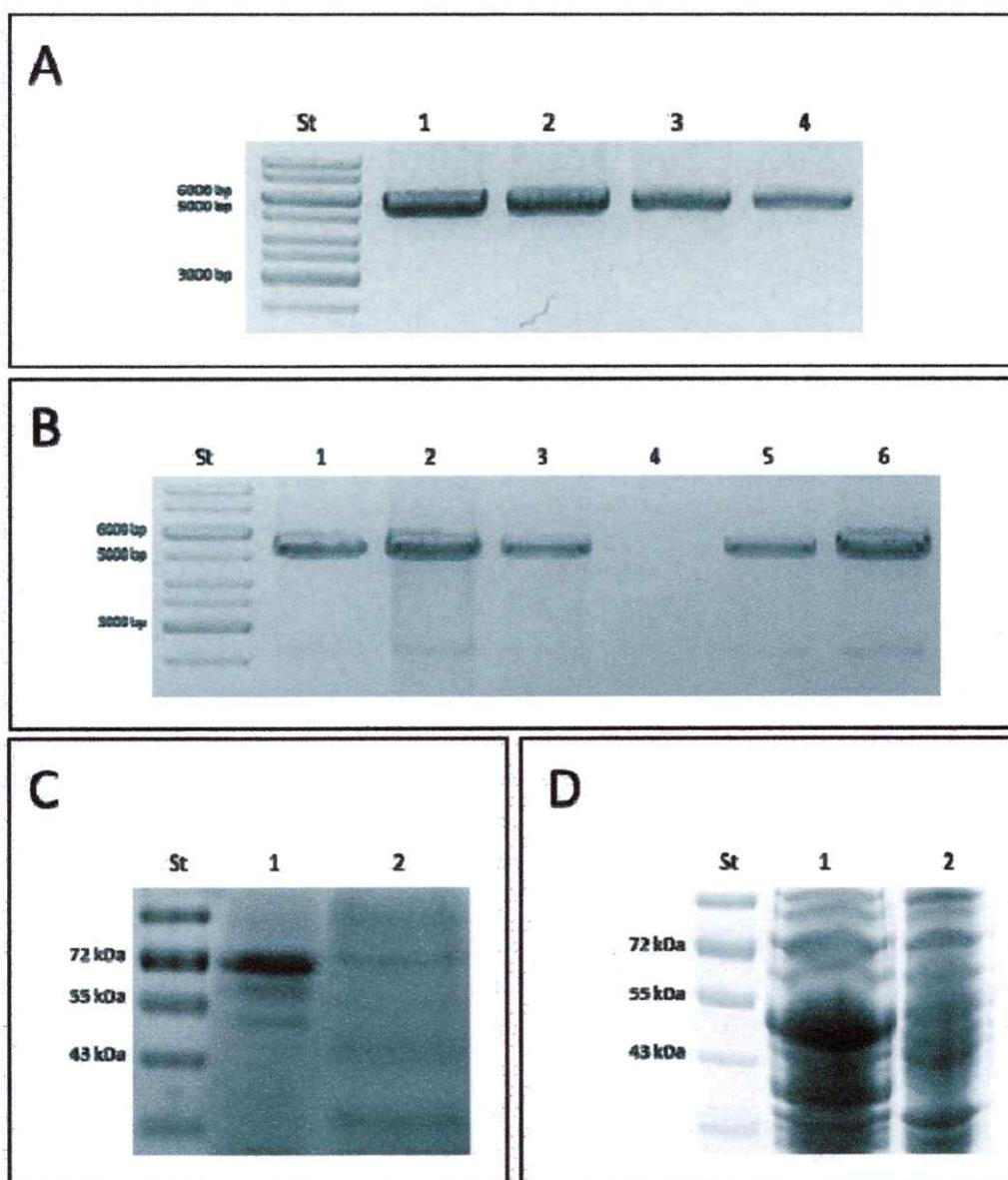


Figura 11: Generación proteínas de fusión. A-B Análisis de restricción de DNA plasmidial en gel de agarosa 1% p/v. **A)** pGEX-6P1-RhoGEF3-NH₂. **B)** pGEX-6P1- RhoGEF3- COOH. St: estándar 1Kb; 1- 6: clon1 al clon6. **C-D** Fraccionamiento de proteínas en gel de poliacrilamida 10%, provenientes de un lisado celular colectado 5 horas post-inducción con IPTG 1mM. Geles teñidos con Azul de Coomassie. **C)** GST-RhoGEF3-NH₂. **D)** GST-RhoGEF3-COOH. St: estándar de peso molecular; 1: *E. coli* inducidas con IPTG; 2: *E. coli* no inducidas con IPTG.

3.2. Producción de proteína de fusión a GST.

Con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína de fusión de manera soluble, se estandarizó las condiciones de producción de las proteínas GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH. Determinamos el tiempo de inducción de las proteínas de fusión incubando con IPTG 1 mM durante 1, 3, 5 y 16 h a 37°C. Luego de la inducción por IPTG, el cultivo fue lisado mediante sonicación y centrifugado para generar las fracciones solubles e insolubles, en todos los casos se obtuvo la proteína de fusión a GST en la fase insoluble (Datos no mostrados). Optamos por la opción de 5 h de inducción ya que en estas condiciones existe una mayor producción de proteína de fusión a GST. Luego determinamos si la cantidad de IPTG disponible podría afectar el equilibrio desviando la expresión de las proteínas de fusión GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH hacia la fase soluble. Se probaron varias concentraciones de IPTG desde 0,1 mM hasta 1 mM. Tales condiciones no aumentan la cantidad de proteína en la fase soluble. Además, la cantidad de proteína producida en las distintas condiciones de IPTG no se ve afectada (dato no mostrado). Por lo tanto, se prefirió utilizar la cantidad mínima de IPTG, es decir a una concentración de 0,1 mM (figura 12A).

Debido a la escasa cantidad de las proteínas de fusión a GST en la fase soluble en nuestro ensayo, decidimos solubilizar la proteína presente en la parte insoluble. En este caso solubilizamos las proteínas GST-RhoGEF3-NH₂ y RhoGEF3-COOH utilizando sarkosyl, el cual es un surfactante iónico que presenta una cola hidrofóbica de 14 carbonos y un extremo hidrofílico dado por el carboxilato. Para

conocer la condición óptima en la cual solubilizar nuestras proteínas de fusión a GST se realizó un ensayo abarcando un rango de concentración de sarkosyl, en el cual se probaron concentraciones desde 0% hasta 3% v/v. para ambas proteínas de fusión (figura 12B). En el caso de la producción de GST-RhoGEF3-NH₂ alcanzamos un máximo de proteína soluble cuando utilizamos sarkosyl al 2,0 % v/v, en cambio la solubilización de RhoGEF3-COOH alcanza un plató en el momento que trabajamos con sarkosyl al 1,0 % v/v. Por lo tanto se utilizaron estas concentraciones, que nos entregan las condiciones para obtener un máximo de proteína fusión a GST soluble con el mínimo de sarkosyl posible, de esta manera optimizamos el proceso de producción de GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH soluble.

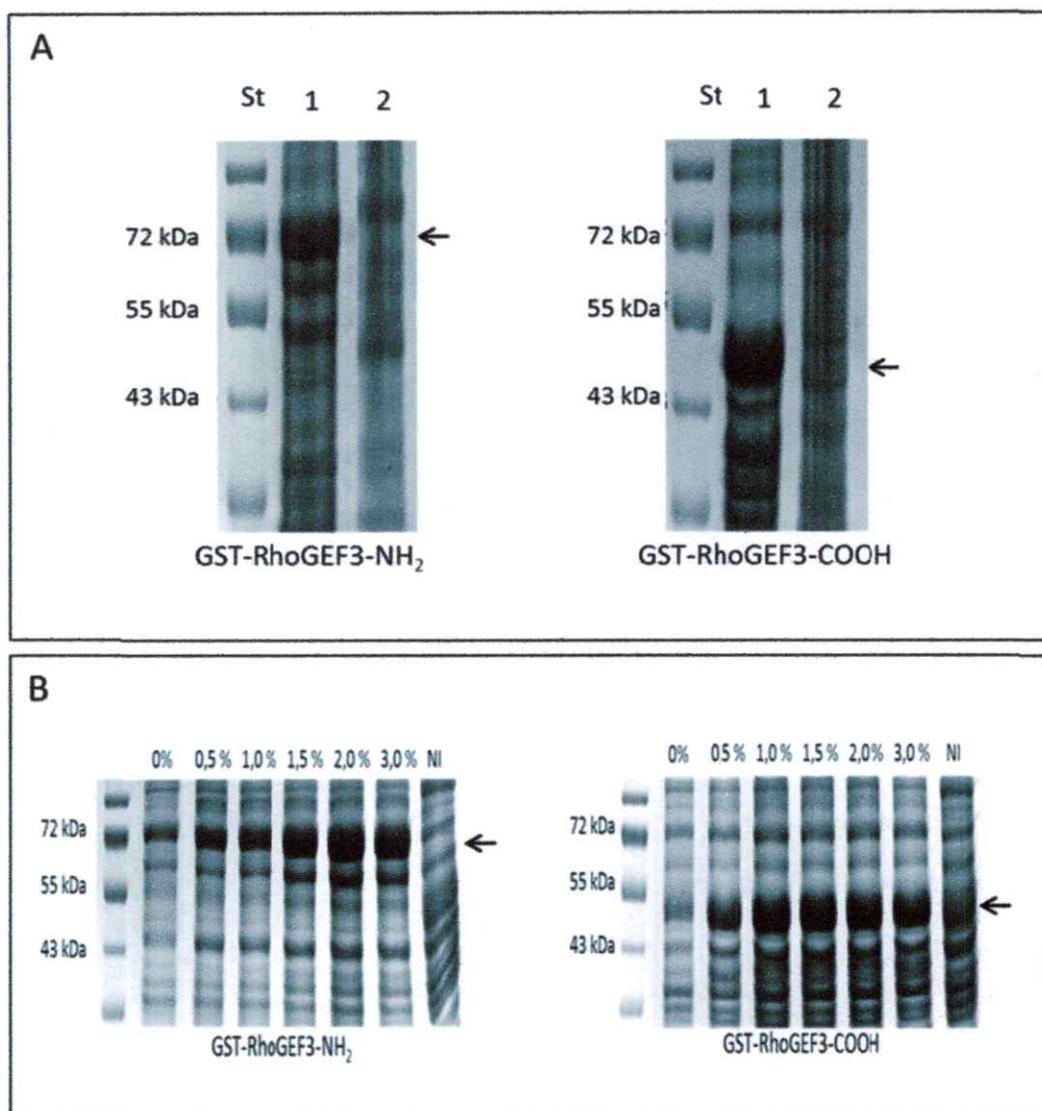


Figura 12: Producción de GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH. Fraccionamiento de proteínas provenientes de lisados celulares de *E. coli* BL21 en geles de poliacrilamida al 10%. **A)** Tratamiento con IPTG 0,1 mM para la producción de GST-RhoGEF3- NH₂ y RhoGEF3-COOH. Carril 1: fase insoluble; carril 2: fase soluble. **B)** Solubilización de las proteínas de fusión a GST mediante sarkosyl. 0 – 3 % v/v de sarkosyl; NI: células no inducidas con IPTG. St: estándar. GST-RhoGEF3-NH₂ ~69 kDa. GST-RhoGEF3-COOH ~50 kDa. Proteína recombinante fusionada a GST indicadas por un flecha.

3.3. Purificación de las proteínas RhoGEF3-NH₂ y RhoGEF3-COOH.

Las proteínas GST-RhoGEF3-NH₂ y GST-RhoGEF3-COOH solubilizadas fueron purificadas a través de cromatografía de afinidad mediante el uso de una resina de glutatión-agarosa que se une al GST de la proteína de fusión, y que permite mediante un buffer adecuado liberar de la resina la proteína agregando Glutatión en la fase móvil. Se realizó un ensayo piloto con el fin de optimizar el proceso de purificación para ambas proteínas de fusión. La proteína GST-RhoGEF3-NH₂ no fue detectada en ninguna de las fracciones eluidas (figura 13A), lo que nos indica que la proteína no fue posible purificarla. Sin embargo, para el caso de la proteína GST-RhoGEF3-COOH en todas las fracciones de elución la proteína de fusión fue detectada (figura 13A'). En resumen nuestro experimento piloto indica que es posible purificar solamente la proteína GST-RhoGEF3-COOH mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina glutatión-agarosa, por lo tanto los siguientes ensayos se realizaron solo para la proteína de fusión GST-RhoGEF3-COOH.

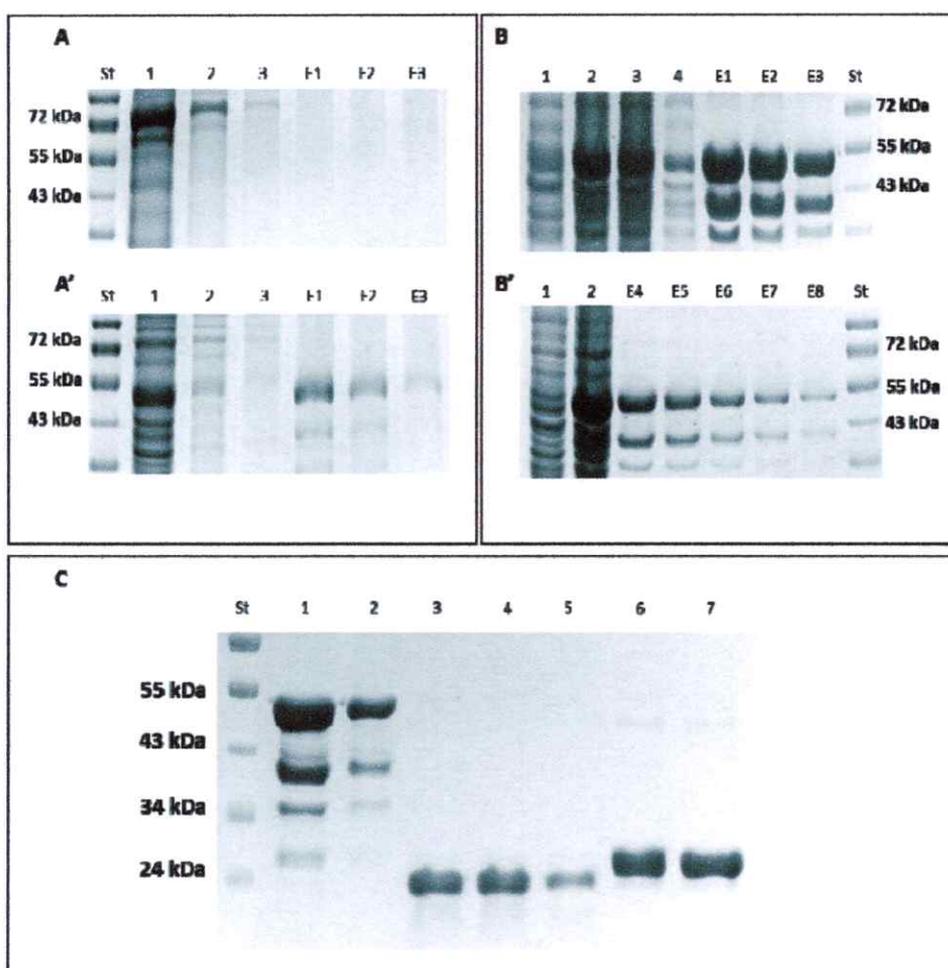


Figura 13: Purificación de RhoGEF3-COOH. Fraccionamiento de proteínas a través de gel de poliacrilamida al 10 %. Proteínas presentes en la fase insoluble del lisado celular de *E. coli* B121 tratadas con sarkosyl. **A)** Purificación de la proteína GST-RhoGEF3-NH₂. **A')** Purificación de la proteína GST-RhoGEF3-COOH. (**A-A'**) 1: sobrenadante de la resina glutatión-agarosa, 2: primer lavado de la resina, 3: segundo lavado de resina, E1-E3: eluciones **B)** Carril 1: células no inducidas; carril 2: proteínas solubilizadas con sarkosyl; carril 3: sobrenadante de la resina glutatión- agarosa; carril 4: lavado de resina; carril E1 – E8: elusión de proteínas correspondientes a las fracciones del 1 al 8. **C)** Digestión de GST-RhoGEF3-COOH por la enzima PreScission Protease, carril 1: proteínas fusión a GST purificadas; carril 2: sobrenadante de la resina glutatión-agarosa; carril 3: fracción 1 de proteína digerida; carril 4: fracción 2 de proteína digerida; carril 5: fracción 3 de proteína digerida; carril 6-7: elusión de las moléculas unidas a la resina glutatión-agarosa. St: estándar. GST-RhoGEF3-COOH ~50 kDa, GST 26 kDa, RhoGEF3-COOH ~24 kDa, PreScission Protease 46 kDa.

Posteriormente escalamos el cultivo a 2 l, de los cuales se purifico la proteína GST-RhoGEF3-COOH como se observa en las eluciones 1 al 8 (figura 10 B- B'). Todas las fracciones obtenidas en la purificación fueron cuantificadas usando el método de Bradford obteniendo un total de 40 mg de proteína. Con el objetivo de obtener la porción RhoGEF3-COOH liberada del fragmento GST, la fracciones eluidas fueron dializadas para eliminar el glutatión presente en la solución e incubadas nuevamente en la resina glutatión-agarosa, y de este modo ser digeridas por la enzima PreScission Protease. En la figura 13C podemos observar la digestión de la PreScission Protease, en las tres fracciones correspondientes al producto de la digestión (carriles 3, 4 y 5, figura 13C) visualizamos una banda de un tamaño de 24 kDa indicando la presencia de RhoGEF3-COOH. Los siguientes carriles corresponden a las fracciones eluidas con glutatión reducido en la fase móvil en los cuales podemos observar las proteínas que se quedaron unidas a la resina, dándonos una banda de 46 kDa que corresponde a la enzima PreScission Protease y una banda de 26 kDa que corresponde al fragmento GST de nuestra proteína fusión GST-RhoGEF3-COOH. Finalmente se cuantifico la proteína RhoGEF3-COOH mediante el método de Bradford dándonos un total de 4,8 mg, las cuales fueron inyectadas en un conejo para obtener anticuerpos policlonales específicos contra la proteína RhoGEF3.

3.4. Ensayos de Western blot con el anticuerpo α -RhoGEF3.

Con el objetivo de obtener un suero pre-inmune, se obtuvo suero de los conejos antes de ser inmunizados por RhoGEF3-COOH. Luego de inmunizar los animales se

extrajo nuevamente suero, el cual debería contener anticuerpos específicos contra la proteína RhoGEF3 (suero α -RhoGEF3). Mediante ensayos preliminares de Western blot, se verificó que el suero α -RhoGEF3 era capaz de detectar la proteína recombinante GST-RhoGEF3-COOH producida por las células BL21, la cual es de aproximadamente ~ 50 kDa. El ensayo para un extracto proteico de larvas de *Drosophila*, el suero α -RhoGEF reconoce a una proteína del tamaño correspondiente al calculado para RhoGEF3, siendo de ~ 90 kDa. Estas proteínas no fueron reconocidas por el suero preimmune en ambos ensayos de Western blot (figura 14).

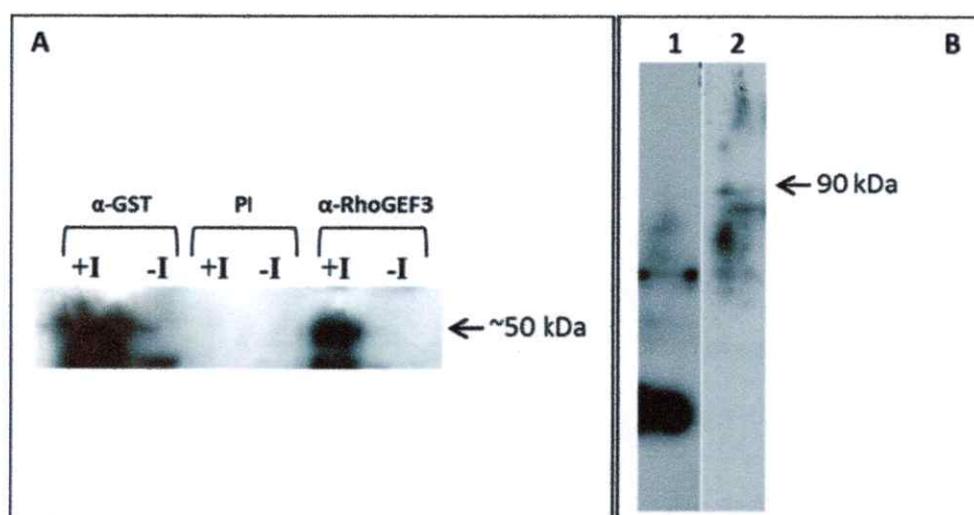


Figura 14: Western blot con el suero α -RhoGEF3. Las muestras fueron fraccionadas en geles de SDS-PAGE al 10% de acrilamida y transferidas a membranas de PVDF. (A) Proteína recombinante GST-RhoGEF3-COOH desde células BL21. Células inducidas con IPTG (+I), células no inducidas con IPTG (-I). Se utilizó α -GST (1:10000), suero.

Discusión

Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* las células sufren varios cambios en su forma y ordenamientos espaciales que son necesarios para diferenciar órganos completos y funcionales. Estas características han sido estudiadas en la literatura, y también fueron blanco de estudio en esta tesis dentro del contexto de la tubulogénesis, utilizando como órganos modelo las glándulas salivales y el sistema traqueal, debido a que existe evidencia experimental, mediante hibridaciones *in situ* (Zúñiga 2010, tesis doctoral), de la expresión del gen *rhogef3* en órganos tubulares.

La predicción bioinformática de la secuencia aminoacídica de la proteína RhoGEF3 sugiere que esta proteína tiene funciones de intercambiador de nucleótidos de guanina, GEF, la cual promueve la activación de RhoGTPasas (Schmidt y Hall, 2002), siendo sus posibles blancos Rho, Rac y Cdc42. Las proteínas RhoGTPasas están involucradas en varios procesos celulares tales como la organización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, expresión génica, progresión del ciclo celular, polaridad, morfogénesis, migración, transporte de membrana y vías de señalización (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997; Schmidt y Hall, 2002; Rossman y col., 2005).

1. Función de RhoGEF3 en las glándulas salivales.

Los resultados obtenidos en embriones que expresaban dsRNAs contra

rhogef3 sugieren que hay una alteración en el desarrollo de las glándulas salivales. El fenotipo de estos embriones es consistente con defectos en la elongación del lumen de las glándulas salivales ya que se pueden observar constricciones a lo largo del eje próximo-distal de este conducto (figura 4). En este contexto, la evidencia indica que el aumento del lumen en las glándulas salivales se lleva a cabo mediante dos procesos, uno involucra la agregación directa de lípidos a la membrana mediante transporte de vesículas hacia el extremo apical (Myat y Andrew, 2002; Abrams y col., 2003; Pirraglia y Myat, 2010), y el segundo proceso implica la formación y disolución dinámica de las uniones adherentes entre las células salivales (Pirraglia y Myat, 2010).

Existen registros de que Rac1 y Cdc42 serían dos posibles RhoGTPasas blanco de RhoGEF3, las cuales podrían dar alguna explicación al fenotipo obtenido de embriones que presentaban un silenciamiento de *rhogef3*. Rac1 está involucrada en el reciclaje de endosomas mediante la endocitosis de cadherina (Pirraglia y col., 2006), a través de una vía independiente de Clathrina (Akhar y Hotchin, 2001). Similarmente, Cdc42 es una RhoGTPasa que a través de la formación de un complejo, regula la endocitosis mediada por actina (Georgiou y col., 2008; Pirraglia y col., 2010). Cuando se disminuye la actividad de Rac1 o Cdc42 las membranas que contienen Cadherina no son endocitadas, provocando una acumulación de estas proteínas que conlleva a una acumulación de los complejos de uniones adherentes célula-célula, aumentando la rigidez de la membrana e impidiendo de esta manera el aumento de la superficie apical en las células de las glándulas salivales. Así, la regulación de Rac1 y/o Cdc42 podrían dar cuenta del fenotipo observado, generando alteraciones en el proceso de formación del lumen de las glándulas salivales.

Además se investigó la relación entre ambas RhoGTPasas con fenotipo presentado por embriones que expresan dsRNAs contra *rhogef3*. Sin embargo, la poca similitud del fenotipo presentado en los embriones que expresan una forma dominante negativa de Cdc42 (figura 9) y la ausencia de fenotipo asociado a la pérdida de función de la RhoGTPasa Rac1, no nos permitieron determinar si Rac1 o Cdc42 son las GTPasas diana de la proteína RhoGEF3. Aunque no se descarta una actividad simultánea de ambas RhoGTPasas debido a la activación de RhoGEF3, ya que proteínas GEF pueden activar a más de una RhoGTPasa (Schmidt y Hall, 2002).

2. Función de RhoGEF3 durante el desarrollo del sistema traqueal.

Con el estudio de los fenotipos de embriones que presentan un silenciamiento del gen *rhogef3* se observó un sistema traqueal discontinuo (figura 7), con una desconexión del DT y una falla en la migración del DB. Tales defectos en el sistema traqueal de *Drosophila* se podrían dar como resultado de alteraciones en las funciones celulares relacionadas con el proceso de migración de las células traqueales. Uno de los procesos esenciales que regula la migración traqueal es la extensión de las células de la punta mediante la formación de filopodios (Ribeiro y col., 2002) y la dinámica de formación de las uniones adherentes que permiten la intercalación celular (Ribeiro y col., 2004).

La formación de filopodios es un proceso necesario para la migración de las células traqueales. Es conocido el papel de Cdc42 en la formación de microfilamentos de actina en la membrana (Eaton y col., 1995; Genova y col.,

2000), y además se ha propuesto que la extensión de filopodios de las células de la punta está regulada por Cdc42 (Wolf y col., 2002). Los embriones que expresaban una forma dominante negativa de la RhoGTPasa Cdc42 no presentaron fenotipo asociado a la falta de función de Cdc42 en las células traqueales, por lo tanto no se observó similitud con el fenotipo obtenido en embriones con silenciamiento de *rhogef3*. Similarmente, se ha reportado el fenotipo esperado para el bloqueo de la actividad de Cdc42 (Wolf y col., 2002), el cual no presenta similitud al fenotipo observado en embriones con una disminución en la expresión de *rhogef3*. En cambio, el fenotipo observado en embriones que expresan el dominante negativo de Rac1, Rac1N17 (figura 10), es similar al que muestran los embriones que expresan un dsRNA contra *rhogef3*, siendo las principales similitudes la falta de unión de DT entre los metámeros y la ausencia de migración de las células correspondientes al DB. Esto sugiere que Rac1 podría ser la RhoGTPasa activada por RhoGEF3, al menos en las células de la tráquea. En estas células, Rac1 regula negativamente la formación de complejos cadherina-catenina en uniones celulares, y la disminución en la actividad de Rac1 promueve la asociación/estabilización de cadherina en la membrana plasmática (Chihara, 2003), esto genera un aumento en las uniones adherentes ralentizando su dinámica, aumentando la rigidez de las células traqueales, y afectando la migración de estas células dependiente del proceso de intercalación celular, proceso que se sustenta en la fluidez y dinámica de la formación de estos complejos.

3. Generación de anticuerpo α -RhoGEF3.

Debido a los resultados obtenidos se nos hizo necesaria la obtención de un anticuerpo que reconozca la proteína RhoGEF3 para así poder estudiar su ubicación subcelular, y de esta forma obtener información más detallada del proceso en el cual RhoGEF3 está involucrado. Luego de un largo proceso fue posible la purificación del dominio carboxilo de la proteína RhoGEF3, el cual fue utilizado en la inyección de un conejo con el objetivo de obtener un anticuerpo policlonal que reconozca la proteína RhoGEF3 en *Drosophila melanogaster*. El suero proveniente de los animales inmunizados, reconoce el antígeno utilizado mediante ensayos de western blot (figura 14A). Además, este mismo reconoce la proteína silvestre RhoGEF3 obtenida de larvas de *Drosophila* (figura 14B). Sin embargo, este anticuerpo no pudo detectar la proteína nativa en el embrión de *Drosophila* mediante inmunofluorescencia. Esto se puede deber a: (1) sólo se presentó el extremo carboxilo de la proteína RhoGEF3 para la síntesis del anticuerpo, el cual puede generar un antígeno que no está disponible en la proteína nativa; (2) la solubilización de la proteína recombinante puede haber cambiado estructuralmente la proteína, ocasionando que el anticuerpo reconozca un epítipo cuya estructura tridimensional no exista o se encuentra inaccesible en la proteína nativa. Por lo tanto, actualmente nos encontramos trabajando para descartar estas dos opciones y de esta forma tener nuestro anticuerpo α -RhoGEF3 en condiciones óptimas para que así reconozca a la proteína RhoGEF3.

El desarrollo de este trabajo nos ha permitido profundizar un poco más en el

conocimiento sobre la regulación del desarrollo morfogénico de los órganos tubulares las glándulas salivales y el sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. Un análisis a nivel molecular nos permitiría conocer la interacción de la proteína RhoGEF3 involucrada, nos mejoraría la posibilidad de determinar la vía de señalización en la cual está involucrada. Además, este análisis podría dar como resultado la función y su posible participación en procesos celulares particulares, como la regulación de la dinámica de las uniones de las células epiteliales que participan en el origen a órganos fundamentales de *Drosophila melanogaster*.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que la proteína RhoGEF3 participa en el desarrollo de las glándulas salivales y del sistema traqueal. Así, RhoGEF3 está involucrada en la regulación del tamaño del lumen en el desarrollo de las glándulas salivales, y también afecta el proceso de migración de las células traqueales, sugiriendo que RhoGEF3 es un importante factor durante el desarrollo del embrión de *Drosophila*. Por lo tanto, la hipótesis que se plantea en este seminario titulada "La proteína RhoGEF3 está involucrada en la formación de las glándulas salivales y del sistema traqueal dentro del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*", fue correcta. Además sugieren un posible proceso celular en el cual RhoGEF3 participaría durante el desarrollo del embrión de *Drosophila*.

Bibliografia.

- Abrams, E. W., Vining, M. S. and Andrew, D. J. (2003). Constructing an organ: the *Drosophila* salivary gland as a model for tube formation. *Trends in Cell Biology* 13, 247–254.
- Affolter, M. and Caussinus, E. (2008). Tracheal branching morphogenesis in *Drosophila*: new insights into cell behaviour and organ architecture. *Development (Cambridge, England)* 135, 2055–64.
- Affolter, M. and Shilo, B. (2000). Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Current opinion in cell biology* 12(6), 731–5.
- Akhtar N. and Hotchin N.A. (2001). RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12(4):847-62.
- Andrew, D. J. and Ewald, A. J. (2010). Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental biology* 341 (1), 34–55.
- Baum, B. and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of cell biology* 192 (6), 907–17.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248–254.
- Bradley, P. L., Haberman, a S. and Andrew, D. J. (2001). Organ formation in *Drosophila*: specification and morphogenesis of the salivary gland. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23, 901–11.
- Bradley, P. L., Myat, M. M., Comeaux, C. a and Andrew, D. J. (2003). Posterior migration of the salivary gland requires an intact visceral mesoderm and integrin function. *Developmental Biology* 257, 249–262.
- Brand, a H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 118, 401–15.
- Brodu, V. and Casanova, J. (2006). The RhoGAP crossveinless-c links trachealless

- and EGFR signaling to cell shape remodeling in *Drosophila* tracheal invagination. *Genes & development* 1817–1828.
- Caussinus, E., Colombelli, J. and Affolter, M.** (2008). Tip-cell migration controls stalk-cell intercalation during *Drosophila* tracheal tube elongation. *Current biology : CB* 18, 1727–34.
- Cheshire, A. M., Kerman, B. E., Zipfel, W. R., Spector, A. A. and Andrew, D. J.** (2008). Kinetic and Mechanical Analysis of Live Tube Morphogenesis. *Developmental Dynamics* 237: 2874–2888.
- Chihara, T.** (2003). Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in *Drosophila*. *Development* 130, 1419–1428.
- de Beco, S., Gueudry, C., Amblard, F. and Coscoy, S.** (2009). Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(17), 7010–7015.
- Eaton, S., Auvinen, P., Luo, L., Jan, Y. N. and Simons, K.** (1995). CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the *Drosophila* wing disc epithelium. *The Journal of cell biology* 131, 151–64.
- Genova J.L., Jong S., Camp J.T., Fehon R.G.** (2000). Functional analysis of Cdc42 in actin filament assembly, epithelial morphogenesis, and cell signaling during *Drosophila* development. *Developmental biology*. 221(1):181-94.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J. and Baum, B.** (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Current biology : CB* 18, 1631–8.
- Haberman, Adam S, Daniel D Isaac, and Deborah J Andrew.** (2003). Specification of cell fates within the salivary gland primordium.” *Developmental Biology* 258(2):443–453.
- Harlow E., Lane D.** (1999). Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Henderson, K D, and D J Andrew.** (2000). “Regulation and function of Scr, exd, and hth in the *Drosophila* salivary gland.” *Developmental biology* 217(2):362–74.
- Jaffe, A. B. and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 247–69.

- Kerman, B. E., Cheshire, A. M. and Andrew, D. J. (2006).** From fate to function: the *Drosophila* trachea and salivary gland as models for tubulogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* **74**, 326–48.
- Kuo, Y. M., Jones, N., Zhou B., Panzer, S., Larson V. and Beckendorf S.K. (1996).** “Salivary duct determination in *Drosophila*: roles of the EGF receptor signaling pathway and the transcription factors Fork head and Trachealess.” 1917:1909–1917.
- Lee, Seungbok, and Peter a Kolodziej. (2002).** “The plakin Short Stop and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion.” *Development (Cambridge, England)* **129(6)**:1509–20.
- Lemon, M., Ferguson, K., Abrams, C. (2002).** Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett.* **513(1)**:71-6.
- Matusek, T., Djiane A., Jankovics F., Brunner D., Mlodzik M. and Mihály J. (2006).** “The *Drosophila* formin DAAM regulates the tracheal cuticle pattern through organizing the actin cytoskeleton.” *Development (Cambridge, England)* **133(5)**:957–66.
- Mercado-Pimentel, M., Jordan, N. and Aisemberg G. (2002).** Affinity purification of GST fusion proteins for immunohistochemical studies of gene expression. *Protein expression and purification* **26(2)**, 260-5.
- Moon S.Y. and Zheng Y. (2003).** Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology.* **13**:13-22
- Myat, M. M. and Andrew, D. J. (2000).** Organ shape in the *Drosophila* salivary gland is controlled by regulated, sequential internalization of the primordia. *Development (Cambridge, England)* **127(4)**, 679-91.
- Myat, M. M. and Andrew, D. J. (2002).** Epithelial Tube Morphology Is Determined by the Polarized Growth and Delivery of Apical Membrane. *Cell* **111**, 879–91.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Pirraglia, C., Jattani, R. and Myat, M. M. (2006).** Rac function in epithelial tube morphogenesis. *Developmental biology* **290**, 435–46.
- Pirraglia, C. and Myat, M. M. (2010).** Genetic regulation of salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers of oral biology* **14**, 32–47.
- Pirraglia, C., Walters, J. and Myat, M. M. (2010).** Pak1 control of E-cadherin

- endocytosis regulates salivary gland lumen size and shape. *Development (Cambridge, England)* 137, 4177–89.
- Ribeiro, C., Ebner, A. and Affolter, M. (2002). In vivo imaging reveals different cellular functions for FGF and Dpp signaling in tracheal branching morphogenesis. *Developmental cell* 2, 677–83.
- Ribeiro, C., Neumann, M., Affolter, M. and Universita, B. Der (2004). Genetic Control of Cell Intercalation during Tracheal Morphogenesis in *Drosophila*. 14, 2197–2207.
- Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 167–80.
- Samakovlis, C., Hacohen N., Manning G., Sutherland D. C., Guillemin K. and Krasnow A. (1996). “Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events.” *Development (Cambridge, England)* 122(5):1395–407.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* 16, 1587–609.
- Schottenfeld, J., Song, Y. and Ghabrial, A. S. (2010). Tube continued: morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Current opinion in cell biology* 22(5), 633-9.
- Simões, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombría, J. C. and Jacinto, A. (2006). Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 133(21), 4257-67.
- Smith, Albert V, and Terry L Orr-weaver. (1991). “The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis : the transition to polyteny.” 1008:997–1008.
- Van Aelst, L. and D’Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* 11, 2295–2322.
- Vining, M. S., Bradley, P. L., Comeaux, C. and Andrew, D. J. (2005). Organ positioning in *Drosophila* requires complex tissue-tissue interactions. *Developmental biology* 287(1), 19-34.
- Wolf, C. and Schuh, R. (200). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes & development* 14(17), 2140-5.

- Wolf, C., Gerlach, N. and Schuh, R. (2002).** Drosophila tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO reports* 3, 563–8.
- Xu, N., Keung, B. and Myat, M. M. (2008).** Rho GTPase controls invagination and cohesive migration of the Drosophila salivary gland through Crumbs and Rho-kinase. *Developmental biology* 321, 88–100.
- Zúñiga, A., Hödar, C., Hanna, P., Ibáñez, F., Moreno, P., Pulgar, R., Pastenes, L., González, M. and Cambiazo, V. (2009).** Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during Drosophila melanogaster embryogenesis. *BMC biology* 7, 61.