

**Títol del treball:** Identificació de serina proteases implicades en l'activació localitzada del receptor Torso tirosina cinasa a l'embrió de *Drosophila melanogaster*.

---

Estudiant: **Enric Furriols Espinosa**

**Grau en Biologia**

Correu electrònic: **enricfurriols@hotmail.com**

Tutors: **Marc Furriols i Alessandro Mineo**

Cotutor: **Núria Sanz**

Empresa / institució: **Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB)**

Vistiplau tutor i cotutor:

Nom del tutors: Marc Furriols i Alessandro Mineo

Nom del cotutor: Núria Sanz

Empresa / institució: Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB)

Correus electrònics: [mfebmc@ibmb.csic.es](mailto:mfebmc@ibmb.csic.es)

[nuria.sanz@udg.edu](mailto:nuria.sanz@udg.edu)

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 29 de maig del 2015

## RESUMS:

**TÍTOL DEL TREBALL:** Identificació de serina proteases implicades en l'activació localitzada del receptor Torso tirosina cinasa a l'embrió de *Drosophila melanogaster*.

**Resum:** Aquest Treball de Final de Grau es centra en experiments de genètica utilitzant *Drosophila melanogaster* com a sistema model. Concretament el treball està emmarcat dins un dels objectius del laboratori del Dr. Jordi Casanova de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) que és el d'identificar els mecanismes implicats en l'activació localitzada del receptor Torso als pols de l'embrió de *Drosophila*. Concretament en identificar una serina proteasa que estigui implicada en l'activació per processament proteolític d'un lligand essencial per a l'activació del receptor, anomenat Trunk. El receptor Torso és el responsable de la formació de les estructures terminals de l'embrió.

A *Drosophila* existeixen més de 200 serines proteases i per identificar la proteasa implicada en el processament d'aquest lligand cal caracteritzar el fenotip produït per la falta de funció de cadascuna de les diferents serines proteases inactivant la seva funció mitjançant la tècnica de RNA d'interferència (RNAi). D'aquesta manera s'aconsegueix inferir en la funció d'una determinada proteasa i, a partir del fenotip embrionari que s'observa, es poden establir interaccions gèniques. Per fer-ho es va dissenyar un mètode experimental per tal de tastar la inactivació de cadascuna de les proteases.

Per tal de comprovar que l'estratègia de l'*screening* realment sigues l'adequada i, així, comprovar que el disseny experimental fos vàlid i capaç de detectar una proteasa involucrada en el sistema terminal es van provar RNAi d'elements coneguts en la via del receptor Torso i es va veure que realment sí que funcionaven.

Tot i així, fins a dia d'avui, no s'ha pogut trobar cap proteasa involucrada en el processament de Trunk, ja que no s'ha observat cap fenotip embrionari de falta de les estructures terminals.

**TÍTULO DEL TRABAJO:** Identificación de serina proteasas implicada en la localización del receptor Torso tirosina cinasa en el embrión de *Drosophila melanogaster*.

**Resumen:** Este Trabajo de Fin de Grado se centra en experimentos de genética utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. Concretamente el trabajo está enmarcado dentro uno de los objetivos del laboratorio del Dr. Jordi Casanova del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB) que es el de identificar los mecanismos implicados en la activación localizada del receptor Torso en los polos del embrión de *Drosophila*. Concretamente en identificar una serina proteasa que esté implicada en la activación por procesamiento proteolítico de un ligando esencial para la activación del receptor, llamado Trunk. El receptor Torso es el responsable de la formación de las estructuras terminales del embrión.

En *Drosophila* existen más de 200 serina proteasas y para identificar la proteasa implicada en el procesamiento de este ligando es necesario caracterizar el fenotipo producido por la falta de función de cada una de las diferentes serina proteasas inactivando su función mediante la técnica del ARN de interferencia (RNAi). De esta manera se consigue inferir en la función de una determinada proteasa y, a partir del

fenotipo embrionario que se observa, se pueden establecer interacciones génicas. Para ello se diseñó un método experimental para probar la inactivación de cada una de las proteasas.

Para comprobar que la estrategia del *screening* realmente fuera la adecuada y, así, comprobar que el diseño experimental fuera válido y capaz de detectar una proteasa involucrada en el sistema terminal se probaron RNAi de elementos conocidos en la vía del receptor Torso y se vio que realmente sí que funcionaban.

Sin embargo, hasta el día de hoy, no se ha podido encontrar ningún proteasa involucrada en el procesamiento de Trunk, ya que no se ha observado ningún fenotipo embrionario de falta de las estructuras terminales.

**TITLE OF THE PROJECT:** Identifying serine proteases involved in the localized activation of the tyrosine kinase Torso receptor in the *Drosophila melanogaster* embryo.

**Abstract:** This Degree Final Project focuses in genetic experiment using *Drosophila melanogaster* as a model system. More specifically, the project is framed within one of the aims of the laboratory lead by Dr. Jordi Casanova in the *Institut de Biologia Molecular de Barcelona* (IBMB) which aims at identifying the mechanisms involved in the localized activation of the Torso receptor in the *Drosophila* embryo pulse. More specifically, in identifying a serine protease that is involved in the activation through proteolytic processing of an essential ligand towards the activation of the receptor, called Trunk. The Torso receptor is the responsible for the formation of the terminal structures of the embryo.

In *Drosophila* there are over 200 serine protease and to be able to identify the protease involved in the processing of this ligand, the phenotype produced by the lack of function of each of the different serine proteases inactivating their function using the interference RNA technique (RNAi). By doing so, inferring in the function of a specific protease and, from the germ phenotype observed, generic interactions can be established. In order to do so, an experimental method was designed so as to test the inactivation of every protease.

In order to check that the screening strategy was really the most convenient one, and so to check that the experimental design was valid and able to spot a protease involved in the terminal system, RNAi from well-known elements in the route of the Torso receptor were checked. The result showed that this strategy worked.

Nevertheless, no protease has been found involved in the Trunk processing so far, since no germ phenotype related to the lack of terminal structures has been observed.

## ÍNDIX

### 1. INTRODUCCIÓ

1.1. <i>Drosophilla melanogaster</i> com a organisme model.....	5
1.2. El cicle vital de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
1.3. Determinació de la polaritat de l'embrió.....	6
1.4. Oogènesi.....	7
1.5. Embriogènesi.....	9
1.6. El sistema terminal .....	10
1.7. Torso, l'element central del sistema terminal i codifica per un receptor de membrana amb activitat tirosina cinasa.....	12
1.8. Activació del receptor Torso: processament local d'un senyal uniforme.....	14

<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>18</b>
--------------------------	-----------

### 3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Sistema GAL4 - UAS (Tubulina germinal i somàtica).....	19
3.2. Inactivació de la proteasa. El silenciament postranscripcional dels gens a partir de l'RNA d'interferència.....	20
3.3. Diferenciació entre mascles i femelles.....	21
3.3.1. Femelles verges.....	22
3.4. Marcadors genètics dominants.....	22
3.5. Anàlisi dels embrions: creuaments genètics i cutícules embrionàries.....	23
3.5.1. Creuaments i tria de fills.....	23
3.5.2. Muntatge de nius.....	24
3.5.3. Preparació i anàlisi de cutícules embrionàries.....	24

### 4. RESULTATS I DISCUSIÓ

4.1. Estratègia de l' <i>screening</i> .....	25
4.2. Validació de l'estratègia de l' <i>screening</i> .....	25
4.2.1. Embrió <i>Wild Type</i> .....	26
4.2.2. UAS - Torso - RNAi .....	26
4.2.3. UAS - torso-like RNAi.....	27
4.2.4. UAS torso-like.....	28
4.3. Llistat de les serines proteases testades.....	29

<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>30</b>
----------------------------	-----------

<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>31</b>
-----------------------------	-----------

## **1. INTRODUCCIÓ**

### **1.1. *Drosophila melanogaster* com a organisme model:**

*Drosophila melanogaster*, col·loquialment anomenada mosca del vinagre o de la fruita, la podem classificar dins dels artròpodes, de la classe dels insectes, de l'ordre dels dípters i de la família Drosophilidae. El seu nom és degut a que s'alimenta de fruites en procés de fermentació com la poma i el raïm.

Charles W. Woodworth (1865-1940) va proposar utilitzar *Drosophila* per a la investigació biològica. Al 1910 Thomas Hunt Morgan va començar a utilitzar-la en estudis experimentals de l'herència, ja al 1915 va demostrar la teoria cromosòmica de l'herència a partir d'estudis experimentals amb *Drosophila*. Pel fet de la gran quantitat de dades experimentals que s'havien obtingut durant aquests anys previs actualment és molt utilitzada com a organisme model per estudiar el desenvolupament embrionari.

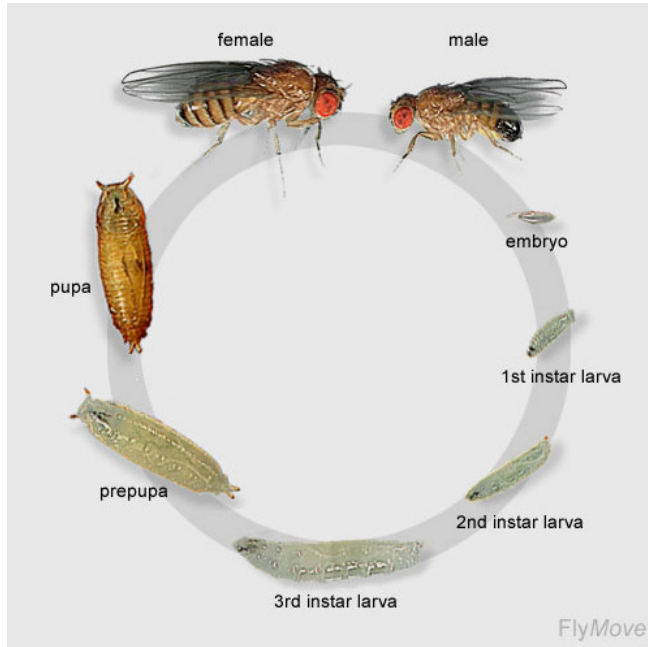
A més de *Drosophila* s'utilitzen altres organismes model com *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* (ratolí comú) ja que molts dels gens es troben conservats en la majoria dels organismes al llarg de tota l'escala animal, inclòs l'home. A més a més, s'ha observat una gran igualtat entre els processos bàsics del desenvolupament en diferents espècies animals (Mc Ginnis i col, 1984; Hoffman, 1989). Per tant, la raó principal de l'ús d'organismes model és la presència de gens i vies conservades entre diferents espècies.

*Drosophila melanogaster* s'ha escollit com a organisme model ja que entre d'altres avantatges, ofereix múltiples possibilitats tècniques a l'hora de ser manipulat, té un temps de generació curt i la seva descendència és abundant. Cal destacar, també, que és un animal petit, per tant, es pot mantenir amb un espai reduït i el cost de l'esforç de manteniment són relativament baixos. És una espècie amb pocs cromosomes (3 parells d'autosomes i 1 de sexual), té una morfologia fàcilment identificable facilitant així el creuament genètic, un cicle de vida molt curt (10 dies) i les femelles tenen elevada fecunditat (posen fins a 100 ous per dia i 2000 en un cicle de vida), de manera que es poden estudiar diverses generacions en poques setmanes. Presenta cromosomes balancejadors els quals no es recombinen ja que presenten múltiples inversions que fan gairebé impossible que hi hagi recombinació amb el seu cromosoma homòleg. A més a més, porta marcadors genètics dominants visibles en heterozigosi (com per exemple la morfologia de les ales o les quetes). Cal destacar que ja al març del 2000 es va publicar la seqüència del genoma complet amb 13.600 gens aproximadament (165 Mb de genoma, on 1 Mb=1 milió de parells de bases) la qual cosa ha permès molts avantatges a nivell molecular.

L'anàlisi genètica de *Drosophila melanogaster* ha resultat ser molt fructífer, ja que ha permès identificar molts gens implicats en diversos processos del desenvolupament, així com també ha permès establir interaccions gèniques entre aquests. L'anàlisi genètica es basa en la possibilitat d'induir mutacions en el genoma i d'inferir la funció del gen mutat a partir del fenotip que s'observa.

## 1.2. El cicle vital de *Drosophila melanogaster*:

*Drosophila melanogaster* és un insecte holometàbol, que pateix una metamorfosi completa. El seu cicle biològic passa pels estadis de larva, pupa i imago, amb només 10 dies a 25°C (veure figura 1).



**Figura 1.** Cicle vital de *Drosophila melanogaster* (extret de *FlyMove*).

El seu desenvolupament és un procés altament estandaritzat. La femella diposita a l'exterior un ou fecundat que eclosiona passades 24 hores donant lloc a una larva de vida lliure. Aquesta passa per tres estadis larvaris (L1, L2 i L3) que apareixen, respectivament, després de l'eclosió i de dues mudes. Les dues primeres fases larvàries duren un dia i la tercera en dura dos. Així, al cap d'uns cinc dies, la larva de tercer estadi forma una pupa i té lloc la metamorfosi, durant la qual es formen les estructures adultes, en detriment dels teixits larvaris. Finalment, al cap d'uns deu dies emergeix la mosca adulta, que a les poques hores ja és fèrtil i pot iniciar el nou cicle vital.

## 1.3. Determinació de la polaritat de l'embrió

El desenvolupament embrionari inicial de *Drosophila* té la peculiaritat d'estar regulat per uns determinants que estan sota control del genoma matern. Durant l'oogènesi l'òocit va acumulant selectivament diferents mRNAs i proteïnes (informació materna) que són els responsables de definir la polaritat de l'embrió i d'organitzar el patró de l'organisme, mitjançant l'activació diferencial del genoma zigòtic. Per tant, doncs, l'establiment dels eixos bàsics de l'embrió depèn de la informació posicional generada durant l'oogènesi (Nüsslein-Volhard i col., 1987; Manseau i Schüpbach, 1989; Lipshitz, 1991; St Johnston i Nüsslein-Volhard, 1992).

S'han identificat quatre sistemes de gens materns responsables de definir l'eix antero-posterior i l'eix dorso-ventral. La seva existència va ser evidenciada per nombrosos *screenings* genètics realitzats per identificar mutacions d'efecte matern implicades en la formació del patró embrionari (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992).

Tres d'aquests grups, o sistemes, de gens materns (l'anterior, el posterior i el terminal) determinen el patró embrionari de l'eix antero-posterior (Nüsslein-Volhard i col., 1987; St Johnston i Nüsslein-Volhard, 1992). El sistema anterior encarregat de donar lloc a les estructures més anteriors de l'embrió com el cap i el tòrax; el sistema posterior encarregat de donar lloc a les estructures posteriors com l'abdomen i la línia germinal i el sistema terminal encarregat de generar les estructures més terminals de l'embrió com l'àcron a la part anterior i el tèlson a la posterior. El quart sistema anomenat dorso-ventral és, tal i com indica el seu nom, el responsable de generar l'eix dorso-ventral.

Pel correcte establiment de la polaritat de l'òocit es precisen dues induccions seqüencials, primer de la línia germinal cap al soma i després una inducció que torna del soma cap a la línia germinal. En última instància, però, la polaritat depèn de l'organització interna del seu citoesquelet (González-Reyes i St Johnston, 1994; González-Reyes i col., 1995; Roth i col., 1995; revisat a Rongo i Lehman, 1996; Lehman, 1995; Anderson, 1995).

A l'òocit madur, doncs, fins i tot abans de ser fecundat, ja hi ha tota la informació materna necessària per controlar els primers estadis de l'embriogènesi i per organitzar el patró. L'oogènesi, per tant, és un procés clau en l'establiment del patró. Per entendre com la informació materna organitza la formació del patró, primer cal conèixer com funciona l'oogènesi a *Drosophila*. Així, en el següent apartat faré un breu resum morfològic sobre l'oogènesi.

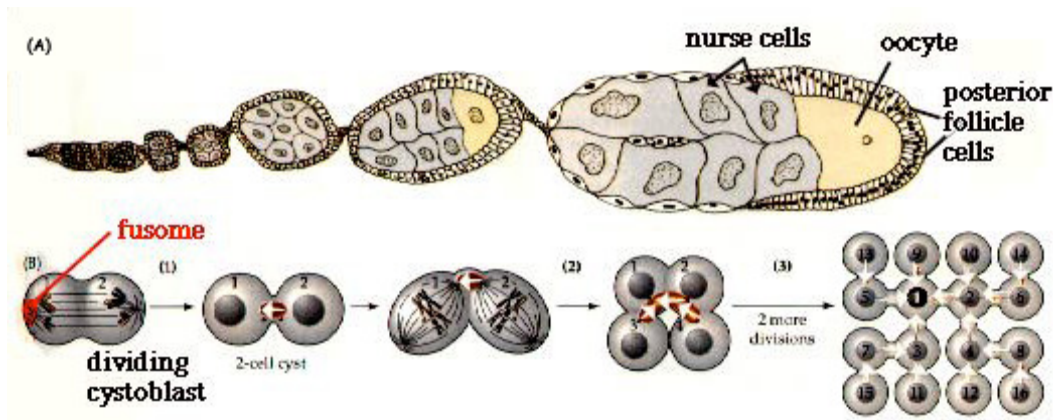
#### 1.4. Oogènesi

L'oogènesi és el procés de formació de l'òocit i es dona a les cambres ovàriques, les quals es troben situades en els ovaris. El sistema reproductor femení de *Drosophila* consta de dos ovaris que comuniquen per l'oviducte amb l'úter de la femella. Els òocits són fecundats a l'interior de l'úter gràcies a l'alliberament de l'esperma emmagatzemat a l'espermateca o receptacle seminal. L'espermatozou sencer entra a l'òocit per la part anterior a través del micròpil. La fecundació es dona quan encara té lloc la primera divisió meiótica del nucli femení. Un dels quatre pronuclis masculins s'acaba fusionant amb el pronucli masculí per formar el zigot. Posteriorment, els ous són dipositats al medi exterior on completen el desenvolupament embrionari.

Les femelles de *Drosophila* presenten entre 16 i 18 ovarioles per ovari, i cada ovariola està formada per un gran nombre de cambres ovàriques. Les cambres ovàriques van desplaçant-se al llarg de l'ovariola a mesura que maduren, gràcies a les contraccions de la musculatura que forma part de la beina epitelial. Així, doncs, en una mateixa ovariola es poden observar els diferents estadis de desenvolupament de les cambres ovàriques.

Cada cambra ovàrica es compon d'una cèl·lula germinal que realitza quatre divisions incompletes, donant un total de 16 cèl·lules germinals connectades per ponts citoplasmàtics. Una d'aquestes cèl·lules esdevé l'òocit, mentre que la resta esdevenen poliploides i es diferencien cap a cèl·lules nodradores (*nurse cell*) (15 cèl·lules nodradores i l'òocit, situat a la part posterior) envoltades per un epiteli de cèl·lules somàtiques anomenades cèl·lules fol·liculars (veure figura 2 a la següent pàgina). L'òocit sempre acaba ocupant la posició més posterior, aquesta és, doncs, la primera evidència de que existeix una polaritat antero-posterior ja molt a l'inici de l'oogènesi.

Les cèl·lules nodridores s'encarreguen de sintetitzar i transportar a l'òcit tots els elements necessaris perquè l'òcit fecundat pugui iniciar el procés de desenvolupament. Aquests components són coneguts com a components d'efecte matern i estan formats principalment per mRNA, ribosomes i altres proteïnes. La polaritat antero-posterior (AP) i dorso-ventral (DV) es determina ja en aquests estadis previs a la fecundació, a diferència d'altres organismes model, com per exemple *C.elegans*, en els que la polaritat es determina per l'entrada de l'espermatozoide.



**Figura 2:** Oogènesi a *Drosophila*. (A) Ovariola amb cambres ovàriques en diferents estadis de maduració. (B) Diagrama de les quatre divisions que pateix una única cèl·lula germinal fins a l'obtenció de 16 cèl·lules interconnectades. Una de les dues cèl·lules amb quatre ponts citoplasmàtics (marcades amb 1 i 2) passa a ser l'òcit (Horne-Badovinac and Bilder, 2005).

A la part anterior de l'ovariola hi ha el *germarium*, que és la zona productora de cambres ovàriques a partir de cèl·lules mare germinals i de cèl·lules mare somàtiques. Al *germarium* dues o tres cèl·lules mare germinals es divideixen asimètricament per tal de generar una nova cèl·lula mare i un citoblast.

Abans que el cist abandoni el *germarium* és envoltat per unes 60-80 cèl·lules fol·liculars derivades de la línia somàtica. El cist envoltat per un epiteli de cèl·lules fol·liculars s'anomena cambra ovàrica. Cada cambra ovàrica està connectada a la següent cambra per unes cèl·lules fol·liculars somàtiques especialitzades anomenades cèl·lules tija o pedunculars.

Les cèl·lules fol·liculars que envolten el cist encara es divideixen 4 o 5 vegades més, de manera que al final hi ha un centenar de cèl·lules fol·liculars que esdevenen poliploides formant part de cada cambra ovàrica.

A mesura que les cambres ovàriques maduren, tant l'òcit com les cèl·lules nodridores van creixent de mida ja que acumulen material de reserva, de manera que van ocupant un volum cada vegada més gran dins la cambra ovàrica. En aquest moment, diferents productes materns s'acumulen selectivament en diferents regions de l'òcit. La localització espacial d'aquets és un dels elements claus que determinarà la polaritat de l'embrió.

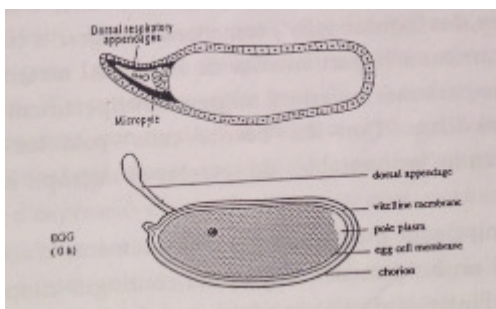
Igualment, a les cèl·lules fol·liculars es detecten clars signes de polarització tant en l'eix antero-posterior com en el dorso-ventral. A mesura que l'òcit va augmentat de mida, la majoria de les cèl·lules fol·liculars migren cap a la regió posterior formant un epiteli



columnar al voltant de l'òcit. Unes 50 cèl·lules anomenades *stretched cells*, però, no migren i adopten una forma molt aplanada cobrint les cèl·lules nodridores. En un estadi posterior de l'oogènesi, un grup de 6-10 cèl·lules fol·liculars anteriors, anomenades *border cells*, migren a través de les cèl·lules nodridores fins arribar a la part anterior de l'òcit. Alhora, les cèl·lules columnars més anteriors, anomenades *centripetal cells*, migren centripetament entre l'òcit i les cèl·lules nodridores.

Finalment, degut a contraccions dels filaments d'actina de les cèl·lules nodridores, hi ha un buidament complet del contingut citoplasmàtic d'aquestes cèl·lules cap a l'interior de l'òcit, de manera que al final s'acaba tenint una única cèl·lula, l'òcit, envoltat per un epitelí de cèl·lules fol·liculars. Podem dir, doncs, que les cèl·lules fol·liculars envolten i protegeixen l'òcit quan està a dins de la femella i tenen un paper actiu en la correcta polarització de l'ou i de la coberta que el recobreix. Al final de l'oogènesi aquestes cèl·lules fol·liculars degeneraran.

Les cèl·lules fol·liculars són les responsables de secretar les diferents cobertes que recobreixen l'ou: el còrion i la membrana vitel·lina (veure figura 3). El còrion és la capa més externa de l'ou i permet l'intercanvi de gasos. Mostra clarament una clara polaritat tant en l'eix antero-posterior com en el dorso-ventral, reflexant clarament l'existència de diferents tipus de cèl·lules fol·liculars. Així, a la part anterior del còrion es troben dos llargs apèndix dorsals. La membrana vitel·lina es troba entre el còrion i la membrana plasmàtica de l'ou, donant impermeabilitat i rigidesa a l'ou. L'espai que hi ha entre la membrana plasmàtica i la membrana vitel·lina s'anomena espai perivitel·lí, i consisteix en un fluid pel que hi poden difondre diferents molècules extracel·lulars. La membrana vitel·lina també presenta una clara polaritat en els seus eixos.



**Figura 3:** L'ou de *Drosophila* (St Johnston i Nüsslein-Volhard, 1992)

L'establiment dels eixos bàsics de l'embrió depèn de la polaritat de l'òcit establerta durant l'oogènesi. En última instància, però, la polaritat de l'òcit depèn de l'organització interna del seu citoesquelet. Per tant, en l'òcit madur, abans de ser fecundat, ja hi ha tota la informació materna necessària per controlar els primers estadis de l'embriogènesi i per organitzar el patró. L'oogènesi és, doncs, un procés clau en l'establiment del patró.

## 1.5. Embriogènesi

El desenvolupament embrionari de *Drosophila* s'inicia en el moment en què l'òcit és fecundat per l'espermatozoide, moment a partir del qual el nucli del zigot comença a dividir-se. Al principi hi ha unes quantes divisions nuclears sincròniques sense cap

procés de cel·lularització (cariocinesi sense citocinesi), formant-se així un blastoderm sincicial (Lawrence, 1992; Leptin and Roth, 1994). Les primeres divisions nuclears tenen lloc en el centre de l'embrió, però els nuclis comencen a migrar cap a la perifèria al cap de poques divisions. Els primers nuclis en assolir aquesta posició són els del pol posterior, on es formaran les cèl·lules polars. Aquestes cèl·lules són les precursoras de la línia germinal.

Un cop els nuclis arriben a la perifèria de l'embrió es divideixen sincrònicament tres cops més abans d'iniciar la seva cel·lularització. La membrana plasmàtica s'estén cap a l'interior gràcies a la reorganització del citoesquelet d'actina, amb el que finalment es completa la cel·lularització. D'aquesta manera es genera un blastoderm cel·lular format per un epitelí columnar d'unes 5000-6000 cèl·lules de forma hexagonal i unes 35 cèl·lules polars arrodonides situades a la part posterior de l'embrió.

A partir de l'inici de la cel·lularització, els cicles mitòtics s'alenteixen i l'activitat transcripcional es fa evident. Així, el control dels processos de proliferació, fins ara controlats pel genoma matern, passa a estar regulat pel genoma zigòtic. Un cop s'acaba la cel·lularització del blastoderm, s'inicia el procés de gastrulació amb la invaginació del mesoderm a través del solc ventral, la invaginació de l'intestí posterior que conté cèl·lules polars i l'aparició del solc cefàlic. Invaginacions, delaminacions, migracions i divisions cel·lulars posteriors condueixen a la formació dels diferents òrgans i estructures. Quan el desenvolupament embrionari finalitza, l'ou eclosiona i en surt una larva petita que creixerà i, després de dues mudes i una pupa, passarà a donar lloc a una mosca adulta.

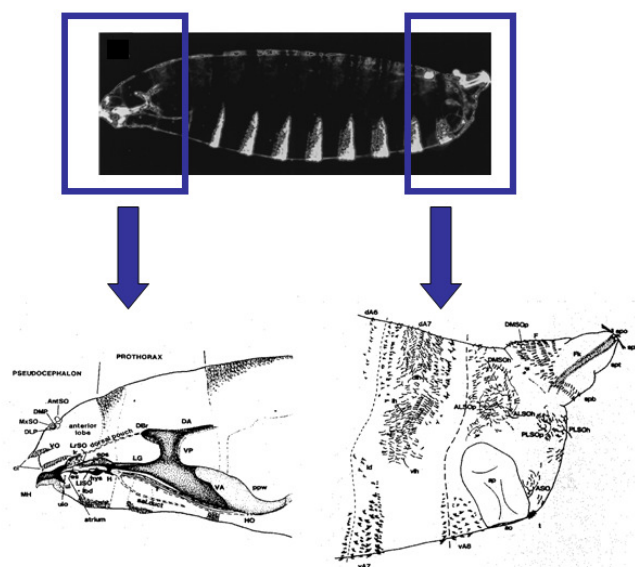
El desenvolupament és un procés biològic altament complex que implica canvis genètics, cel·lulars i morfològics. I tots aquests canvis han d'estar molt ben regulats i coordinats, ja que a mesura que avança el desenvolupament, hi ha més cèl·lules i/o tipus cel·lulars, i tots han de relacionar-se i interactuar per, a partir d'una única cèl·lula, donar lloc a un organisme complet. Les cèl·lules, per tal de coordinar-se, han de comunicar-se les unes amb les altres i han de relacionar-se amb el medi. Les que tinguin característiques similars s'agruparan i s'integraran per formar teixits específics que es disposaran d'una determinada manera formant òrgans que interrelacionaran amb els teixits adjacents. L'habilitat de les cèl·lules per respondre a senyals extracel·lulars radica en un conjunt de mecanismes que són àmpliament utilitzats en diferents contextos i altament conservats en organismes diferents.

Encarat amb *Drosophila* el desenvolupament embrionari comença amb la generació d'un zigot i finalitza amb una larva o un individu jove que emergeix i que es continua desenvolupant fins a arribar a un estadi adult reproductiu. Es poden distingir tres etapes comunes: (1) divisió o proliferació, en què el zigot pateix un seguit de divisions que donen lloc a una massa de cèl·lules indiferenciades; (2) gastrulació, a partir de la qual es comencen a formar els fulls embrionaris; (3) organogènesi, ja en els metazous més desenvolupats, que és un procés a partir del qual es formen els teixits i els òrgans de l'individu.

## 1.6. El sistema terminal

El sistema terminal és el responsable de determinar el desenvolupament de les estructures més anteriors i posteriors de l'embrió de *Drosophila* (veure figura 4 a la següent pàgina).

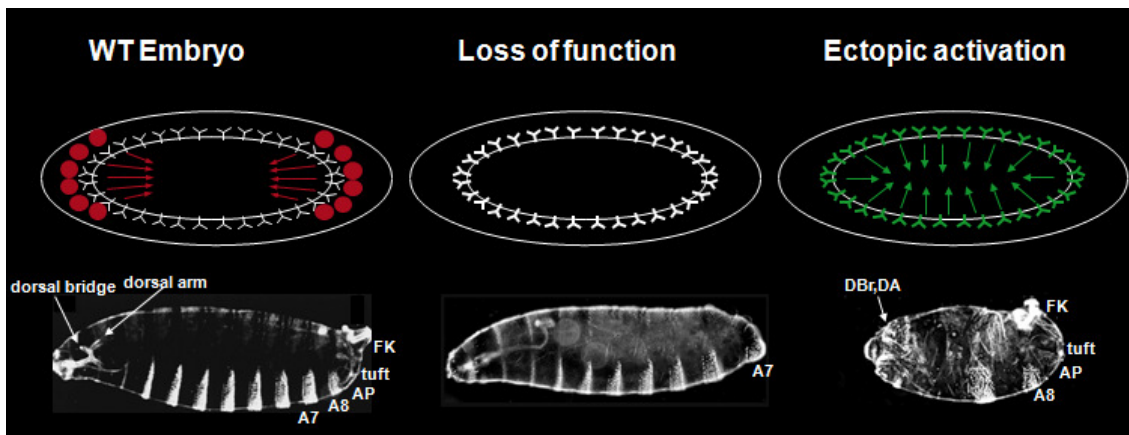
L'existència d'aquest sistema va ser descoberta en l'anàlisi de fenotips mutants obtinguts en *screenings* genètics (Nusslein-Volhard et al., 1987; Schupbach and Wieschaus, 1986). En aquests *screenings* en van aïllar tot un conjunt de mutants d'efecte matern que presentaven un fenotip similar: les larves dels embrions dipositats per les femelles mutants no presentaven les estructures terminals. La similitud de fenotips suggeria que la versió salvatge dels gens alterats en tots aquests mutants intervenia en una mateixa via bioquímica, responsable d'especificar les estructures terminals.



**Figura 4:** Cutícula d'un embrió *Wild-Type* i detalls de l'extrem anterior i posterior (Jürgens i Hartenstein, 1993). (FK) filzkörper, (ap) anal pads, (t) tuft, (ASO) anal sense organ, (A8) segment abdominal vuitè, (A7) segments abdominal setè, (DB) dorsal bridge, (DA) dorsal arm, (VA) ventral arm.

Per referir-nos als mutants del sistema terminal, o a qualsevol mutant d'un gen d'efecte matern, parlem d'embrions mutants, quan en realitat són mutants les mares que els dipositen. Els fenotips mutants que han permès identificar els elements del sistema terminal són el de falta funció i el de guany de funció.

El fenotip cuticular de falta de funció materna (veure figura 5B) del sistema terminal va ser descrit per Schüpbach i Wieschaus el 1986, en mutants pels gens dels gens terminals (*torso (tor)* i *trunk (trk)*) i es caracteritza per la pèrdua total o parcial de les estructures terminals (anteriors i posteriors) de l'embrió (veure figura 5A). A la regió anterior de les larves mutants per *tor* no es forma el *labrum*. Hi ha també una reducció dels braços faringítics de l'esquelet quitinós que forma la mandíbula, de manera que no es formen ni el braç dorsal (*dorsal arm*) ni el ventral (*ventral arm*), així com tampoc el pont dorsal (*dorsal bridge*). Totes aquestes estructures corresponen a la regió més anterior del cap abans que aquest s'invagini. La resta d'estructures que ocupen posicions més anteriors deriven en realitat de segments cefàlics més posteriors i sempre són presents en els mutants del sistema terminal (Jürgens i Hartenstein, 1993). A la regió posterior desapareixen les plaques anals (ap), el *tuft*, els espiracles i els *filzkörper*, i el segment A8. Aquest fenotip pot presentar una gradació, segons el tipus de mutació.



**Figura 5:** Cutícules d'embrions. (A) *wild-type*, (B) de pèrdua de funció de *tor* i (C) de guany de funció de *tor*. (Figura realitzada per Alessandro i Marc).

Una contribució important per entendre com el sistema terminal defineix la seva informació posicional va ser l'aïllament de mutacions que produïen un fenotip *spliced* o de guany de funció (Schupbach and Wieschaus, 1989). Aquest fenotip es caracteritza per una reducció o desaparició de les estructures centrals de l'embrió (els segments toràcics i abdominals), mentre que les estructures terminals es formen d'una manera més o menys precisa (veure figura 5C). En alguns casos, fins i tot, poden aparèixer ectòpicament algunes estructures terminals com, per exemple, *filzkörpers*, també poden desaparèixer alguns segments abdominals, toràcics o cefàlics. L'anàlisi genètica i molecular va permetre constatar que tots aquests fenotips *spliced* estaven causats per mutacions dominants del gen *tor* (Casanova and Struhl, 1989; Klingler et al., 1988; Sprenger et al., 1993; Strecker et al., 1989). Es tracta d'al·lels de guany de funció per què produeixen un fenotip contrari i complementari als al·lels de pèrdua de funció, com a conseqüència d'una activitat de *tor* a tot l'embrió. Això va fer suggerir que en una situació salvatge l'activitat de *tor* es troba restringida als pols. L'existència d'aquestes mutacions de guanys de funció va permetre situar el gen *tor* com a element central del sistema terminal i avançar molt en la dissecció de la via i en el coneixement de com el sistema terminal especifica el patró.

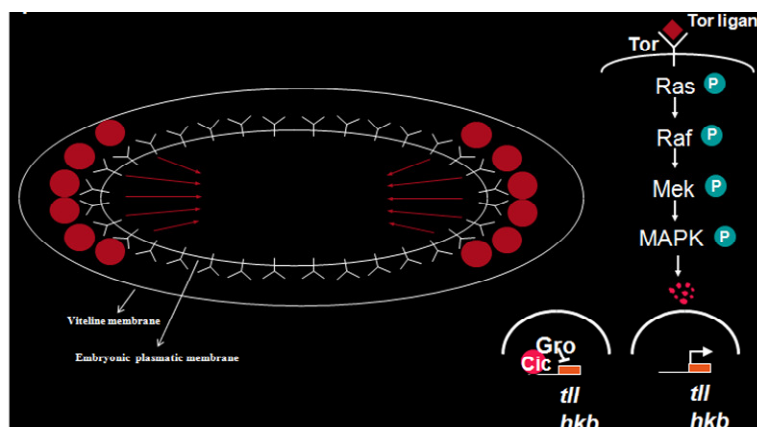
### 1.7. Torso, l'element central del sistema terminal i codifica per un receptor de membrana amb activitat tirosina cinasa

*tor* és un gen requerit maternament i el seu ARNm és dipositat a l'òocit per les cèl·lules nodridores durant l'oogènesi. Així, l'ARNm de *tor* es transcriu de manera uniforme durant l'oogènesi. La proteïna Tor a l'inici de l'embriogènesi ja es comença a traduir, associant-se a la membrana cel·lular del blastoderm sincicial (Casanova and Struhl, 1989).

La proteïna central del sistema terminal de *Drosophila* és el producte del gen *torso* (*tor*), que codifica per un receptor amb activitat tirosina cinasa (RTK) que ha estat emprat com un dels sistemes model per analitzar genèticament l'activitat d'aquestes vies de senyalització per receptor. El receptor Torso es troba distribuït per tota la superfície de

l'embrió en estadi de blastoderma sincicial, però només és activat als pols. L'activació de Torso en els pols de l'embrió és la responsable de l'expressió dels gens *tailless* (*tll*) i *huckebein* (*hkb*) (Casanova and Struhl, 1989; Duffy and Perrimon, 1994; Furriols and Casanova, 2003; Li, 2005; Sprenger et al., 1989) (veure figura 6). També en mutants Torso el gen *tll* no s'expressa i, per contrari, en mutants de guany de funció de Torso (mutacions dominants de Torso) que codifiquen per formes constitutivament activades del receptor *tll* s'expandeix cap a les regions centrals, és a dir, hi ha expressió ectòpica de *tll*. Aquests gens inicien els programes de desenvolupament que donaran lloc a les parts terminals més anteriors i posteriors de l'embrió. Tot i això, més que activar l'expressió de gens per activació directa, la via de senyalització de Tor funciona inactivant als pols de l'embrió un repressor que es distribueix uniformement i que necessita el co-repressor Groucho (Gro). Quan Torso s'activa pel seu lligand, provoca una cascada de fosforilacions (Ras/Raf/MAPK) que porta, en última instància, a l'expressió dels gens zigòtics terminals. En els pols, on Tor està activat, la proteïna Cic es degrada i això provoca l'expressió de *tll* i *hkb* (veure figura 6). Al centre, per contra, la via de Tor està inactivada i això porta a que Cic i Gro reprimeixin l'expressió dels gens terminals (veure figura....). Aquest component del complex repressor és el producte del gen *capicua* (*cic*), que codifica per un putatiu factor de transcripció que presenta un domini d'unió al DNA de la classe "HMG box" (per *High Motility Group*), i que sembla ser la diana que s'inhibeix per la senyalització de Tor.

Estructuralment, Tor és un RTK de 923 aminoàcids, el qual conté una regió N-terminal extracel·lular, un sol domini transmembrana i un domini tirosina cinasa C-terminal citoplasmàtic (Sprenger et al., 1989). Tot i que el domini extracel·lular, que és el responsable de la unió al lligand, no presenta homologia amb cap RTK conegut, Tor és estructuralment homòleg als RTK de tipus III, degut al seu domini tirosina cinasa (Ullrich and Schlessinger, 1990; Yarden and Ullrich, 1988). Aquest subtipus de receptors, entre els quals es troba el receptor de factors de creixement derivats de plaquetes (PDGF-R) i el receptor de factors de creixement vasculars endotelials (VEGF-R), presenten la característica de que el domini tirosina cinasa intracel·lular està interromput per una inserció d'aproximadament cent aminoàcids hidrofílics. Aquests residus juguen un paper molt important en la unió de les proteïnes adaptadores, les quals faran de mitjanceres en la transducció de la senyal des del receptor fins al nucli (Hanks and Hunter, 1995; Heldin and Westermark, 1999; van der Geer et al., 1995). Torso comparteix aquest caràcter estructural i, per tant, pertany a aquest subgrup de receptors.



**Figura 6:** Sistema terminal com a exemple de RTK activat per lligand. (Figura realitzada per Alessandro i Marc).

Aquests fenotips estan produïts només per mutacions o al·lels molt concrets del gen *Tor*. Cal dir que aquestes mutacions són dominants i que els al·lels codifiquen per formes constitutivament actives del receptor per tot l'embrió independentment de la unió del lligand. Veiem, doncs, el receptor tot i que s'acumula per tot l'embrió només és activat als pols.

### 1.8. Activació del receptor torso: processament local d'un senyal uniforme

Fins ara s'han descrit els següents elements implicats en l'activació del receptor Torso en els pols de l'embrió: *torso-like* (*tsl*) (Degelmann et al., 1986; Nusslein-Volhard et al., 1987), *nasrat* (Degelmann et al., 1986), *polehole* (Perrimon et al., 1986), *trunk* (*trk*) (Schupbach and Wieschaus, 1986) i closca (Casanova et al., 2010).

Com he dit abans Torso és un RTK que es distribueix de manera uniforme al llarg de la superfície embrionària en l'etapa de blastoderm, però la seva activació es produeix només en els pols, on és responsable de l'expressió dels gens *tailles* (*tll*) i *huckebein* (*hkb*).

Es coneix que el producte del gen *torso-like* (*tsl*) és l'element clau per a l'activació restringida del receptor Torso en els extrems de l'embrió. *tsl* és l'únic gen del sistema terminal que s'expressa en les cèl·lules fol·liculars (que envolten l'òdit) enllòc de l'òdit i les cèl·lules nodradores, i que ho fa d'una manera localitzada a cada extrem de l'òdit en maduració, a les *border cells* i les *centripetal cells*, en el pol anterior, i les cèl·lules fol·liculars posteriors, en el pol posterior (Stevens et al., 1990). En absència de Tsl, el receptor no és activat i, al revés, l'expressió ubiqua de Tsl durant l'oogènesi en totes les cèl·lules fol·liculars que envolten l'òdit condueix a l'activació general del receptor Torso sobre tota la superfície embrionària (Furriols et al., 1998; Martin et al., 1994; Savant-Bhonsale and Montell, 1993; Sprenger et al., 1993).

Tot i que *tsl* s'expressa durant la oogènesi, la seva funció no es requereix fins als primers estadis de l'embriogènesi, quan es dona l'activació restringida de Torso. Al final de l'oogènesi, les cèl·lules fol·liculars que estan envoltant l'òdit degeneren. Tsl és secreta des de les cèl·lules fol·liculars s'acumula en els pols de la membrana vitel·lina, on es manté localitzada fins després de la fecundació, quan realitzarà la seva funció (Stevens et al., 2003).

La naturalesa de Tsl com una proteïna secretada i produïda per les cèl·lules especialitzades del fol·licle a cada extrem de l'òdit va fer plantejar la hipòtesi de que Tsl pogués actuar com a lligand del receptor Tor: secretada per les cèl·lules fol·liculars, Tsl es mantindria enganxada a la membrana vitel·lina durant l'oogènesi i seria alliberada per tal d'unir-se al receptor Tor durant els primers moments de l'embriogènesi (Martin et al., 1994). Estudis recents demostren que hi ha una translocació de *tsl* cap a la membrana vitel·lina, és a dir, *tsl* queda ancorat i el receptor Torso pateix algun tipus de modificació. Tot i això no es reflecteix la seva unió al receptor (Mineo et al., 2015).

Ara bé, la caracterització genètica i molecular del gen *trk* va permetre plantejar un model alternatiu per a l'activació del receptor Tor, en què el producte del gen *trk* seria el lligand de Torso. Les mutacions en el gen *trk* provoquen el mateix fenotip observat en mutacions en els gens *tor* i *tsl* (Schupbach and Wieschaus, 1986). Igual que *tsl*, *trk* és necessari per a l'activació del receptor Torso, però a diferència de *tsl*, la funció del gen

*trk* es requereix a la línia germinal i no a les cèl·lules fol·liculars somàtiques (Schupbach and Wieschaus, 1986).

El gen *trk* codifica per una proteïna de 226 aminoàcids. La proteïna Trk conté un ordenament de cisteïnes en el seu domini C-terminal, que recorda *cystine Knot* present en molts factors de creixement i lligands extracel·lulars (Casanova et al., 1995). També conté un pèptid senyal en el seu domini N-terminal, indicant que es tracta d'una proteïna secretada. Tot i que la seva seqüència suggereix que es *trk* podria codificar pel lligand Torso, la seva distribució uniforme per l'òcit sembla difícil de reconciliar amb el fet que Torso només és activats als pols. Encara hi ha una altra característica de la proteïna Trk, però, que donaria una explicació a aquesta paradoxa aparent i és que s'han identificat putatius llocs de clivellament en Trk, el que permet suggerir que la proteïna és exposada a proteòlisi per generar un fragment C-terminal actiu (Casanova et al., 1995). A més a més, la substitució d'un sol aminoàcid d'un dels llocs d'escissió putatius de la proteïna Trk és important per a l'activitat *in vivo* de Trk. Totes aquestes dades porten a la hipòtesi que el lligand de Torso podria ser el fragment C-terminal de Trk generat pel seu clivellament restringit als pols de l'embrió (Casali and Casanova, 2001). Així, doncs, el model suggerit, és que el fragment C-terminal de la proteïna Trk generada per proteòlisi limitada només en els pols de l'òcit podria actuar com a lligand del receptor Torso. A més a més, sembla ser que Tsl estaria implicat en la generació de la forma activa de *trk* en els pols de l'embrió (Mineo et al., 2015)..

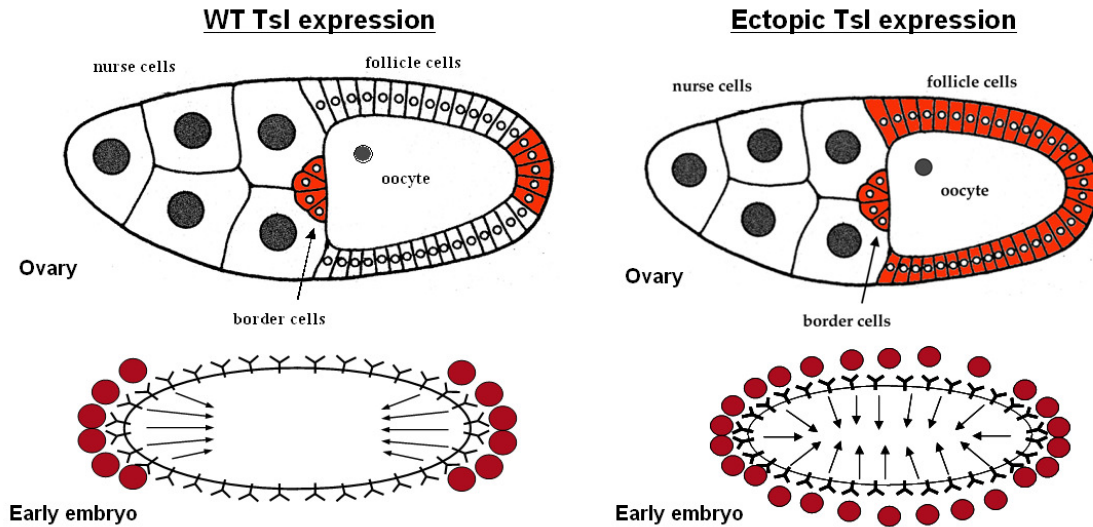
Establir quina de les dues proteïnes, Tsl o Trk, actuava com a lligand de Tor va resultar important, no tant per conèixer les funcions d'aquestes proteïnes, sinó sobretot per aclarir quin mecanisme hi havia darrera de l'activació restringida del receptor Torso: o bé el dipòsit local del lligand en els pols, o bé la proteòlisi restringida d'un precursor de lligand distribuït uniformement.

D'altra banda, l'acumulació de *Nasrat* i *pole-hole* i closca a la membrana vitel·lina juga un paper addicional en l'activació del receptor Torso. En mutants *Nasrat* i *pole-hole*, la proteïna Tsl es no detecta al voltant de l'òcit indicant un paper de tres gens en l'acumulació i estabilitat del producte secretat de Tsl. Per tant, als pols de la membrana vitel·lina es vincula la informació espacial de les cambres ovàriques a l'activació del receptor Torso restringit en l'embriogènesi primerenca.

*Nasrat*, *pole-hole* i *closca* s'acumulen a la membrana vitel·lina, a més a més, fan falta per la integritat de la membrana vitel·lina i per l'ancoratge de *tsl* a la membrana vitel·lina. Per tant, quan Tsl és activat s'acumula als pols de la membrana vitel·lina (Mineo et al., 2015).

Tot i que no s'ha demostrat la unió de Trk ni de Tsl al receptor Torso així com tampoc el processament de Trk, les dades funcionals recolzen fortament la hipòtesi de que Trk actui com a lligand de Torso. En concret, un fragment C-terminal de 108 aminoàcids de la proteïna Trk és capaç d'activar la via de Torso, fins i tot en mutants de *tsl*, *Nasrat* o *pole-hole* (Casali and Casanova, 2001; Stein and Stevens, 2001). Això està en contrast amb l'observació que l'expressió ectòpica de Tsl encara requereix *Nasrat*, *pole-hole* i la funció de *trk* per produir fenotips associats amb l'activitat general del receptor Torso (veure figura 7 a la següent pàgina). En conjunt aquestes observacions suggereixen que el control d'activació de Torso és degut a la proteòlisi limitada d'un precursor de lligand i indica una similitud global amb el mecanisme d'activació d'altres receptors. Tot i així, encara no s'ha trobat cap gen que codifiqui per una proteasa que afecti a l'activació del receptor Torso, encara que la seqüenciació del genoma de *Drosophila* ha donat a conèixer molts nous gens que codifiquen per proteases. Per tant, per poder avançar ens

els mecanismes implicats en l'activació del receptor Tor caldrà identificar una proteasa implicada en la proteòlisi de la proteïna Trk.



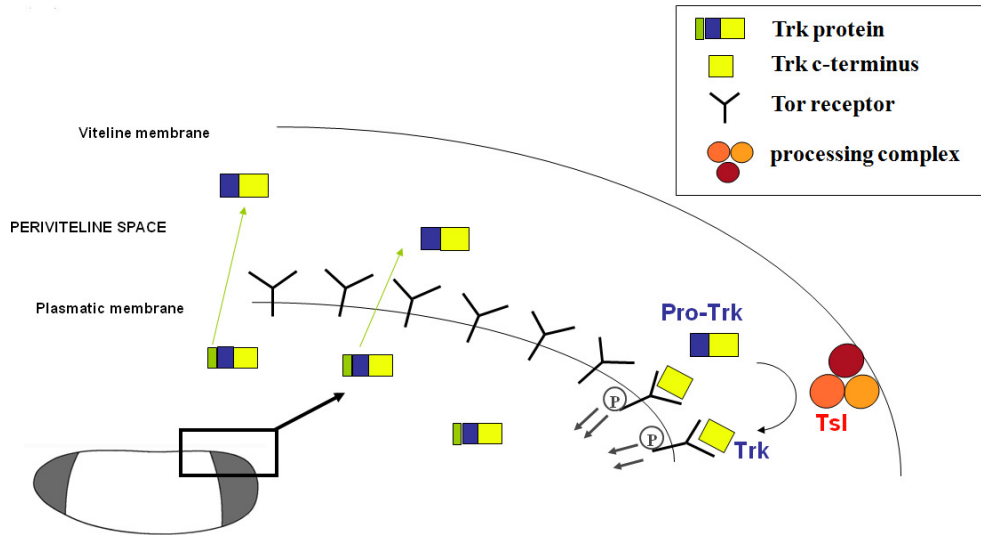
**Figura 7:** Esquema de l'expressió *wild-type* de *tsl*, en comparació amb una expressió ectòpica de *tsl*, amb les conseqüències que comporta en un embrió primerenc pel que fa a l'activació ubiqüa de la via del receptor Torso. (Figura realitzada per Alessandro i Marc).

Totes juntes, aquestes observacions suggereixen que el mecanisme que controla l'activació localitzada de Torso depèn del control del clivellament restringit d'un precursor de lligand distribuït uniformement per l'espai perivitel·lí i codificat pel gen *trk* (Figura.....) (Casali and Casanova, 2001). Per tant, per tal de validar el model, serà necessari que s'identifiqui els passos que porten al clivellament de Trk. Una altra qüestió és quin paper té Tsl en l'activació de la via. Una possibilitat que s'ha proposat és que Tsl podria actuar com una proteïna unida a membrana que seria necessària per nuclear al seu voltant un complex proteolític implicat en l'ancoratge de Trk, però el seu mecanisme d'acció encara es desconeix.

Recentment s'ha demostrat (mitjançant tècniques de western blot) que la proteïna Trk realment es processa *in vivo* (Henstridge *et al* 2014) i que aquest processament és independent de Tsl. Aquest resultat, per tant, implica que el paper de Tsl en l'activació de Trk seria independent del processament.

Diferents resultats suggereixen que el mecanisme que controla l'activació localitzada del receptor Torso als pols de l'embrió depèn del control del processament del producte de *trk*. En el nostre model el gen *trk* codificaria pel pre-pro-lligand de Tor (veure figura 8). Trk seria secretat des de dins l'embrió cap a l'espai perivitel·lí (l'espai que queda entre la membrana plasmàtica de l'embrió i la membrana vitel·lina) per on difondria lliurement com una forma inactiva (pro-Trk) i seria activat de manera restringida als pols de l'espai perivitel·lí, probablement per processament proteolític alliberant un fragment C-terminal de Trk que seria la forma activa del lligand que difondria localment activant el receptor als pols.





**Figura 8:** El mecanisme que controla l'activació localitzada de Tor depèn del control de la proteòlisi de la forma inactiva de Trk, que està distribuïda uniformement per l'espai perivitell·lí. (Figura realitzada per Alessandro i Marc).

## 2. AIMS

The Torso receptor route is presented as a convenient model system for the study of mechanisms involved in obtaining the localized activation of the receptors that are expressed in broader domains and that are activated from the moment when its activity is required.

A number of results suggest that the mechanism that controls the localized activation of the Torso receptor to the embryo pulse depends on the control of the processing of the Trk protein. However, no protease involved in the activation of the terminal system has been identified so far.

The main goal of my Degree Final Project is to collaborate in the process of identifying a serine protease implied in the activation by the Trunk proteolytic processing. With the objective to move forward in the mechanisms involved in the localized activation of the Torso receptor.

In addition, during the placement in a company (carried out the summer of 2014) the work on this matter was initiated.

Moreover, different experimental working techniques in *Drosophila melanogaster* could be learnt; as well as the genetic analysis, the work with different lines GAL4 – UAS, the elaboration of cuticles, among other techniques.

### **3. MATERIAL I MÈTODES**

#### **3.1. Sistema GAL4 - UAS (Tubulina germinal i somàtica)**

El sistema GAL4-UAS és un mètode genètic utilitzat per alterar l'expressió gènica i estudiar la funció dels gens en organismes com *Drosophila melanogaster*. És una tècnica molt poderosa per a l'estudi de la funció dels gens. El sistema consta de dues parts: el gen GAL4, que codifica per l'activador transcripcional Gal4, una proteïna pròpia del llevat *Saccharomyces cerevisiae*, i la seqüència UAS (*Upstream Activation Sequence*) a la qual s'uneix de manera específica a la proteïna GAL4. GAL4 és, doncs, un activador transcripcional, és a dir, s'uneixen a una seqüència UAS i activa la transcripció del gen que té al darrera (Duffy et al., 2002).

Diversos laboratoris han creat en *Drosophila* milers de línies GAL4 sota el control transcripcional de diferents promotors o enhancers, cadascuna de les quals expressen GAL4 en algun teixit cel·lular de l'organisme. En el nostre cas les línies que han estat comprades l'expressen sota el control del promotor de la tubulina ja sigui la tubulina específica de la línia germinal o la tubulina que s'expressa en totes les cèl·lules somàtiques.

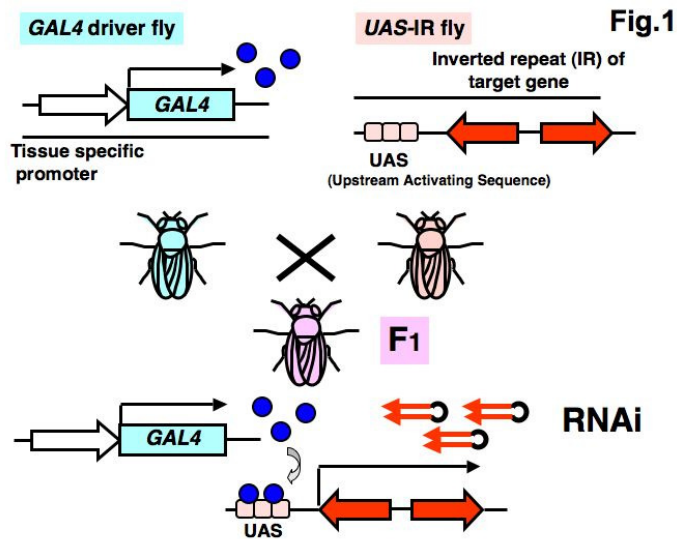
Les tubulines són una família de proteïnes fonamentals en el centrosoma. A més a més, generen components del citoesquelet, els microtúbuls, els quals en presenten totes les cèl·lules eucariotes. Per tant, el fet que s'hagi decidit comprar línies GAL4 - UAS - Tubulina somàtica / germinal és perquè les tubulines són proteïnes que es transcriuen molt en totes les cèl·lules de *Drosophila*.

La presència de GAL4, per si sola, en aquestes cèl·lules té molt poc o gens d'efecte, ja que l'efecte principal de GAL4 és unir-se a una regió UAS, les quals normalment no existeixen en el genoma de *Drosophila*. Per l'estudi en *Drosophila*, el gen GAL4 es col·loca sota el control d'un gen promotor natiu mentre que l'UAS controla l'expressió d'un gen diana. Per tant, es generen mosques transgèniques en les que diferents gens o formes modificades de gens o, en el nostre cas, l'RNAi, es clonen darrera una seqüència UAS i posteriorment aquestes mosques seran creuades amb altres que portin la línia GAL4 d'interès.

En concret el GAL4 només s'expressa en les cèl·lules on la tubulina és normalment expressada, d'aquesta manera GAL4 només ha d'activar la transcripció de gens on s'ha introduït una seqüència UAS.

GAL4 i UAS són, doncs, molt útils per l'estudi de l'expressió gènica en *Drosophila* ja que normalment no hi són presents i la seva expressió no interfereix amb altres processos cel·lulars.

Una altra de les coses que podem fer a partir d'aquests mecanismes, és que GAL4 s'uneixi a una seqüència UAS - RNAi - gen X fent, així, que aquest gen X s'inactivi. Això és el s'ha realitzat en el meu Treball de Final de Grau. És a dir, GAL4 s'uneix a una seqüència UAS - RNAi d'una serina proteasa produint, així, una disminució de la seva transcripció (veure figura 8).



**Figura 9:** Representació esquemàtica del procés d'obtenció de *Drosophila* amb seqüències GAL4-UAS-RNAi (Extret de Taniguchi N. et al., 2008).

Com a resum podem dir que s'han generat femelles amb seqüències que tenen el GAL4 i l'UAS - RNAi - X, on X és qualsevol de les serines proteases testades, per tal d'inactivar la funció materna del gen X a la línia germinal i la somàtica. En el següent apartat (3.2.) explicaré el funcionament dels RNAi.

### 3.2. Inactivació de la proteasa. el silenciament postranscripcional dels gens a partir de l'rna d'interferència

La disminució de l'activitat d'un gen determinat que codifica per una proteasa s'ha fet a partir de la tècnica d'RNA d'interferència (RNAi). El fenomen d'interferència està involucrat en la seqüència específica de la regulació de gens impulsat per la introducció de dsRNA que resulta en la inhibició de la traducció o la repressió transcripcional.

En els eucariotes superiors, inclòs els nemàtodes, *Drosophila*, les plantes i els mamífers, s'ha descobert un tipus de petits RNA, anomenats micro-RNA (miRNA), els quals participen en el silenciament de molts gens. Aquests RNA actuen interaccionant amb l'mRNA, normalment a l'extrem 3' UTR, provocant la seva degradació o la inhibició de la transducció. En els dos casos, l'mRNA, i per tant el gen que el produeix, és silenciat. Aquesta manera de regulació gènica controla el desenvolupament temporal com a mínim en alguns organismes.

Molts miRNA estan presents només de manera transitòria durant el desenvolupament, i algunes vegades se'ls anomena petits RNA temporals (stRNA). En els eucariotes superiors s'han identificat milers de miRNA diferents, que poden influir en la regulació d'un terç dels gens dels mamífers. S'han transcrit en forma d'un RNA precursor d'uns 70 nucleòtids, amb seqüències complementàries internes que formen estructures en forqueta. Els precursors es tallen amb endonucleases com Drosha i Dicer per formar dúplex curts de 20 a 25 nucleòtids de llargada. Un dels bri de l'miRNA madur s'associa amb l'mRNA diana (o amb l'RNA d'un virus o d'un transposó), provocant la inhibició

de la traducció o la degradació de l'RNA. Alguns miRNA s'uneixen i afecten a un únic mRNA, amb la qual cosa influeixen en l'expressió d'un únic gen. Altres interaccionen amb múltiples mRNA i, per tant, constitueixen el nucli del mecanisme dels regulons que coordinen l'expressió d'una gran quantitat de gens (Alberts et al., 2004).

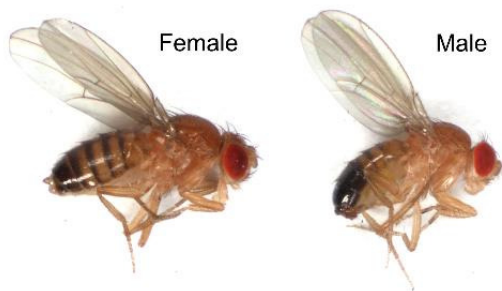
La via de l'RNAi s'inicia per l'enzim Dicer, que escindeix llargues molècules d'RNA de doble cadena (dsRNA) en fragments curts de doble cadena d'aproximadament 20 nucleòtids de siRNAs. Cada siRNA es desenrotlla en dos RNA d'un sol bri (ssRNAs), el bri de passatgers i el bri guia. El bri de passatgers es degrada i el bri guia s'incorpora al complex de silenciament induït per l'RNA (RISC). El resultat més ben estudiat és el silenciament gènic post-transcripcional, que es produeix quan els parells de bri guia amb una seqüència complementària a la molècula d'RNA missatger induueix l'escissió per Argonaute, el component catalític del complex RISC.

Aquest mecanisme de regulació gènica té un efecte interessant i pràctic cosa que el fa d'una gran utilitat. Si s'introdueix en un organisme una molècula d'RNA dúplex, corresponent a la seqüència de gairebé qualsevol mRNA, l'endonucleasa DICER talla el dúplex en petits fragments anomenats RNA d'interferència (siRNA). Aquests fragments s'uneixen a l'mRNA i el silencien. El procés es coneix com interferència per RNA (iRNA).

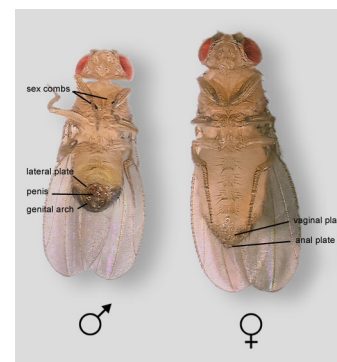
RNAi és una important eina de recerca ja que el dsRNA sintètic introduït en les cèl·lules de forma selectiva i robusta pot induir la supressió de gens específics d'interès. L'RNAi pot ser utilitzat a gran escala ja que sistemàticament disminueixen el producte d'un determinat gen de la cèl·lula, i d'aquesta manera ens ajudar a identificar els components necessaris per a un procés cel·lular particular o un esdeveniment com en el nostre cas. Aquesta tècnica s'ha convertit ràpidament en una eina molt eficaç per estudiar la funció gènica, ja que pot suprimir-la sense necessitat de crear un organisme mutant.

### 3.3. Diferenciació entre mascles i femelles

En general les femelles tendeixen a ser una mica més grans que els mascles. Els dos últims segments de l'abdomen dels mascles són més foscos que els de les femelles (veure figura 10). A més a més, si s'observa la forma de l'abdomen, en el cas dels mascles és més rodó a la part posterior i més acabat en punta amb les femelles. També es poden diferenciar per la genitalia a la part ventral i perquè els mascles tenen pintes sexuals (*sex combs*) al primer parell de potes (veure figura 11).



**Figura 10:** Femella i mascle de *Drosophila* (extret de *FlyMove*).

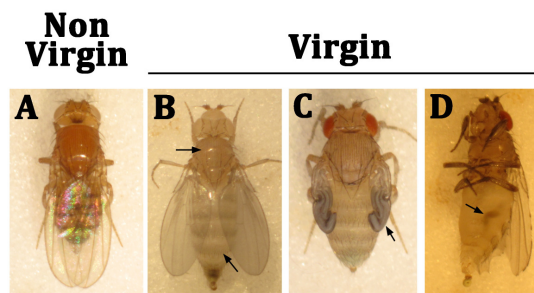


**Figura 11:** Mascle i femella de *Drosophila* (extret de *FlyMove*).

### 3.3.1. Femelles verges

Les femelles de *Drosophila melanogaster* poden aparellar-se a partir de les 6 hores, aproximadament, d'haver emergit de la coberta pupal. La femella, un cop aparellada, conserva l'esperma del mascle i va fecundant els ous a mesura que el va ponent. Per tant, per fer creuaments entre diferents soques cal utilitzar femelles que no hagin estat fecundades (femelles verges). Només podem estar segurs que una femella és verge si fa poc que ha sortit de la pupa i, per tant, presenta una aparença fràgil, és poc pigmentada (veure figura 12B), moltes vegades té les ales encara totalment plegades (veure figura 12C) i també presenten el meconi (veure figura 12D).

Podem verificar la virginitat de les femelles si als 3-4 dies, el recipient on es troben no presenta ous fecundats, és a dir, que mai en sortiran larves.



**Figura 12:** (A) Femella no verge. (B) Femella verge d'aparença fràgil i poc pigmentada, (C) femella verge amb ales plegades (D) femella verge amb el meconi present (extret de *FlyMove*).

### 3.4. Marcadors genètics dominants

En *Drosophila* existeixen una sèrie de marcadors genètics que s'utilitzen per seleccionar aquelles mosques que porten el gen d'interès. Aquest es troben als cromosomes balancejadors, així, es pot seleccionar la mutació d'interès. En el treball s'ha utilitzat com a marcadors la mida de les quetes (veure imatges 13 i 14) i la forma de les ales (veure imatges 15 i 16).



**Figura 13:** Quetes WT (*Wild Type*) (extret de *FlyMove*).



**Figura 14:** TM3 (quetes *Stubble* (Sb)) (extret de *FlyMove*).



**Figura 15:** Ales WT (extret de *FlyMove*)



**Figura 16:** Ales Cyó (ales corbades, Curly (Cy)) (extret de *FlyMove*).

### 3.5. Anàlisi dels embrions: creuaments genètics i cutícules embrionàries

Per a l'estudi dels embrions on les seves mares tenen les còpies incorporades del cromosoma corresponent i, per tant, per analitzar el fenotip embrionari dels embrions dipositats per aquestes femelles (mares) que dona la falta de funció d'una determinada proteasa es fan una sèrie de passos que a continuació explicaré per ordre que s'han realitzat.

Concretament s'ha fet a partir de *Drosophila* transgèniques Tubulina germinal Gal4 per un costat i per l'altre Tubulina somàtica Gal4.

Per a la realització de tots aquest passos i, per tant, fins obtenir el resultat final passen 20 dies aproximadament.

#### 3.5.1. Creuaments i tria de fills

El primer de tot és fer creuaments entre femelles verges Tubulina germinal GAL4-UAS o Tubulina somàtica GAL4 - UAS amb mascles UAS - RNAi - serina proteases. D'aquesta manera s'obtenen filles que incorporen cada una de les còpies dels cromosomes que ens interessin, és a dir, Tubulina germinal o somàtica i l'UAS - RNAi - serina proteasa.

Una vegada es tenen els fills cal seleccionar quines són les femelles que han incorporat cada una de les còpies dels cromosomes que ens interessin per a fer l'estudi. Això és degut a que no tots les hauran incorporat ja que en el cas de les femelles tubulina somàtica tenen la seqüència GAL4 - UAS balancejada amb un TM3, és a dir, que un cromosoma té la seqüència GAL4 - UAS i el seu homòleg té un TM3 (quetes *stubble*). A més a més, en alguns estocs l'UAS - RNAi - serina proteases dels mascles també tenen el cromosoma balancejat ja sigui amb TM3 (quetes *stubble*) o Cyó (ales corbades).

Per fer-ho s'ha observant el fenotip del cromosoma balancejador que utilitzat. El què s'ha fet és seleccionar aquelles femelles no TM3 (quetes *Wild Type*) i no Cyó (ales *Wild Type*), d'aquesta manera ens estarem assegurant de que han incorporat la còpia que esperem en el cromosoma. Els mascles no fa falta que es seleccionin ja que l'únic que ens importa és el genotip de la femella. Això és degut a que els gens que ens interessin són materns.

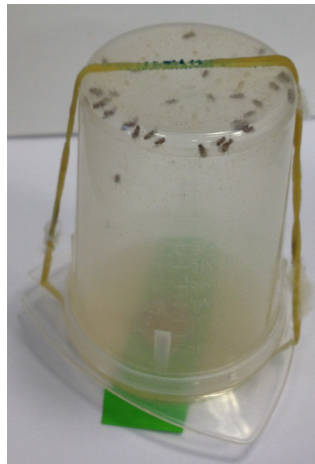
Després de fer la tria de les filles obtingudes, es posen mascles i femelles a 29°C durant 4 dies de manera que es produeixi un elevat número de còpies de la proteïna GAL4.

Així s'aconsegueix que el GAL4 s'activi en les cèl·lules de la línia somàtica o en les de la línia germinal, seguidament el GAL4 s'unirà a les seqüències UAS específiques i activarà la transcripció de l'RNAi capaç d'inactivar una espècie de serina - proteasa. És a dir, amb un cromosoma i ha una còpia de la tubulina – GAL4 i amb el seu homòleg una còpia de l'UAS -RNAi

### 3.5.2. Muntatge de nius

La preparació de nius, per tal, de posteriorment analitzar les cutícules embrionàries, consisteix en posar les mosques, després d'estar 4 dies a 29°C, en un pot tapat amb una placa de petri amb agar de suc de fruites i amb una mica de llevat al mig (veure figura...). El què aconseguim posant llevat per alimentar les mosques és que les femelles posin més embrions.

Els ous que ens interessin són els que tenen entre 24 i 48 hores a 29°C. Per tant, després de 24 hores d'haver fet la preparació del niu podrem treure la placa i esperar 24 hores més per tal de que tots els ous tinguin com a mínim 24 hores per desenvolupar-se. Seguidament es procedeix a la preparació de les cutícules embrionàries.



**Figura 17:** Preparació d'un niu (foto: Enric Furriols)

### 3.5.3. Preparació i anàlisi de cutícules embrionàries

La cutícula tarda 24 hores a formar-se des del moment en què els embrions són postos, amb el què, com a mínim, s'ha de deixar passar aquest temps per poder observar aquesta estructura. Els passos principals són l'eliminació del còrion (capa més externa de l'embrió) mitjançant un tractament amb lleixiu; l'eliminació opcional de la membrana vitel·lina (capa situada per sota del còrion) a través d'un tractament amb heptà/metanol; i la destrucció de les estructures embrionàries internes, mitjançant un tractament amb àcid làctic i Hoyer (1:1). El protocol seguit és el descrit per Wieschaus i Nüsslein-Volhard (1986).

Seguidament, una vegada tenim feta la preparació de les cutícules, es procedeix a mirar el fenotip cuticular dels embrions. Les preparacions cuticular s'han analitzat al microscopi Zeiss Axioskop 50, utilitzant camp forç o contrast de fases.



## **4. RESULTATS I DISCUSIÓ**

### **4.1. Estratègia de l'*screening***

L'activitat del Treball de Final de Grau estava emmarcada dins un dels objectius del laboratori del Dr. Casanova de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) que és el d'identificar els mecanismes implicats en l'activació localitzada del receptor Torso als pols de l'embrió de *Drosophila*. Concretament en el d'intentar identificar la serina proteasa implicada en l'activació per processament proteolític del pro-ligand Trunk.

A *Drosophila* existeixen més de 200 serines proteases i per identificar la proteasa implicada en processar el producte del gen *trunk* (*trk*) es fa caracteritzant el fenotip produït per la falta de funció de cada una de les diferents serines proteases inactivant la seva funció mitjançant la tècnica de RNA d'interferència (RNAi) utilitzant dsRNA. La serina proteasa que es busca és aquella que la seva falta de funció produeixi un fenotip idèntic al de la falta de funció del receptor Torso o a la falta de funció del pro-ligand Trunk.

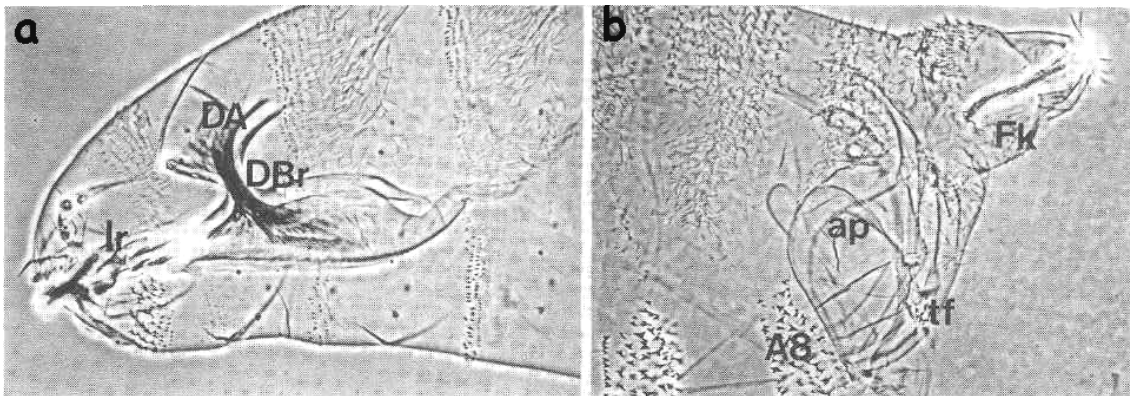
Com que no existeixen mutants de la majoria de serines proteases es va procedir a demanar una sèrie de línies UAS - RNAi - serina proteases en un centre de recerca, especialitzat en obtenir diferents línies de *Drosophila* transgèniques, anomenat TRIP (Trasgenic Rnai Project). Tot i que pugui semblar un desavantatge no tenir mutants per totes les serines - proteases, el fet d'utilitzar línies UAS - RNAi permet inactivar les serines proteases en un moment determinat del desenvolupament embrionari ja que ens permet inactivar la funció només a la línia germinal (Tubulina germinal) o només a les cèl·lules fol·liculars (Tubulina somàtica), i així poder analitzar la funció germinal o somàtica de gens amb un requeriment zigòtic que la seva falta de funció podria ser letal. D'altra banda no podem estar segurs que l'RNAi ha inactivat completament la funció del gen en concret ja que els RNAi no inactiven la funció sinó que únicament downregula, és a dir, la cèl·lula disminueix significativament la quantitat de proteasa però no l'elimina completament.

### **4.2. Validació de l'estratègia de l'*screening***

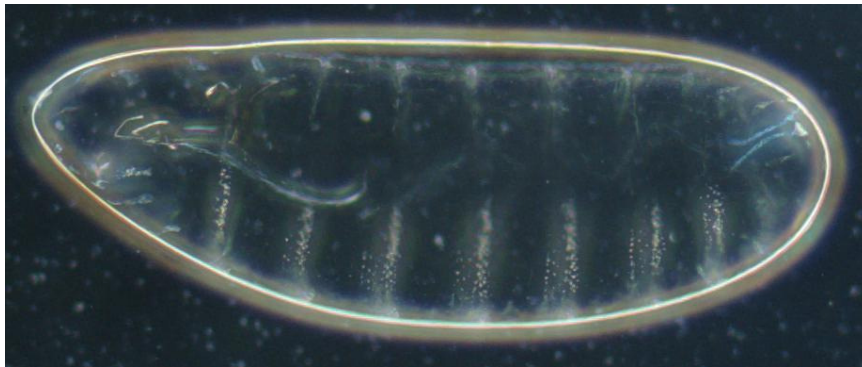
Com a pas previ es van testar 2 línies UAS - RNAi de Torso i Tsl i una altra línia UAS - tsl, d'aquesta manera es va poder tenir un primer contacte amb alguns dels possibles fenotips esperats. A més a més, es va poder comprovar que diversos resultats teòrics, ja publicats, realment funcionen a la pràctica i, a més a més, comprovar que l'estratègia d'*screening* dissenyada per identificar serina proteases implicades en el processament de Trunk mitjançant la tècnica GAL4/UAS-RNAi realment funciona.

A continuació hi ha representats els diferents fenotips:

#### 4.2.1. Embrió *Wild Type*: Embrió amb totes les estructures salvatges (veure figura 18)



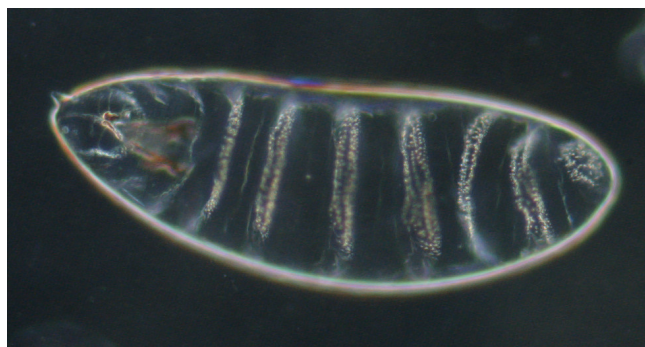
**Figura 18:** Fenotip cuticular d'una larva *Wild Type* vist amb microscòpia de contrast de fase. (a) regió anterior (àcron), (b) regió posterior (telson). *lr*: labrum, *DA*: braç dorsal, *DBr*: pont dorsal, *A8*: segment abdominal 8, *Fk*: filzkörper, *tf*: tuft, *ap*: plaques anals. (Extret de Sprenger and Nüsslein-Volhard, 1993).



**Figura 19:** Cutícula embrionària amb fenotip *Wild Type*. (Foto: Enric Furriols)

#### 4.2.2. UAS - Torso - RNAi

**Tubulina germinal - GAL4:** en aquest cas es sobreexpressa l'RNAi de Torso en les cèl·lules de la línia germinal i com a conseqüència s'observa un fenotip terminal. Aquest fet és degut a la inactivació del gen *tor*. És a dir, pel fet de que la no presència del receptor Torso a la membrana vitel·lina aquest no s'ha pogut activar donant com a resultat un fenotip terminal, és a dir, sense les estructures terminals. A la següent imatge (veure figura 19) es pot veure clarament un embrió sense les estructures típiques dels pols de l'embrió.



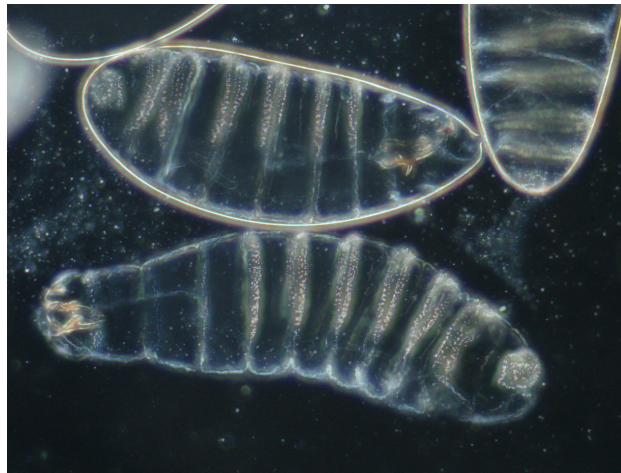
**Figura 19:** Cutícula embrionària amb fenotip terminal. (Foto: Enric Furriols)

**Tubulina Somàtica - GAL4:** en aquest cas l'RNAi de Torso s'expressa a les cèl·lules fol·liculars i no s'observa cap fenotip ja que el RNA de Torso no s'expressa a les cèl·lules fol·liculars de la línia somàtica i com a conseqüència s'observa un fenotip salvatge (*Wild Type*). Això és degut a que l'RNA de Torso s'expressa en les cèl·lules de la línia germinal. En canvi, si inactivem l'RNA de Torso en les cèl·lules fol·liculars com que prèviament ja s'ha expressat no té cap mena de repercussió.

#### 4.2.3. UAS - torso-like RNAi

**Línia germinal:** en aquest cas torso-like és inactivat en les en les cèl·lules de la línia germinal i com a conseqüència s'observa un fenotip *Wild Type*. Això és degut a que l'RNA de torso-like s'expressa les cèl·lules de la línia somàtica.

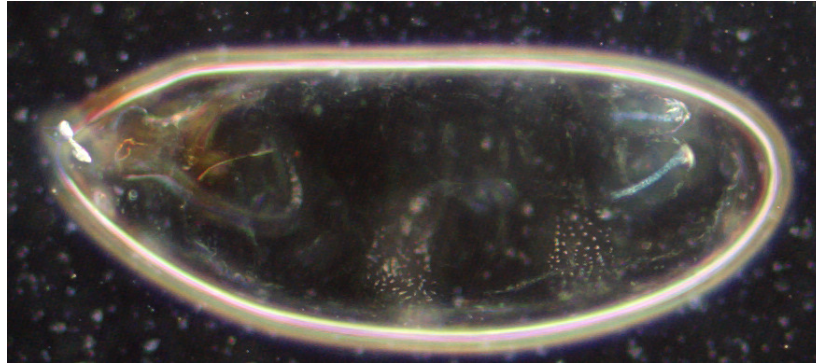
**Línia somàtica:** en aquest cas es sobreexpressa l'RNAi de torso-like en les cèl·lules de la línia somàtica i com a conseqüència s'observa un fenotip terminal. Aquest fet és degut a la inactivació del Tsl. És a dir, pel fet de que la no presència de torso-like en les cèl·lules fol·liculars el receptor Torso no s'ha pogut activar correctament donant com a resultat un fenotip terminal, és a dir, sense les estructures terminals. A la següent imatge (veure figura 20) es pot veure clarament un embrió sense les estructures típiques dels pols de l'embrió.



**Figura 20:** Cutícula embrionària amb fenotip terminal. (Foto: Enric Furriols)

#### 4.2.4. UAS torso-like

**Línia somàtica:** la sobrepressió de Tsl a totes les cèl·lules fol·liculars produeix un fenotip que consisteix en una reducció o desaparició de les estructures centrals de l'embrió, mentre que les estructures terminals es formen d'una manera més o menys precisa (veure figura 21). En aquest cas, per exemple, hi apareixen filzkörper, per tant, hi ha hagut una sobreactivació de la funció de Torso a tot l'embrió.



**Figura 21:** Cutícula embrionària amb fenotip de guany de funció. (Foto: Enric Furriols)

#### 4.3. Llistat de les serines proteases testades

Degut a la gran quantitat de proteases, fins a dia d'avui, després d'haver-ne tastat 68 (veure taula 1 a la següent pàgina) encara no se n'ha identificat cap que pugui estar implicada en el processament de *trunk*. Això es va poder comprovar ja que una vegada muntades les cutícules no es va veure cap fenotip de falta de funció, és a dir, tots els fenotips observats van ser *Wild Type*.

En canvi, el resultat esperat, com a mínim per una de les proteases, era un fenotip de falta de funció terminal, ja que si haguéssim downregulat la funció de la proteasa implicada en el processament de *trunk* el receptor Torso no s'hauria activat correctament i com a conseqüència no s'haurien generat les estructures terminals tal i com s'ha pogut comprovar en el cas de l'UAS -RNAi de Torso i torso-like.

L'anàlisi genètic s'ha basat, doncs, en la possibilitat d'induir mutacions en el genoma i, així, inferir en la funció del gen mutat a partir del fenotip que s'observa en la cutícula. És a dir, en aquests screenings s'aprofitava l'organització de les diferents estructures terminals cuticulars de les larves com a elements marcadors que definien el patró del cos. Per tant, a partir del fenotip es poden establir interaccions gèniques. És a dir, per identificar la proteasa implicada en el processament del lligand cal caracteritzar el fenotip produït per la falta de funció de cadascuna de les diferents serines proteases inactivant la seva funció mitjançant la tècnica de RNA d'interferència (RNAi). Tot i així, en el nostre estudi, fins a dia d'avui no s'ha aconseguit establir cap interacció gènica.

Cal dir que encara queden moltes serines - proteases per testar, per tant, pot ser que alguna de les que falta sigui la proteasa implicada en el processament de *trunk*.

A la següent pàgina mostro una taula amb totes les serines proteases testades fins a dia d'avui.

**Taula 1:** Llistat de serines – proteases testades. Indicades segons dos codis de nomenclatura, el número BL i el codi CG.

Número BL	CG#
44486	CG8579
50705	CG31034
51824	CG18444
53362	CG12385
54475	CG15002
51161	CG6298
43198	CG15042
53363	CG1304
52894	CG11911
53366	CG14760
52893	CG11192
52896	CG18065,CG13430
53364	CG13527
51401	CG9897
53367	CG14990
51697	CG10477
51692	CG6483
44656	CG10475
51754	CG7118
51698	CG8329
51451	CG18179
51469	CG11529
51429	CG7542
52892	CG10586
53360	CG11037
53359	CG10587
53365	CG14642
50698	CG12951
52891	CG10232
50648	CG2229
53333	CG11430
44476	CG31217
53361	CG32270,CG32269
53368	CG1632
33926	CG16705
54805	CG16997
53369	CG17012
52895	CG17475
53370	CG17404

53371	CG1773
53372	CG31827,CG18478
53373	CG18557
53374	CG18681
53375	CG18735
53376	CG30283
44269	CG31039
53673	CG3117
53674	CG31954
52870	CG32374
52897	CG3355
52872	CG4053
52873	CG4271
52898	CG4386
36078	CG4998
52874	CG5255
52875	CG5390
52876	CG5909
52877	CG6367
50579	CG6467
52899	CG7142
52878	CG30090
52900	CG33460
52879	CG32382
54468	CG32382
42484	CG8867
44504	CG8869
52901	CG9676
52880	CG9737

## **5. CONCLUSIONS**

Having completed the placement for my Degree Final Project in the *Institut de Biologia Molecular de Barcelona* (IBMB) a number of conclusions have been reached. The conclusions are as follows:

1) The terminal phenotype produced by the overexposure of a line UAS-dsRNA-tor to the germ line using a germ tubulin - GAL4 shows that the Torso function has been inactivated and that this GAL4 line is an excellent driver to inactivate or downregulate the function of maternal genes that are expressed in the germ line using the Interference RNA technique (iRNA).

2) The terminal phenotype produced by the overexpression of a line UAS - dsRNA - tsl to the follicular epithelium of the ovary using a somatic tubulin – Gal4 shows that a tsl function is inactivated and that this line Gal4 is an excellent driver to inactivate or downregulate the function of maternal genes which are expressed in the follicular cells using the RNAi technique.

3) The previous two results validate the screening strategy designed in order to identify the serine proteases involved in the pro-ligand Trunk processing using the GAL4/UAS-RNAi technique: to search a terminal phenotype produced by the overexpression in the germ line (using germ tubulin - GAL4) or in the follicular cells (using germ tubulin - GAL4) of the dsRNA of each of the *Drosophila* serine proteases.

4) Having analysed over 70 serine proteases, up to the current moment, none has been proved to be involved in the Trunk processing. However, the fact that about 100 lines are yet to be analysed and that they are potentially indicated to result in a terminal phenotype must be considered.

Before concluding this work, I would like to express my gratitude to Jordi Casanova, Head of the Laboratory in the *Institut de Biologia Molecular de Barcelona* (IBMB) where I have carried out my Degree Final Project. Thank you for giving me the opportunity to carry out this project.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Albert L. Lehninger ; David L. Nelson ; Michael M. Cox (2009): *Principios de bioquímica*. Traduït per Claudi M. Cuchillo. 5<sup>a</sup> ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.
- B. Alberts ; A. Johnson ; J. Lewis ; M. Raff ; K. Roberts ; P. Walter (2004): *Biología molecular de la célula*. Traduït per Mercè Durfort ; Miquel Llobera. 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Casali A and Casanova J. (2001) The spatial control of Torso RTK activation: a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development*. 128:1709-1715.
- Casanova, J., Struhl, G., 1989. Localized surface activity of torso, a receptor tyrosine kinase, specifies terminal body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3, 2025–2038.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34 (1–2): 1–15. doi:10.1002/gene.10150. PMID 12324939.
- Furriols, M., Casali, A., Casanova, J., 1998. *Dissecting the mechanism of torso receptor activation*. *Mech. Dev.* 70, 111–118.
- Furriols, M., Casanova, J., 2003. *In and out of Torso RTK signalling*. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 22, 1947–1952.
- H. Curtis ; N. Sue Barnes ; A. Schnek ; A. Massarini (2008): *Biología*. 7<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Jiménez G, Guichet A, Ephrussi A and Casanova J. (2000) Relief of gene repression by Torso RTK signalling: role of *capicua* in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.* 14:224- 231.
- Li, W.X., 2005. *Functions and mechanisms of Receptor Tyrosine Kinase Torso signaling: lessons from Drosophila embryonic terminal development*. *Dev. Dyn.* 232, 656–672.
- Liu Q, Rand T, Kalidas S, Du F, Kim H, Smith D, Wang X; Rand; Kalidas; Du; Kim; Smith; Wang (2003). *R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway*. *Science* 301 (5641): 1921–5. Bibcode:2003Sci...301.1921L. doi:10.1126/science.1088710. PMID 14512631.
- Mineo A, Furriols M, Casanova (2015). Accumulation of the *Drosophila* Torso-like protein at the blastoderm plasma membrane suggests that it translocates from the eggshell. *The company of biologists*. 142, 1299-1303 doi:10.1242/dev.117630.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (October 1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287 (5785): 795–801. doi:10.1038/287795a0. PMID 6776413.
- Preall J, He Z, Gorra J, Sontheimer E (2006). *Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in Drosophila*. *Curr Biol* 16 (5): 530–5. doi:10.1016/j.cub.2006.01.061. PMID 16527750.

Sprenger F and Nüsslein-Volhard C. (1993) *The Terminal System of Axis Determination in the Drosophila Embryo. In The Development of Drosophila melanogaster*. Bate, M. and Martínez- Arias, A, eds.Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sprenger, F., Stevens, L.M., Nüsslein-Volhard, C., 1989. The *Drosophila* gene torso encodes a putative receptor tyrosine kinase. *Nature* 338, 478–483.

Stevens L, Beuchle D, Jurcsak J, Tong X and Stein D. (2003) The *Drosophila* Embryonic Patterning Determinant Torsolike Is a Component of the Eggshell. *Current Biology*. Vol.13, 1058-1063.

Taniguchi N. et al., 2008. *Experimental Glycoscience - Glycobiology* Springer Japan KK., pp.285-289 Nishihara S. Part2: Section XIV

Tseng AS, Tapon N, Kanda H, Cigizoglu S, Edelmann L, Pellock B, White K and Hariharan IK. (2007) Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signalling pathway. *Curr Biol*. 17(8):728-733.

Van der Meer, 1977 *Optical clean and permanent whole mount preparations for phase-contrast microscopy of cuticular structures of insect larvae Dros. Infor. Serv.*, 52 (1977)

*FlyMove* Recuperat 12 de maig de 2015 des de: <http://flymove.uni-muenster.de/>

*Transgenic RNAi Project*. Recuperat 12 de maig de 2015 des de: <http://www.flyrnai.org/TRiP-HOME.html>

*Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University*. Recuperat 20 de maig de 2015 des de: <http://flystocks.bio.indiana.edu/>